

УДК 577.152.1

Биофармакология ферментных конъюгатов: вазопротекторная активность супрамолекулярного производного супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза

А. В. Максименко*, А. В. Ваваев, Л. И. Бурячковская, В. П. Мох, И. А. Учитель, В. Л. Лакомкин, В. И. Капелько, Е. Г. Тищенко

Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития, 121552, Москва,

3-я Черепковская ул., 15А

* E-mail: alexmak@cardio.ru

Поступила в редакцию 07.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Показано, что биферментный конъюгат супероксиддисмутаза с каталазой, ковалентно сопряженных друг с другом через хондроитинсульфат – гликозаминогликан эндотелиального гликокаликса (СОД-ХС-КАТ) – обладает вазопротекторной активностью при взаимодействии с тромбоцитами и кольцевым артериальным фрагментом сосуда крысы, а также при нормализации показателей гемодинамики крыс и кроликов в условиях окислительного стресса, вызванного введением пероксида водорода. Биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ угнетал агрегацию тромбоцитов; антиагрегантное действие проявлялось благодаря комбинированной ферментативной активности и приобретенной надмолекулярной структуре. Влияние на тонус артериального фрагмента было эквивалентным для СОД и КАТ в нативном и сопряженном виде. Эффективность нормализующего действия конъюгата СОД-ХС-КАТ на величины артериального давления и частоты сердечных сокращений у крыс и кроликов была достоверно выше соответствующих показателей в контрольных опытах (введение физиологического раствора). Обнаружена возможность использования конъюгата СОД-ХС-КАТ в хроническом профилактическом режиме и обоснована целесообразность разработки его пероральных форм. Мы предполагаем, что разработка ферментных конъюгатов медицинского назначения является перспективным подходом для создания новых лекарственных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антиоксидантная терапия, супероксиддисмутаза, каталаза, хондроитинсульфат, сосудистая стенка, окислительный стресс, пероксид водорода, биферментный конъюгат, тромбоциты, артериальный фрагмент, гемодинамика, вазопротекторная активность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СОД – супероксиддисмутаза; КАТ – каталаза; ХС – хондроитинсульфат; СОД-ХС-КАТ – биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза; АФК – активные формы кислорода; L-NNA – N_ω-нитро-L-аргинин; SNP – нитропруссид натрия; ADP – аденозиндифосфат; TRAP – пептидный агонист тромбинового рецептора; NA – норадреналин; АД – среднее артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЭКГ – электрокардиограмма; ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма.

ВВЕДЕНИЕ

В тромболитической терапии в качестве лекарств широко используются ферменты [1, 2]. Известны и «золотая» молекула фибринолиза, и «золотое» время тромболитизиса, расширяется арсенал биокатализаторов, предназначенных для него [3, 4]. Вместе с тем ресурс терапевтического применения ферментов не исчерпан и ведется поиск их новых форм для оригинальных курсов лечения разных патологий [5, 6].

Сегодня общеизвестно, что развитие многих патологий сопровождается окислительным стрессом [7, 8]. В состоянии нормы активные формы кислорода (АФК) участвуют в процессах клеточного сигналинга, а при нарушении окислительно-антиоксидантного равновесия в сторону избыточного образования АФК – в развитии окислительного стресса. Избыток АФК в организме вызывает модификацию макромолекул, нарушение путей метаболизма и прогрессиру-

вание патологических процессов [9], предотвращению и замедлению которых служит превентивное использование антиоксидантов [10]. Среди них по высокой эффективности своего защитного действия, специфичности и установленному механизму катализируемых реакций выделяются ферменты [11]. Развитие подавляющего большинства сердечно-сосудистых нарушений включает фазу окислительного стресса. Поэтому в кардиологии исследования антиоксидантов проводятся особенно интенсивно.

К антиоксидантным ферментам организма в настоящее время относят супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу [9–11]. Автономность функционирования двух первых делает их привлекательным объектом для разработки антиоксидантного препарата для защиты сердечно-сосудистой системы от окислительного стресса. Основываясь на указанных преимуществах, мы выбрали Cu,Zn-супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу (КАТ) в целях создания комбинированного ферментного антиоксидантного производного.

Наш подход опирался на использование биохимически сопряженного действия СОД и КАТ, когда продукт первого ферментативного (СОД) превращения (H_2O_2) становится субстратом для второго (КАТ) с образованием безопасных в этих условиях конечных продуктов – воды и молекулярного кислорода [9, 11]. Накопление гликозаминогликана эндотелиального гликокаликса – хондроитинсульфата (ХС) – в зонах начальных атеросклеротических изменений сосудов (т.е. в очагах потенциального развития поражения сосудистой стенки) [12] явилось основанием для использования ХС в качестве «сшивающего» агента-модификатора для ферментных субъединиц [13]. Водорастворимая форма полученного экзогенного биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ позволяла осуществлять как внутривенное, так и пероральное введение. Следует отметить, что линейные размеры молекулы КАТ составляют $10.5 \times 10.5 \times 5.0$ нм [14], а СОД – $6.7 \times 3.6 \times 3.3$ нм [15]. Полимерная цепь ХС (мол. масса 25–50 кДа) «опутывает» поверхность ферментных субъединиц, соединяя их друг с другом в ковалентный конъюгат [16]. Указанная природа соединения ферментных субъединиц подтверждается данными денатурирующего электрофореза [13, 16] и наибольшей антитромботической активностью *in vivo* биферментного конъюгата в ряду различных сочетаний составляющих его компонентов, что обуславливает его оптимальное внутрисосудистое распределение и наилучшую эффективность действия [17]. По молекулярным размерам конъюгат входит в нижнюю часть нанощкалы, превращаясь в наночастицу (с ориентировочными размерами $(17-20) \times (14-18) \times (8-12)$ нм). Полагают, что физи-

ческие, химические и биологические свойства молекулярных объектов, имеющих наноразмеры, могут приобретать уникальный, а иногда и неожиданный характер по сравнению со свойствами их компонентов, в частности, из-за квантово-механических эффектов, привносимых образованными структурами.

Рассматривая надмолекулярный конъюгат СОД-ХС-КАТ как биферментное устройство с размерами наночастицы, в данной работе мы исследовали взаимодействие конъюгата с тромбоцитами (как происходящим в объеме кровотока) и с кольцевым артериальным фрагментом (как осуществляемым на поверхности сосудистой стенки), а также на уровне целого организма экспериментальных животных как в условиях окислительного стресса, моделируемого введением пероксида водорода, так и без него.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В исследовании были использованы препараты Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД), выделенной из бычьих эритроцитов, со специфической активностью 3000 Ед/мг белка; каталазы (КАТ) из печени быка со специфической активностью 11000 Ед/мг белка; хондроитин-4-сульфат А (мол. масса 25–50 кДа) из трахеи быка; бензохинон, диметилформамид, β -галактозидаза (из *Escherichia coli*), ксантин, пероксид водорода, норадреналин, N_{ω} -нитро-L-аргинин (L-NNA), ацетилхолин, нитропруссид натрия (SNP) (все – Sigma, США). Ксантиноксидаза была приобретена в Calbiochem (США), нитротетразолий синий – в Реанал (Венгрия), сефадекс G-25 и сефакрил S-300 – в Pharmacia (Швеция). Остальные реагенты – аналитически чистые вещества отечественного производства.

Получение биферментного производного СОД-ХС-КАТ проводили описанным ранее способом [16]. Весовое содержание белка в препарате СОД-ХС-КАТ составляло 4–6%, удельная (специфическая) активность СОД составляла 60 Ед/мг препарата, КАТ – 140 Ед/мг препарата. Приготовление конъюгата СОД-ХС-КАТ с необратимо инактивированными формами ферментов осуществляли с предварительной инактивацией СОД и КАТ после их инкубации с 0.3 М раствором пероксида водорода (рН 7.0, 0.02 М фосфатный буфер, комнатная температура, 3 ч) и при рН 11.8–12.0 (0.05 М NaOH, комнатная температура, 2 ч) соответственно [16].

Методы

Биохимические определения. Содержание белка в препаратах определялось по методу Бредфорд. Ферментативную активность СОД измеряли по ин-

гибированию восстановления нитротетразолия синего в системе ксантин-ксантиоксидаза, рН 7.8 [13], а КАТ – спектрофотометрически по уменьшению поглощения (расход пероксида водорода) при длине волны 240 нм (рН 7.0, комнатная температура) [16].

Изучение агрегации тромбоцитов. Для изучения влияния пероксида водорода и СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов использовали кровь здоровых добровольцев, которую получали самотеком из кубитальной вены ладони, собирая 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 мин. Агрегацию тромбоцитов оценивали с помощью лазерного двухканального анализатора агрегации БИОЛА (модель LA 230-2, фирма НПФ Биола, Россия). 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 агрегации – спонтанной и индуцированной 0.5 мкМ аденозиндифосфата (ADP), 0.5 мкМ серотонина и 1 мкМ TRAP (пептидный агонист тромбинового рецептора) 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. Объем кюветы агрегометра – 0.3 мл. Исследование проводили не позднее 2 ч после взятия крови.

Адгезию оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Пробу ОТП (15 мкл) смешивали с физиологическим раствором, H₂O₂ и/или препаратами каталазы и наносили на адгезивную поверхность (стекло), инкубировали 15 мин при комнатной температуре в закрытом боксе для предотвращения высыхания, осторожно отмывали в физиологическом растворе, чтобы снять неприкрепленные клетки, и фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде 1.5 ч. По окончании фиксации образец обезвоживали и готовили для микроскопии.

Подсчет тромбоцитов различной формы осуществляли на 25 полях сканирования при увеличении 2500х на сканирующем электронном микроскопе

PHILLIPS PSEM 550х и выражали в процентах от общего количества клеток.

Исследование изменений тонуса кольцевого артериального фрагмента крысы. После декапитации крысы линии Wistar (самцы массой 350–400 г) вскрывалась брюшная полость и выделялась брюшная аорта. Удаленный сегмент аорты тщательно очищался от соединительной ткани и нарезался на кольцевые фрагменты длиной 3 мм. Фрагменты аорты, надетые на иголки, соединенные с тензодатчиком (определяющим силовое усилие, производимое в системе артериальным фрагментом, в мН), погружались в раствор Кребса–Хэнсильяита и продувались карбогеном при 37°C и рН 7.4 [18]. Окислительный стресс моделировали введением в инкубационный раствор пероксида водорода на фоне норадrenalиновой (NA) преко́нстрикции (предварительного сокращения артериального фрагмента на введение норадrenalина перед введением другого стимула). Изменение тонуса сосуда оценивалось относительно величины сокращения на 0.1 мкМ NA, принятой за 100%. Производные антиоксидантных ферментов в разных концентрациях вводили за 10 мин до введения пероксида водорода. Влияние СОД (10 Ед/мл) на тонус артериального фрагмента определяли введением нативной СОД или СОД-ХС-КАТ на фоне NA-преко́нстрикции. Продукция эндогенного NO и его влияние на тонус кольцевого артериального фрагмента проверялись введением экзогенного ингибитора NO-синтазы L-NNA (0.1 мкМ).

Эксперименты in vivo. Переносимость и защитное действие производного СОД-ХС-КАТ в условиях окислительного стресса, вызванного внутривенным введением пероксида водорода, были изучены на самцах кроликов (*n* = 29) весом 3.65 ± 0.10 кг и самцах крысы линии Wistar (*n* = 13) весом 427 ± 7 г. Все эксперименты проводились на животных, анестезированных кетаминном.

Кроликам под кетаминным наркозом (50–60 мг/кг веса) с помощью игл, вклеенных в катетер (диаметром PE-50), катетеризировали центральную артерию одного уха и краевые вены левого и правого уха. После вводного наркоза (55 мг/кг) 5% кетамин продолжали вводить инфузией с помощью шприцевого насоса (SAGE Instruments, США) со скоростью 36–54 мкл/ч на 1 кг живого веса кролика. В вену другого уха болюсно вводили физиологический раствор или раствор производного СОД-ХС-КАТ, а также 0.8% раствор пероксида водорода, инфузией со скоростью 0.4 мл/мин в течение 3 мин 2 раза с перерывом в 20 мин, необходимого для полного восстановления параметров после первого введения пероксида

водорода и распределения внутривенно введенного конъюгата в организме. В остром опыте введение реагентов проводили в следующем порядке: пероксид водорода – физиологический раствор (контрольная группа) или СОД-ХС-КАТ (опытная или опытно-профилактическая группа) – пероксид водорода. Регистрация среднего артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и электрокардиограммы (ЭКГ) во втором отведении проводилась на приборе BIOGRAF-4 (Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения, Россия) с компьютеризированной записью данных с помощью АЦП платы NI 6210 (National Instruments, США) и их последующей обработкой с помощью программы анализа физиологических сигналов (Е.В. Лукошкова). После регистрации исходных параметров АД, ЧСС, ЭКГ (в течение 15 мин) прово-

дили 3-мин введение пероксида водорода с последующей 10-мин записью показателей АД, ЧСС и ЭКГ. Суммарная доза пероксида водорода, полученная животным за весь период эксперимента, составляла 0.31 мкмоль/кг. В контрольной группе $n = 12$, в опытных группах $n = 15$.

Крысам линии Wistar под кетаминным наркозом (100 мг/кг) вживляли катетеры (диаметром РЕ-50) в сонную артерию и яремную вену. Протокол эксперимента был таким же, как и ранее описанный, за исключением одного: пероксид водорода вводили на 2 мин дольше, чтобы получить сходные эффекты на параметры гемодинамики. Суммарная доза пероксида водорода, полученная крысами за весь период эксперимента, составила 4.5 мкмоль/кг. После проведенных экспериментов все животные оставались живы.

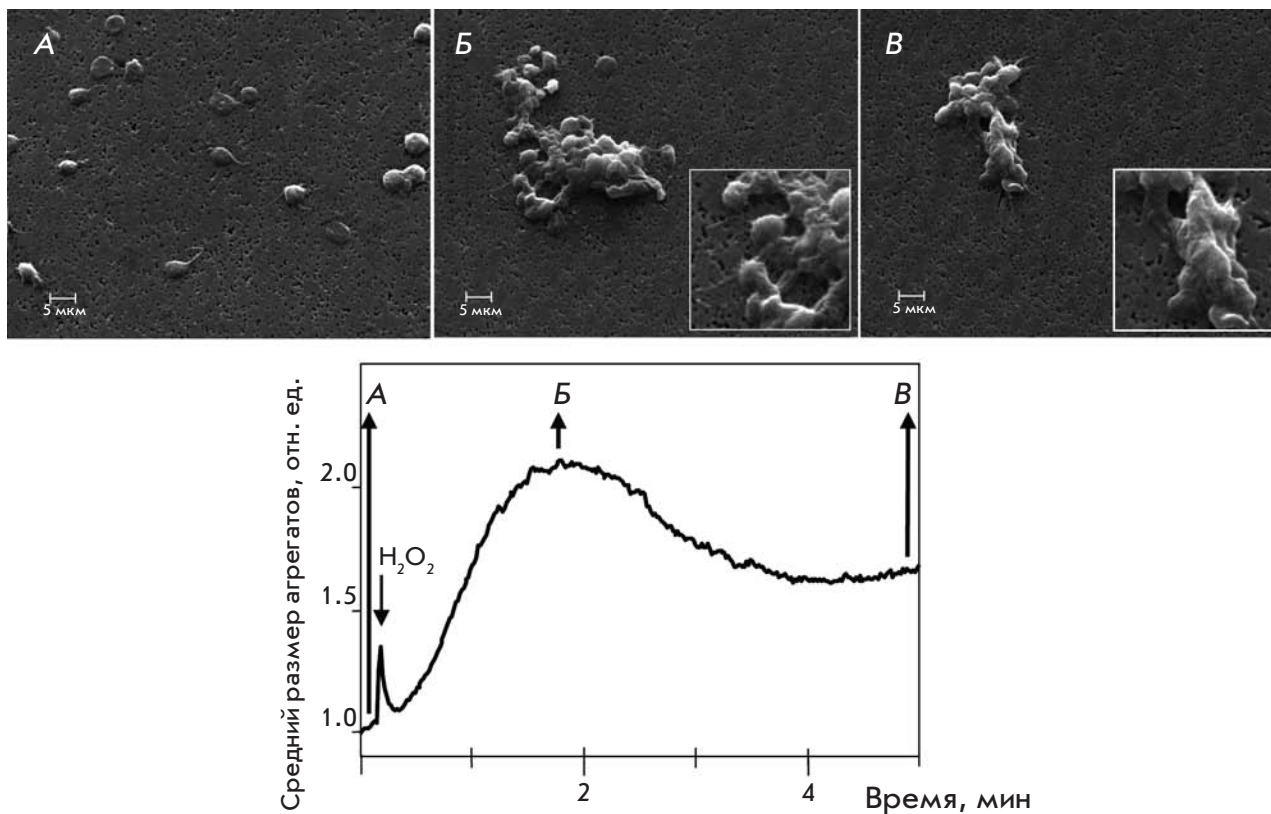


Рис. 1. Агрегация тромбоцитов, индуцированная 600 мкМ H_2O_2 . Микрофотографии А–В показывают состав тромбоцитарных агрегатов на разных стадиях их образования, график внизу иллюстрирует динамику агрегации тромбоцитов. А – Одиночные тромбоциты до начала агрегации в основном имеют дисковидную форму. Б – Образец, взятый на пике агрегации; агрегаты с плотным ядром в центре и слабо прикрепленными тромбоцитами по периферии (рыхлость структуры периферической области в увеличенном виде показана на вставке). В – Образец взят на 5-й мин агрегации; размер агрегатов уменьшился, по периферии отсутствуют слабо прикрепленные тромбоциты; при большем увеличении на вставке видно слияние тромбоцитов в агрегате. Увеличение 2500х, на вставках 5000х.

В отдельной серии экспериментов на кроликах ($n = 8$) исследовали переносимость производного СОД-ХС-КАТ по влиянию разных доз (терапевтической 1.5 мг препарата на 1 кг веса животного, а также 7.5 и 15 мг/кг) на среднее АД и ЧСС, как и на ЭКГ. После 15 мин контрольной регистрации АД, ЧСС (принятых за 100%) и ЭКГ вводили первую дозу производного СОД-ХС-КАТ (1.5 мг/кг) и записывали в течение 15 мин АД, ЧСС и ЭКГ, затем вводили следующую дозу СОД-ХС-КАТ (7.5 мг/кг) и через 20 мин – другую (15 мг/кг), в 10 раз превышающую терапевтическую, с записью гемодинамических параметров и ЭКГ. Животные, получившие суммарно 16-кратную терапевтическую дозу производного СОД-ХС-КАТ, через 3 сут использовались для оценки профилактического действия биферментного конъюгата при окислительном стрессе (как это описано выше) в сравнении с эффектами его острого применения и контрольного эксперимента на интактных кроликах, которым предварительно ничего не вводили.

Определение статистически значимых различий. Полученные результаты представлены как среднее значение \pm ошибка среднего ($\pm SE$, n – количество животных). Сравнение двух групп проводили с применением двухстороннего критерия Стьюдента (статистическая значимость различий оценивалась при $p < 0.01$). Если групп сравнения было более двух, статистическую обработку вели методом ANOVA ($p < 0.01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие СОД-ХС-КАТ на тромбоциты

В условиях нормы перексид водорода служит молекулой внутри- и межклеточной передачи сигнала. В интервале концентраций 20–50 мкМ перексид водорода обладает ограниченной цитотоксичностью для многих типов клеток; в физиологических условиях концентрация пероксида водорода более 50 мкМ считается высокой [19]. В экспериментах *in vitro* добавление 50–2000 мкМ пероксида водорода приводило к агрегации тромбоцитов (рис. 1). Методами сканирующей электронной микроскопии показано, что на максимуме агрегационного ответа образовавшиеся агрегаты состоят в центральной части из плотно связанных тромбоцитов, а в периферической – из слабо связанных (рис. 1Б). К 5-й мин процесса размер агрегатов снижался, а их структура становилась настолько плотной, что не удавалось различить отдельные клетки (рис. 1В). Уменьшение размеров агрегатов происходило как за счет диссоциации слабо связанных тромбоцитов от агрегационных центров, так и благодаря уплотнению центральных областей агрегатов. Превентивно добавленная в кю-

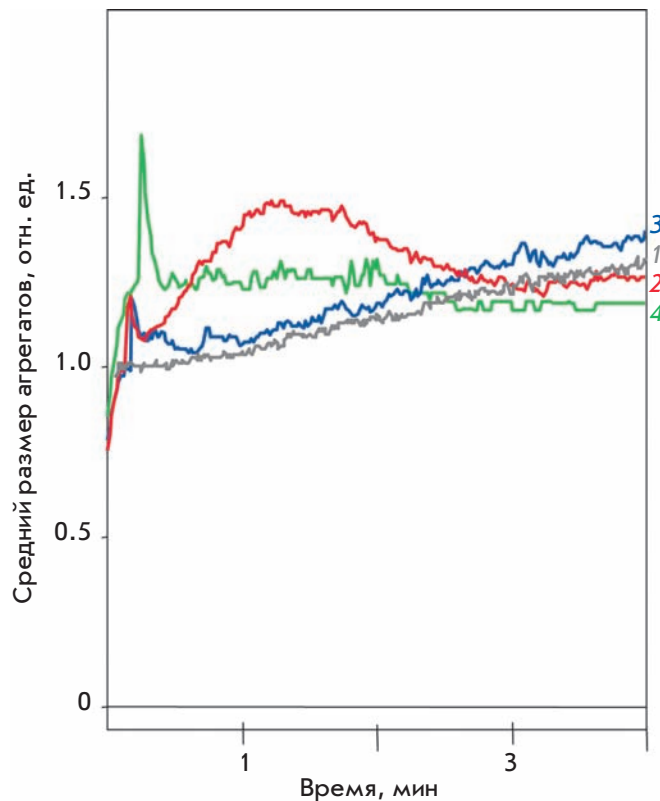


Рис. 2. Влияние пероксида водорода и производных КАТ и СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов. Кривая спонтанной агрегации тромбоцитов (1); агрегации в присутствии 300 мкМ H_2O_2 (2); при введении в кювету сначала 3000 Ед КАТ, а затем 300 мкМ H_2O_2 (3); при введении сначала 400 Ед КАТ-активности конъюгата СОД-ХС-КАТ, а затем 300 мкМ H_2O_2 (4).

вету агрегометра нативная КАТ в дозе 3000 Ед существенно снижает агрегационный эффект 300 мкМ пероксида водорода (рис. 2). Конъюгат СОД-ХС-КАТ нивелирует его уже в дозе 400 Ед КАТ-активности, демонстрируя повышенную дозозависимую антиоксидантную эффективность действия в сравнении с КАТ. Сами КАТ и ХС не оказывают влияния на агрегацию тромбоцитов.

Присутствие 300 мкМ H_2O_2 усиливает активацию тромбоцитов, регистрируемую по их агрегации, вызванную разными по механизму действия индукторами – АДФ, серотонином и TRAP (рис. 3). 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. 3А, 3Б, 3В соответственно). Применение конъюгата СОД-ХС-КАТ подтверждает его повышенную антиоксидантную активность, превосходящую действие КАТ. Эффект оказался дозозависимым,

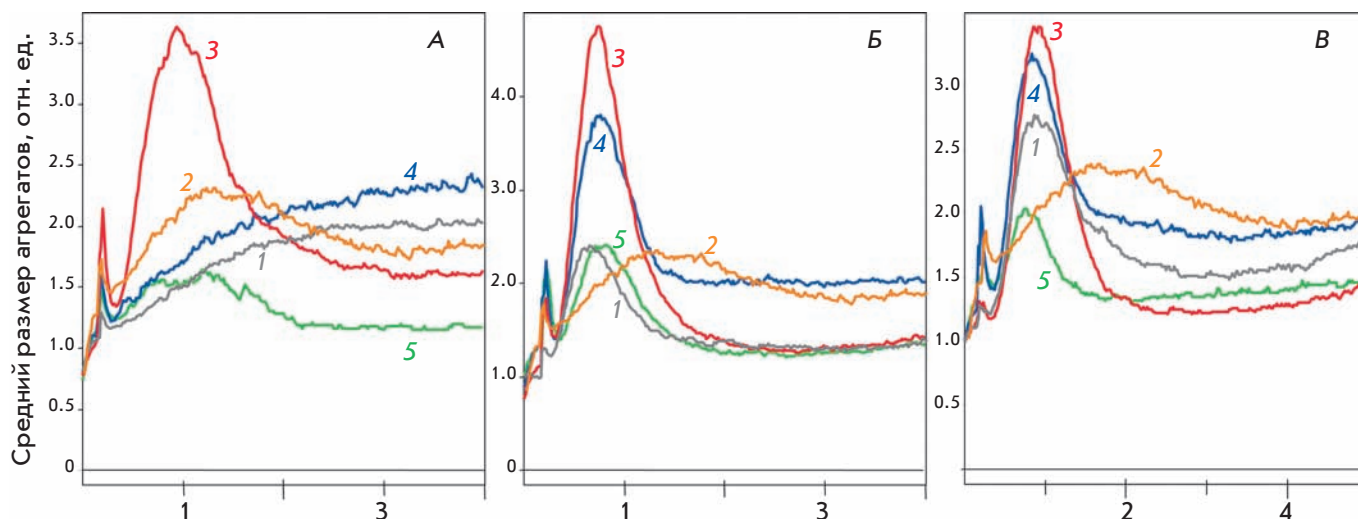


Рис. 3. Влияние КАТ и СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ (А), серотонином (Б) и TRAP (В) в присутствии H_2O_2 . А – Кривые агрегации тромбоцитов в присутствии 0.5 мкМ АДФ (1), 300 мкМ H_2O_2 (2), 0.5 мкМ АДФ и 300 мкМ H_2O_2 (3), превентивно введенных в кювету 3000 Ед КАТ и 0.5 мкМ АДФ с 300 мкМ H_2O_2 (4) и 400 Ед КАТ-активности СОД-ХС-КАТ и 0.5 мкМ АДФ 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 в кювету 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 в кювету 3000 Ед КАТ и 1 мкМ TRAP с 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 из 4–5 экспериментов.

достигая наибольших значений (существенно не изменяющихся при дальнейшем увеличении дозы в кювете агрегометра) при 3000 и 400 Ед КАТ-активности для КАТ и СОД-ХС-КАТ соответственно.

Благодаря каталазной активности производные КАТ и СОД-ХС-КАТ нивелировали действие H_2O_2 на тромбоциты (рис. 2 и 3). Вместе с тем показано, что тромбоциты сами могут генерировать активные формы кислорода [20]. С этим согласуется ингибирующее действие производных СОД-ХС-КАТ на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис. 4), когда эффект производного КАТ-ХС был весьма умеренным, а КАТ не обладала им вовсе (данные не приводятся). Биферментный конъюгат проявлял свое антиагрегатное действие как благодаря присутствию ферментативных активностей (кривые 1 и 2 на рис. 4), так и посредством своей уникальной надмолекулярной структуры, созданной с участием ХС (кривые 1 и 3 на рис. 4) [11, 17]. Действительно, сходная с СОД-ХС-КАТ по молекулярным размерам β -галактозидаза, использованная по той же схеме эксперимента в эквимолекулярных по белку концентрациях, не ингибировала индуцированную АДФ агрегацию тромбоцитов.

Действие СОД-ХС-КАТ проявлялось в ингибировании агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ,

серотонином или TRAP (индукторами с разным механизмом действия и при их разных концентрациях) (рис. 5). Это новое качество СОД-ХС-КАТ, не присущее в этих условиях его компонентам по отдельности.

Распластывание тромбоцитов на адгезивной поверхности является одной из критических стадий гомеостаза, индуцирующих каскад реакций, ведущих к формированию тромба. Адгезия и распластывание тромбоцитов происходит при их нанесении на стекло (рис. 6А). В присутствии H_2O_2 количество распластанных тромбоцитов возрастает (рис. 6Б), но при предварительном добавлении конъюгата СОД-ХС-КАТ на стекло (рис. 6В) или в ОТП (рис. 6Г) распластанные тромбоциты в образце полностью отсутствуют. Сходная картина наблюдается при нанесении ОТП с СОД-ХС-КАТ на стекло с предварительно нанесенным H_2O_2 (рис. 6Д). При добавлении ОТП с КАТ количество распластанных тромбоцитов значительно сокращалось (рис. 6Е). Заметим, что свободный ХС не проявлял антиагрегационного ингибирования против пероксида водорода. 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 – нейтрализовать H_2O_2 , ко-

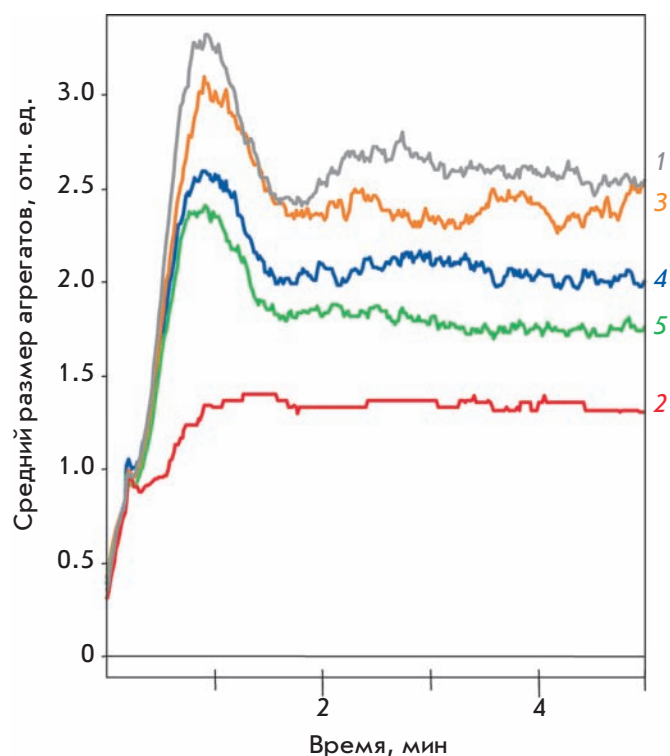


Рис. 4. Влияние производных СОД-ХС-КАТ на агрегацию тромбоцитов, индуцированную 0.5 мкМ АДП. Кривые агрегации в ответ на 0.5 мкМ АДП (1) и предварительно введенных в кювету в эквимольных концентрациях по белку, соответствующих 400 Ед КАТ-активности конъюгата СОД-ХС-КАТ: СОД-ХС-КАТ (2), СОД_{инакт.}-ХС-КАТ_{инакт.} (3), СОД-ХС-КАТ_{инакт.} (4), СОД_{инакт.}-ХС-КАТ (5). Представлены типичные кривые из 3–5 экспериментов.

торый усиливает адгезию и распластывание тромбоцитов на стекле.

Полученные результаты указывают на выраженное антиоксидантное дозозависимое действие биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ при индуцированной агрегации тромбоцитов в присутствии пероксида водорода. Антиагрегационная активность конъюгата СОД-ХС-КАТ достоверно выше таковой для других производных КАТ и проявляется в широком интервале условий при стимулировании тромбоцитарной агрегации разными по механизму действия индукторами (АДП, серотонин, ТРАР) как с пероксидом водорода, так и без него. 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 определяет перспективность его биофармацевтической разработки для целей антиоксидантной

терапии и продуктивность получения ферментных конъюгатов лечебного назначения.

Изменения тонуса кольцевого артериального фрагмента сосуда крысы

Окислительный стресс тонуса кольцевого фрагмента брюшной аорты крысы моделировали введением в инкубационный раствор пероксида водорода на фоне норадреналиновой преко́нстрикции. Последняя составляла 50–60% от максимально возможного сокращения артериального фрагмента, что позволяло фиксировать и сокращение, и расслабление. Изменение тонуса сосуда оценивалось относительно величины сокращения в ответ на 0.1 мкМ НА, взятого по величине интервала за 100% (для градации величины изменений тонуса), а по исходному уровню эксперимента — за ноль (для указания направления изменений тонуса — сокращение или расслабление). Пероксид водорода вызывал дозозависимое сокращение фрагмента сосуда. При концентрации H_2O_2 0.01 мМ наблюдалось небольшое (10–12%) увеличение тонуса, при 0.1 мМ H_2O_2 оно возрастало (48–50%) с последующим возвращением к исходному уровню НА преко́нстрикции (расслабление 0–3%). При концентрации 1.0 мМ H_2O_2 отмечалось быстрое сокращение артериального фрагмента (88–90%), которое сменялось фазой расслабления (68–70%). Таким образом, предложенная модель обнаружила дозозависимое действие пероксида водорода и оказалась пригодной для экспериментального изучения влияния АФК на тонус сосудистого фрагмента.

После трехкратной отмывки и 15-мин периода покоя фрагмент сосуда подвергался повторному воздействию НА и пероксида водорода в использованных ранее концентрациях (0.01–1.0 мМ). Уровень функциональной активности сосудистого фрагмента при повторном ответе снижался с ростом используемых концентраций пероксида водорода как в отношении второго введения НА, так и величины сокращения при повторном введении H_2O_2 (рис. 7). Достоверное уменьшение повторного сокращения артериального фрагмента на вторичное введение больших концентраций пероксида водорода служит мерой сохранности сосудистых реакций.

Введение нативной КАТ на фоне индуцированной НА преко́нстрикции не оказывало влияния на тонус сосуда в любой из использованных концентраций. Реакция на введение 1.0 мМ H_2O_2 в присутствии КАТ существенно уменьшалась в отношении сокращения и расслабления. В концентрации 1000 Ед/мл КАТ эффект 1.0 мМ H_2O_2 снижался до 16% сокращения. КАТ проявляла дозозависимое защитное действие против стимуляции сосудистого фрагмента пероксидом водорода.

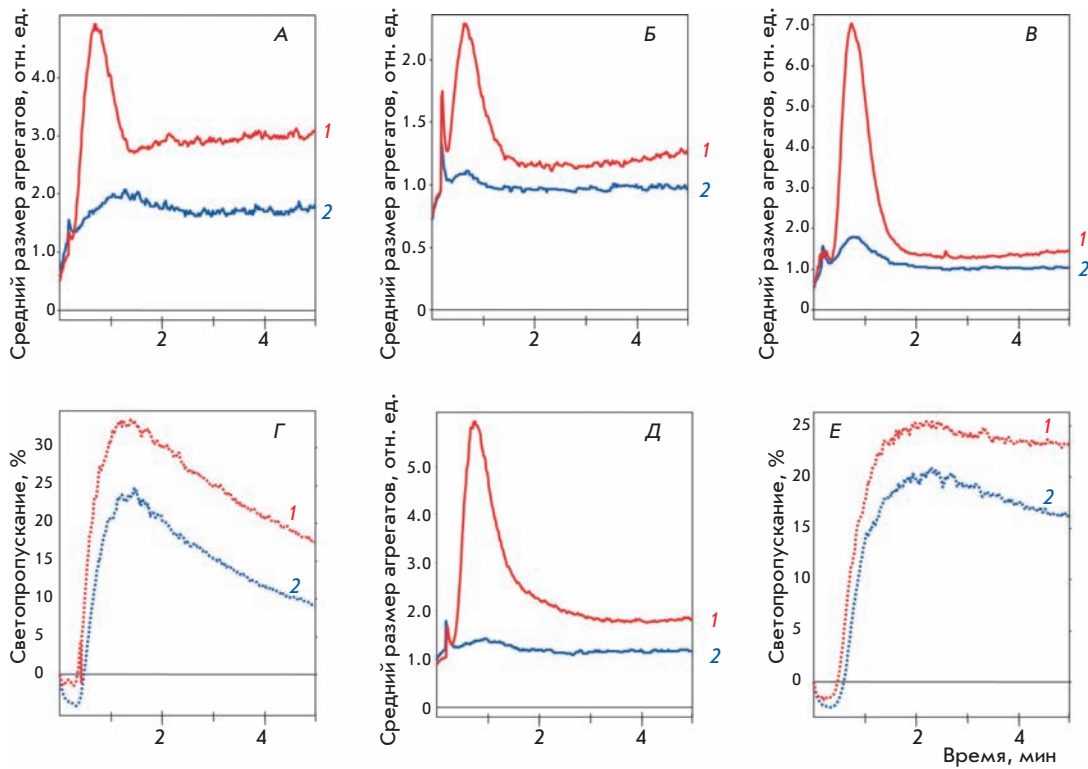


Рис. 5. Влияние биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ (400 Ед КАТ-активности в кювете, кривая 2) на агрегацию тромбоцитов, индуцированную (кривая 1): 0.5 мкМ (А) и 5.0 мкМ (Г) АДФ; 0.5 мкМ (Б) и 5.0 мкМ (Д) серотонина; 1 мкМ (В) и 6 мкМ (Е) TRAP. Представлены типичные кривые из 3–6 экспериментов. По оси ординат – средний размер агрегатов (в отн. ед., А–В, Д) или степень светопропускания (в %, Г и Е).

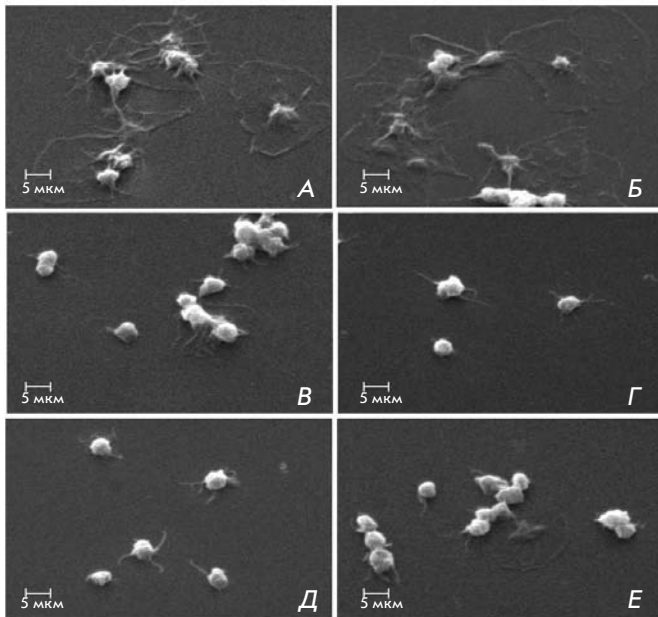


Рис. 6. Адгезия тромбоцитов на стекле. Электронные микрофотографии, полученные с помощью СЭМ PHILLIPS PSEM 550x (увеличение 2500x). Адгезия тромбоцитов на стекле с добавлением к ОТП: физиологического раствора (А), H_2O_2 (Б), СОД-ХС-КАТ (Г). Адгезия тромбоцитов на стекле, предварительно обработанном СОД-ХС-КАТ с последующим нанесением ОТП с H_2O_2 (В). Адгезия тромбоцитов на стекле, предварительно обработанном H_2O_2 с последующим нанесением ОТП с СОД-ХС-КАТ (Д) или ОТП с КАТ (Е).

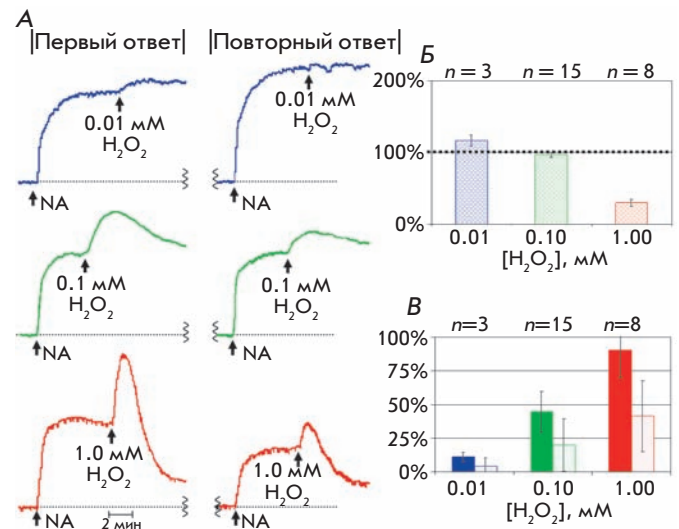


Рис. 7. Первый и повторный ответы фрагмента аорты на NA и H_2O_2 . А – Записи изменений тонуса артериального фрагмента (по оси ординат) первого и повторного ответа на NA и H_2O_2 . Б – Величина повторного ответа на норадреналин, за 100% принята величина первого ответа на ответ на NA. В – величина первого (закрашенные столбцы) и повторного (незакрашенные столбцы) сокращения, вызванного H_2O_2 в разных концентрациях.

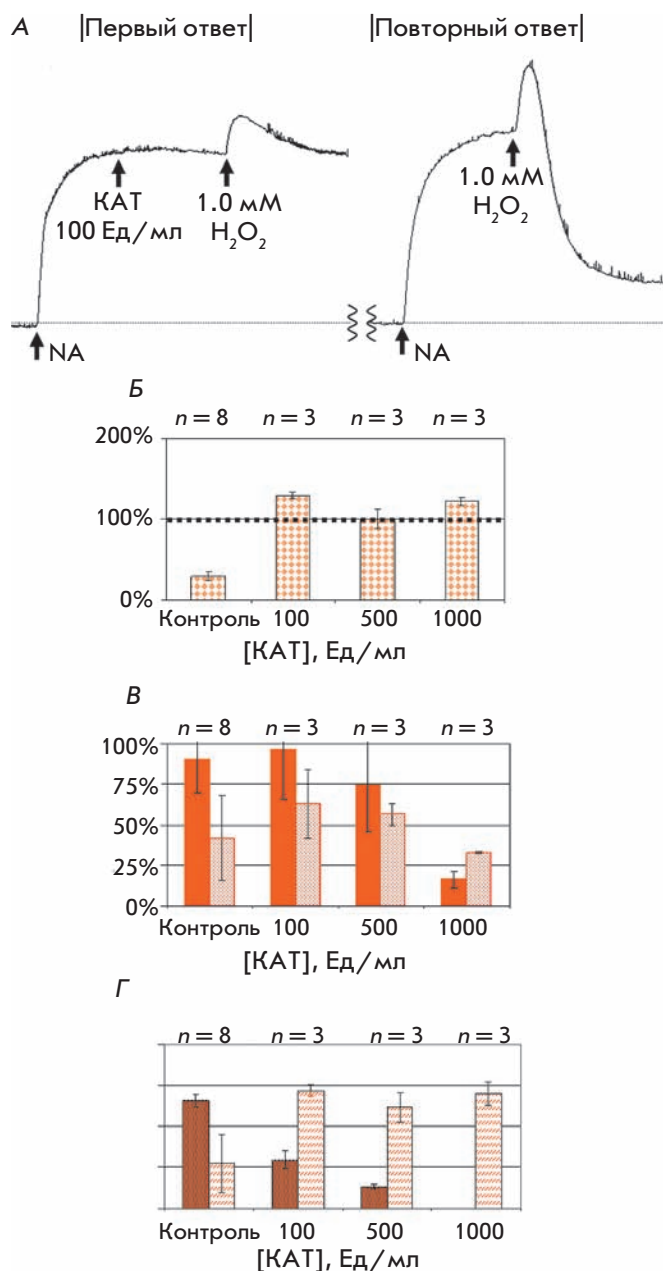


Рис. 8. Дозозависимое влияние нативной каталазы на тонус артериального фрагмента при повторном введении норадреналина и 1.0 мМ пероксида водорода. А – Записи изменений тонуса артериального фрагмента (по оси ординат). Б – Величина повторного ответа на норадреналин. За 100% принята величина первого сокращения на NA. Величина первого (закрашенные столбцы) и второго (незакрашенные столбцы) сокращения (В) и расслабления (Г) артериального фрагмента в ответ на введение 1.0 мМ H₂O₂.

Предварительная инкубация артериального фрагмента с КАТ существенно влияла на сохранность повторных ответов на NA и пероксид водорода (рис. 8). При концентрации КАТ 100 Ед/мл и выше сохранялась величина повторного ответа на NA, тогда как в отсутствие фермента она снижалась в 3–4 раза (рис. 8Б). Присутствие КАТ при первом добавлении H₂O₂ увеличивало повторный сократительный и дилатационный ответ (по сравнению с контролем), а при использовании 1000 Ед/мл КАТ – повторный ответ достоверно превосходил первый (рис. 8В и 8Г). Поскольку без КАТ сосудистые реакции на повторное действие NA и H₂O₂ заметно снижаются, защитное действие КАТ очевидно. Данные, полученные при использовании 0.1 мМ H₂O₂ для 25–500 Ед/мл КАТ, подтверждают это заключение.

Превентивный характер действия антиоксидантных средств подразумевает проявление их защитного эффекта уже при начальном превышении физиологического уровня АФК. Поэтому мы использовали 0.1 мМ H₂O₂ для оценки сравнительной эффективности защитного действия КАТ и конъюгата СОД-ХС-КАТ в нашей экспериментальной модели в тесте на сохранность функционирования сосуда (рис. 9). Производные КАТ использовались в одинаковых концентрациях по каталазной активности (Ед/мл). Нативная КАТ и конъюгат СОД-ХС-КАТ сохраняли уровень ответа на повторное введение NA (рис. 9Б), сравнимое с контрольными показателями. В концентрационном диапазоне 25–100 Ед/мл каталазной активности производные КАТ и СОД-ХС-КАТ проявляли сходный по величине защитный эффект против действия 0.1 мМ H₂O₂. При концентрации 500 Ед/мл конъюгат СОД-ХС-КАТ снижал амплитуду ответа на H₂O₂ более эффективно, чем КАТ. Выраженное защитное действие СОД-ХС-КАТ может быть связано с его сродством к сосудистой стенке (благодаря конъюгированию СОД с КАТ через гликозаминогликан эндотелиального гликокаликса ХС [11, 17]) и/или с присутствием в модельной системе СОД и эндогенного NO. Оценивать сорбцию ферментных производных в используемой системе затруднительно из-за протекания в ней сосудистых реакций не только изнутри наружу, но и снаружи внутрь сосуда (т.е. при возможности инициирующего действия стимула как на интиму, так и адвентицию сосудистой стенки) [21], а оценить защитное действие СОД в отношении NO вполне возможно.

Это действие оказалось достаточно выраженным для нативной СОД и СОД-ХС-КАТ на NA-преконстрикцию артериального фрагмента (рис. 10). Оба производных вызывали достоверное расслабление сосуда. Это предполагает, что наблюдаемая дилатация обусловлена сохранением эндогенного NO,

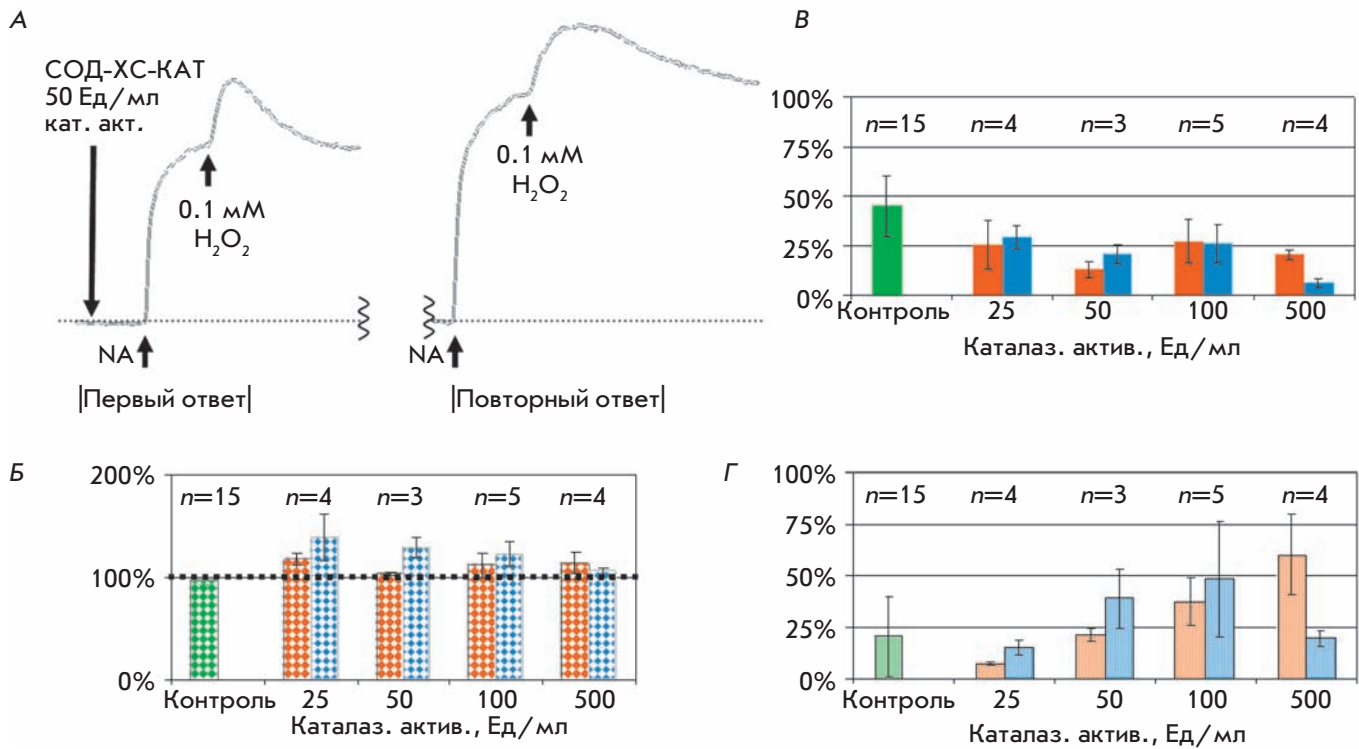


Рис. 9. Сравнение защитного действия КАТ и СОД-КС-КАТ в условиях окислительного стресса, вызванного 0.1 мМ H₂O₂. А – Запись сокращения фрагмента аорты (по оси ординат). Б – Величина повторного ответа на NA после добавления разных концентраций КАТ (коричневые столбцы) и СОД-КС-КАТ (синие столбцы), одинаковых (в сопоставляемой паре сравнения) по каталазной активности. В и Г – Сокращения фрагмента аорты при соответственно первом (В) и повторном (Г) ответах на 0.1 мМ H₂O₂ в присутствии (в первом ответе) указанных концентраций КАТ (слева в паре сравнения) и СОД-КС-КАТ (справа в паре сравнения) по каталазной активности (Ед/мл).

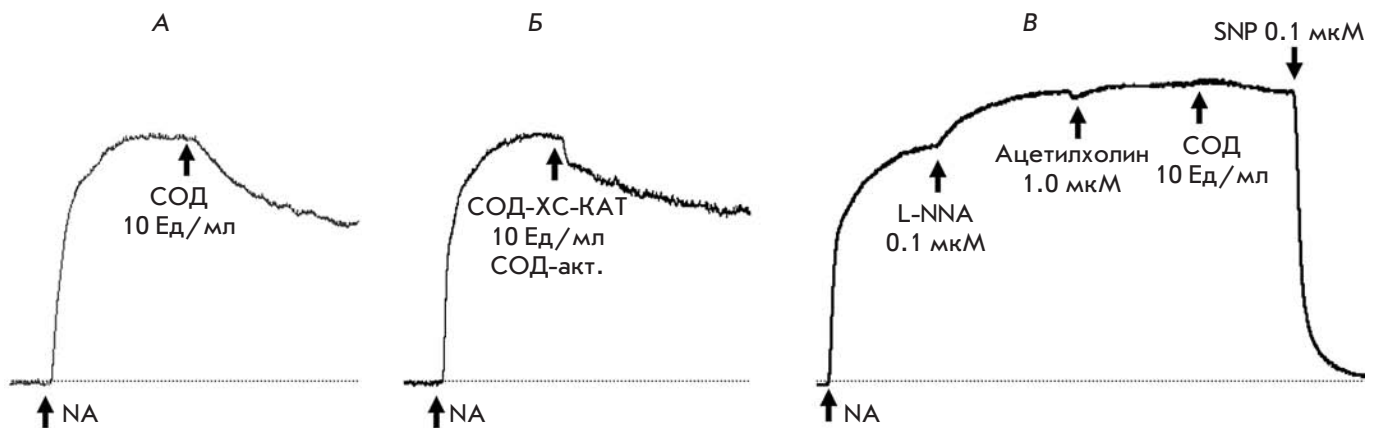


Рис. 10. Влияние СОД-активности на тонус артериального фрагмента. Записи изменений тонуса фрагмента аорты (по оси ординат) при введении 10 Ед/мл нативной СОД (А) или такой же концентрации по активности СОД конъюгата СОД-КС-КАТ (Б) на фоне норадреналиновой преко́нстрикции. В – Изменение сосудистого тонуса при введении норадреналина, N-нитро-L-аргинина (L-NNA), ацетилхолина, нативной СОД и нитропрусида натрия (SNP). Сходные кривые получены при выполнении 3–4 экспериментов.

потому что СОД нейтрализует супероксид-радикал, который способен превращать NO в пероксинитрит, не обладающий вазодилатирующими свойствами. Экспериментальным подтверждением этому является эффект ингибитора NO-синтазы, N^o-нитро-L-аргинина (L-NNA), который вызвал повышение сосудистого тонуса (рис. 10B). Этот эффект показал выраженное ингибирование активности NO-синтазы и развитие сократительного ответа из-за дефицита дилатационного влияния эндогенного NO. Введение ацетилхолина (как индуктора сосудистого расслабления посредством воздействия на эндотелиальные рецепторы, запускающие работу NO-синтазы) не давало отклика, что указывает на эффективное ингибирование NO-синтазы. На фоне L-NNA введение 10 Ед/мл СОД-активности не вызывало эффекта, что подтверждает роль эндогенного NO в наблюдаемом ранее расслаблении артериального фрагмента. Введение донора NO – нитропрусида натрия (SNP) – вызывало дилатацию (рис. 10B), т.е. сосудистый фрагмент не потерял способность расслабляться под действием NO. Увеличение биодоступности NO при использовании конъюгата СОД-ХС-КАТ (рис. 10Б), сходное по величине с эффектом нативной СОД (рис. 10А), демонстрирует эффективность вазопротекторного действия биферментного конъюгата благодаря активности его СОД-компонента.

Биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ в целом достоверно проявляет свои вазопротекторные свойства благодаря активности его обоих ферментных компонентов (СОД и КАТ), не уступая по эффективности действия нативным формам биокатализаторов. Это убедительно указывает на целесообразность биофармацевтической разработки конъюгата СОД-ХС-КАТ как лекарственного кандидата. Такой статус, конечно, требует оценки эффективности и безопасности разрабатываемого производного в системах *in vivo*.

Вазоактивность конъюгата СОД-ХС-КАТ *in vivo*

Внутривенное болюсное введение кроликам разных доз (в десятикратном диапазоне) конъюгата СОД-ХС-КАТ продемонстрировало, что показатели АД и ЧСС отклонялись не более чем на 4% от средних значений у интактных наркотизированных животных. На ЭКГ кроликов не обнаружено изменений ST-интервала, нарушений ритма, проводимости и других показателей даже при 10-кратных эффективных дозах введения конъюгата. Тестирование однократного внутрибрюшного введения СОД-ХС-КАТ мышам линии BALB/c и мышам-гибридам F1 (СВАхС57В16) обнаружило низкую острую токсичность конъюгата и отсутствие у него в тесте Эймса мутагенных свойств. Эти данные, вместе с отмечен-

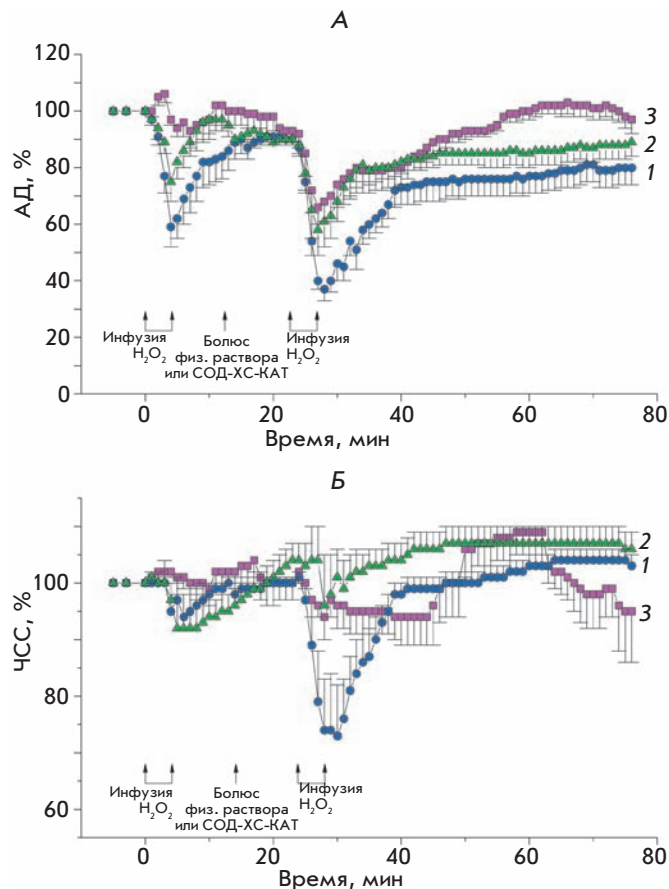


Рис. 11. Изменение АД (А) и ЧСС (Б, оба в % от исходного) у анестезированных кроликов при окислительном стрессе (инфузия 0.8% пероксида водорода) в контрольной (болюсное введение физиологического раствора, кривая 1, n = 12) и опытной (болюсное введение конъюгата СОД-ХС-КАТ, кривая 2, n = 9) группах. Кривая 3 относится к опытной профилактической группе кроликов, получавших конъюгат СОД-ХС-КАТ за 3 сут до проведения этого эксперимента с пероксидом водорода и после его первого введения (n = 6). Стрелками показаны моменты начала и окончания инфузии пероксида водорода и болюсного введения физиологического раствора или конъюгата СОД-ХС-КАТ (1.5 мг/кг).

ной выше хорошей переносимостью организмом животных конъюгата СОД-ХС-КАТ и его выраженной антитромботической активностью [11, 17], подтверждают целесообразность его дальнейшего биомедицинского изучения.

Первое введение пероксида водорода интактным кроликам (кривая 1 на рис. 11А) вызывало резкое снижение АД (до 60% от первоначального уровня), которое в течение 10 мин восстанавливалось в контрольной группе до 90% от исходного уровня. Сход-

ные изменения АД наблюдались в опытной группе (кривая 2 на рис. 11А). Интересно отметить, что профилактическое введение производного СОД-ХС-КАТ за трое суток до эксперимента с пероксидом водорода (рис. 11) достоверно предупреждало падение АД, вызывая сначала лишь его небольшие колебания, сглаживая их и удерживая в дальнейшем показатели АД около исходного уровня (кривая 3 на рис. 11А). Превентивное введение СОД-ХС-КАТ обеспечивало его профилактический эффект и в отношении ЧСС кроликов (кривая 3 на рис. 11Б) в сравнении с данными контрольной (кривая 1 на рис. 11Б) и опытной (кривая 2 на рис. 11Б) групп.

После 10-мин распределения биферментного конъюгата в организме кроликов, который не изменял показатели центральной гемодинамики, повторно (на 20-й мин) вводился пероксид водорода в той же дозе и с той же скоростью. Его вторая инфузия вызывала более глубокие изменения АД и ЧСС (рис. 11). В ходе восстановления АД наблюдались две стадии: быстрая, в течение первых 5 мин, и медленная.

В опытной группе после введения производного СОД-ХС-КАТ реакция АД и ЧСС на вторую повреждающую дозу пероксида водорода была достоверно меньше, а восстановление быстрее, чем в контрольной группе (рис. 11).

ЭКГ у кроликов после первого введения пероксида водорода существенно не изменялась, хотя в контрольной группе наблюдалось некоторое снижение ST-сегмента. При повторном введении пероксида водорода отмечались наибольшие подъемы ST-интервала, особенно при затрудненном дыхании у кроликов. На 5–8 мин наблюдалась желудочковая экстрасистолия с одиночными или групповыми экстрасистолами. Если одышка отмечалась у кроликов уже после первого введения пероксида водорода, то при повторном введении наблюдалось затрудненное дыхание, бронхоспазмы, более выраженные в контрольной группе.

Первое введение пероксида водорода крысам вызывало первоначальное кратковременное (не более 1 мин) повышение АД на 3–5% с его последующим снижением на 15% и полным восстановлением в течение 10 мин (рис. 12А). В этих условиях ЧСС снижалась на 3–5% и в течение 10 мин восстанавливалась до уровня 96–98% (кривые 1 и 2 на рис. 12Б). Введение производного СОД-ХС-КАТ не изменяло параметры гемодинамики и ЭКГ у крыс. После распределения в организме в течение 10 мин биферментного конъюгата крысам повторно вводили пероксид водорода. Наблюдались более резкие (по сравнению с первой инфузией) изменения АД и ЧСС. Снижение АД доходило до 52% уровня в контрольной группе и до 73% уровня в опытной груп-

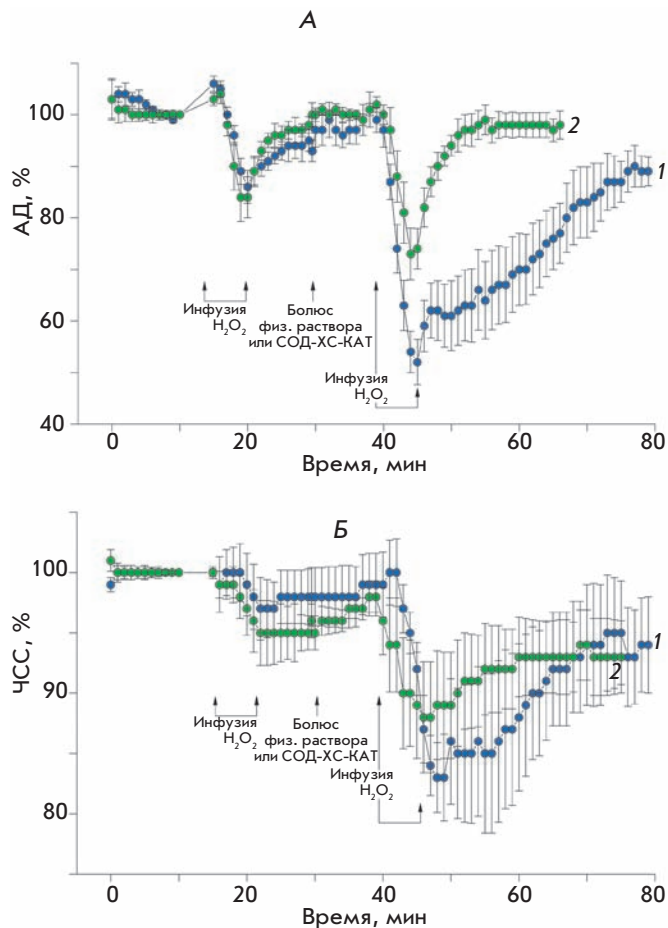


Рис. 12. Изменение АД (А) и ЧСС (Б, оба в % от исходного значения) у анестезированных крыс. Стрелками показаны моменты начала и окончания внутривенной инфузии 0.8% пероксида водорода (окислительный стресс) и болюсного введения физиологического раствора ($n = 6$, контрольная группа, кривая 1) или конъюгата СОД-ХС-КАТ ($n = 7$, опытная группа, кривая 2).

пе (кривые 1 и 2 соответственно, $p < 0.05$, рис. 12А). В контроле восстановление АД было значительно медленнее. Статистически значимое различие в восстановлении АД в опытной и контрольной группах наблюдались уже с первых минут.

Форма сигнала ЭКГ крыс в период эксперимента существенно не менялась, хотя количество отдельных желудочковых экстрасистол возрастало в обеих группах животных, особенно при повторном введении пероксида водорода.

Итак, биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ обладал достоверной способностью предупреждать изменения гемодинамики, вызываемые пероксидом водорода, у двух видов животных. Конъюгат СОД-ХС-КАТ успешно противодействовал прямому влия-

нию пероксида водорода на гладкомышечные и сердечные клетки [22], вероятно, за счет нейтрализации как супероксид-радикала, так и пероксида водорода. Действие СОД-ХС-КАТ достоверно проявлялось перед повторным введением пероксида водорода, когда антиоксидантная защита организма была уже ослаблена первым введением H_2O_2 .

Профилактический эффект конъюгата СОД-ХС-КАТ был выражен гораздо сильнее у тех кроликов, которым вводили высокие дозы конъюгата за 3 дня до острого опыта. При этом полностью предотвращалось снижение АД и ЧСС в ответ на первое введение пероксида водорода. Это наилучший антиоксидантный эффект по сравнению с другими исследованными в нашей работе случаями. Вероятно, превентивно введенный конъюгат мог напрямую и/или опосредованно обеспечивать успешное противодействие острому эффекту пероксида водорода. Значение каталазной активности подтверждается также необходимостью ее присутствия при опытной терапии лецитинизированной СОД мышей с индуцированным блеомицином легочным фиброзом [23]. На колоколообразной кривой дозозависимости эффекта лечебное действие лецитинизированной СОД (в области ее высоких доз) восстанавливалось дополнительным введением КАТ, устраняющим накопление пероксида водорода. Присутствие в биферментном конъюгате сопряженных друг с другом супероксиддисмутазной и каталазной активностей оптимизировало его антитромботическое действие [9, 17] и обеспечивало безопасную нормализацию АД и ЧСС при возмущающем эффекте пероксида водорода (рис. 11 и 12). Отмеченная в других исследованиях эффективность перорального [24] и ингаляционного [23] применения модифицированной формы СОД указывает на актуальность разработки пероральных форм СОД-ХС-КАТ для профилактических потребностей антиоксидантной терапии [25].

ВЫВОДЫ

Данные настоящего исследования показывают реальную возможность получения надмолекулярных ферментных конъюгатов, потенциально эффективных и безопасных для целей практической медицины. Ковалентное сшивание ферментных субъединиц обеспечивает взаимную стабилизацию активности биокатализаторов. Рост молекулярной массы получаемого при этом конъюгата (по сравнению с исходными белковыми компонентами) и включение в его

состав хондроитинсульфата – гликозаминогликана эндотелиального гликокаликса – способствует вазопротекторной активности производного СОД-ХС-КАТ у люминальной поверхности сосудистой стенки. Лечебный эффект экспериментальной терапии конъюгатом СОД-ХС-КАТ определяется ковалентным сопряжением супероксиддисмутазной и каталазной активностей биокатализаторов, способствующим их комбинированному каталитическому действию с образованием безопасных конечных продуктов ферментативного превращения. Возникающая надмолекулярная структура биферментного наноконъюгата обуславливает появление у него нового качества – антиагрегационной активности при индуцированной агрегации тромбоцитов. Активность компонентов СОД-ХС-КАТ проявляется на высоком уровне: влияние супероксиддисмутазной и каталазной активностей конъюгата на тонус сосудистого фрагмента сходно с таковым у нативных ферментов; заметен вклад в антиагрегационный эффект конъюгата хондроитинсульфата. Отмеченные свойства определяют наибольшее антиоксидантное действие конъюгата СОД-ХС-КАТ среди различных сочетаний его компонентов. Хорошая переносимость организмом производного СОД-ХС-КАТ, его удовлетворительная острая токсичность, нормализующее действие на показатели гемодинамики при окислительном стрессе, выраженный профилактический эффект делают биферментный конъюгат перспективным лекарственным кандидатом. Представленные исследования иллюстрируют новый путь разработки ферментных конъюгатов медицинского назначения. ●

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» по направлениям «Биокаталитические технологии для химического синтеза, аналитических систем и медицины» и «Разработка средств и методов диагностики и лечения больных ишемической болезнью сердца», грантами РФФИ 06-08-00011, 06-04-08002-офи, 09-08-00023, Росздравом, Росмедтехнологий, а также Минздравсоцразвития России. Авторы выражают искреннюю благодарность за внимание и поддержку настоящего исследования академику Е.И. Чазову, чл.-корр. РАН В.Н. Смирнову, чл.-корр. РАМН В.В. Кухарчуку и профессору С.А. Бойцову.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marder V.J., Sherry S. // *New Engl. J. Med.* 1988. V. 318. P. 1512–1520.
2. Anderson A.V., Willerson J.T. // *New Engl. J. Med.* 1993. V. 329. P. 703–709.
3. Максименко А.В. // *Мол. биол.* 1995. Т. 29. № 1. С. 38–60.
4. Collen D., Lijnen H.R. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009. V. 29. P. 1151–1155.
5. Ishihara T., Tanaka K., Tasaka Y., Namba T., Suzuki J., Ishihara T., Okamoto S., Hibi T., Takenaga M., Igarashi R., Sato K., Mizushima Y., Mizushima T. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009. V. 328. P. 152–164.
6. Taylor J.K., Gardner T.B., Waljee A.K., Dinagno M.J., Schoenfeld P.S. // *Aliment. Pharmacol.* 2010. V. 31. P. 57–72.
7. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
8. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. М.: Медицинская пресса, 2006. 400 с.
9. Максименко А.В. // *Хим.-фарм. журн.* 2007. Т. 41. № 5. С. 3–12.
10. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
11. Maksimenko A.V. // *Curr. Pharm. Design.* 2005. V. 11. P. 2007–2016.
12. Wight T.N., Merrilees M.J. // *Circ. Res.* 2004. V. 94. P. 1158–1167.
13. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. С. 1353–1363.
14. Murthy M.R.N., Reid T.J.III, Sicignano A., Tanaka N., Rossmann M.G. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 152. P. 465–499.
15. Tainer J.A., Getroff E.D., Beem K.M., Richardson J.S., Richardson D.C. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 160. P. 181–217.
16. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. № 10. С. 1364–1368.
17. Maksimenko A.V., Golubykh V.L., Tischenko E.G. // *J. Pharmacy Pharmacol.* 2004. V. 56. P. 1463–1468.
18. Ваваев А.В., Тищенко Е.Г., Мох В.П., Максименко А.В. // *Технол. жив. систем.* 2009. Т. 6. № 3. С. 26–32.
19. Halliwell B., Clement M.V., Long L.H. // *FEBS Lett.* 2000. V. 486. P. 10–13.
20. Krotz F., Sohn H.-Y., Pohl U. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. V. 24. P. 1988–1996.
21. Maiellaro K., Taylor W.R. // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 75. P. 640–648.
22. Капелько В.И. // *Рос. физиол. журн.* 2004. Т. 62. № 10. С. 1364–1368.
23. Tanaka K.I., Ishichera T., Azuma A., Kudoh S., Ebina M., Nukiwa T., Sugiyama Y., Tasaka Y., Namba T., Ishihara T., Sato K., Mizushima Y., Mizushima T. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010. V. 298. P. L348–L360.
24. Suzuki Y., Matsumoto T., Okamoto S., Hibi T. // *Colorectal Dis.* 2008. V. 10. P. 931–934.
25. Максименко А.В., Ваваев А.В. // *Мол. мед.* 2010. № 2. С. 9–14.