



УДК 615.355:577.152.34.042

СОЧЕТАННЫЙ ТРОМБОЛИЗИС ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИ РАЗЛИЧИМЫМИ АКТИВАТОРАМИ ПЛАЗМИНОГЕНА

© 1998 г. А. В. Максименко*

*Институт экспериментальной кардиологии**Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗМП РФ, Москва*

Поступила в редакцию 09.07.97 г. Принята к печати 18.12.97 г.

Показана перспективность поиска тромболитических композиций на основе коротко- и долгодействующих активаторов плазминогена – потенциальных эффективных средств скорой тромболитической помощи на догоспитальном этапе лечения. Предлагается использовать в этих целях сочетанный протеолиз активаторами плазминогена с взаимодополняющим механизмом действия и существенно различающимся фармакокинетическим профилем.

Ключевые слова: активаторы плазминогена, урокиназа, тканевый активатор плазминогена, модификация тромболитиков, сочетанный тромболитизис.

Среди протеолитических препаратов терапевтического назначения по медицинской значимости следует выделить активаторы плазминогена. Активаторами плазминогена человеческого происхождения являются урокиназа/проурокиназа и тканевый активатор плазминогена. В кровотоке благодаря их действию из плазминогена образуется плазмин, который катализирует гидролиз фибрина, способствуя растворению тромбов. Под действием плазмина устраняется одна из основных причин острых сердечно-сосудистых поражений – тромбоз (рис. 1). Подобное опосредованное тромболитическое действие экзогенных активаторов плазминогена обуславливает их широкое клиническое применение в качестве тромболитических средств. При этом используют болюсное (осуществляемое в течение короткого промежутка времени – 1–5 мин) и инфузионное (длительное) введение препаратов.

КОНЬЮГАТ УРОКИНАЗА–ФИБРИНОГЕН

Урокиназу отличает короткое время пребывания в кровотоке ($t_{1/2} \sim 15\text{--}20$ мин) и отсутствие заметного сродства к фибрину [1–3]. По этим причинам клинически она применяется путем болюс-инфузионного введения в значительных дозах [2, 3], что чревато появлением осложнений [1]. Повышение эффективности тромболитической тера-

пии связано с разработкой препаратов активаторов плазминогена нового поколения [4–6], получаемых с использованием методов химического и биологического (с использованием клеток) синтеза [3, 7–9]. Ранее мы конъюгировали урокиназу с фибриногеном (Fbg) [10]. Полученный конъюгат (УК–Fbg) проявлял более выраженный тромболитический эффект *in vivo* в сравнении с действием нативного фермента (рис. 2), умеренно влиял на системную активацию фибринолиза и увеличивал время пребывания в кровотоке (рис. 3) [11]. По результатам сравнительного изучения свойств урокиназы и конъюгата УК–Fbg ожидалось снижение терапевтических доз последнего и повышение безопасности тромболитизиса этим агентом [11].

ТКАНЕВЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА – ТРИГГЕР ТРОМБОЛИЗИСА

Другой тромболитик – тканевый активатор плазминогена (t-PA) также обладает коротким временем пребывания в кровотоке ($t_{1/2} \sim 4\text{--}8$ мин) [1–3], но имеет значительное сродство ($K_d \sim 0.14\text{--}1.40$ мкМ) к фибрину [12]. Фибрин служит для него эффекторной поверхностью, способствующей увеличению эффективности каталитического действия t-PA на 1–2 порядка (рис. 4) [3, 12]. В клинической практике обычно используют болюс-инфузионное введение 100 мг t-PA в течение 90 [2, 3, 13] или 180 мин [1]. Имеются сведения, что t-PA производит триггерное тромболитическое действие [14] на поверхности сгустка, экспонируя на лизирующемся фибрине центры связы-

Сокращения: t-PA – тканевый активатор плазминогена, УК–Fbg – ковалентный конъюгат урокиназа–фибриноген.
* Тел.: (095) 414-67-30, факс: (095) 415-29-62, e-mail: csc@adonis.ias.msk.su.

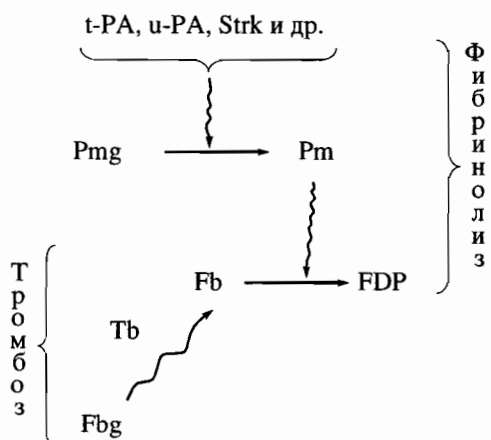


Рис. 1. Упрощенная схема фибринолитических превращений при активации плазминогена его активаторами. Обозначения: t-PA и u-PA – активаторы плазминогена тканевого и урокиназного типа, Strk – стрептокиназа, Pmg – плазминоген, Pm – плазмин, Fbg – фибриноген, Fb – фибрин, FDP – продукты деградации фибрина, Tb – тромбин.

вания плазминогена второго типа [15, 16]. На них сорбируются активаторы плазминогена и плазминоген [17, 18], который предположительно более пригоден для активации активаторами плазминогена именно урокиназного типа. Таким образом, взаимодополняющая активность этих активаторов плазминогена способствует эффективному тромболитическому процессу (рис. 5) [19, 20]. Эти данные, хотя и могут оказаться не вполне исчерпывающими, указывают, в частности, на разный и комплементарный механизм действия активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типов на фибриновой поверхности [18, 21]. Возможно, взаимоусиленное и взаимодополняющее действие эндогенных t-PA и проурокиназы/урокиназы в организме оказывается причиной самопроизвольного/спонтанного тромболитического процесса.

БЫСТРОДЕЙСТВИЕ СОЧЕТАНИЯ t-PA И КОНЬЮГАТА UK-Fbg

С целью использования взаимодополняющего действия активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типов мы применили комбинированное введение t-PA и конъюгата UK-Fbg на модели венозного тромбоза у собак [22]. Болюс-инфузия-болюсное введение тромболитиков показало быстрое действие названного сочетания препаратов, что очень важно для успешного тромболитического процесса. При этом тромболитический эффект сочетания значительно превосходил действие таких же доз его компонентов, введенных по отдельности (рис. 6). При составлении данной комбинации тромболитиков t-PA отводилась роль триггера тромболитического процесса, а конъюгату UK-

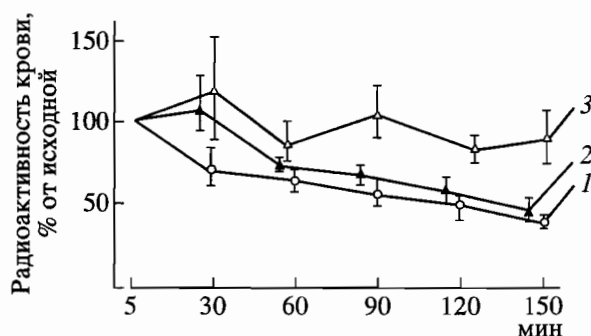


Рис. 2. Динамика деструкции радиоактивно меченного тромба в бедренной артерии собак после внутривенного болюсного введения физиологического раствора (1), 25 000 IU нативной урокиназы (2), 5000 IU конъюгата UK-Fbg (3). IU – международная единица фибринолитической активности.

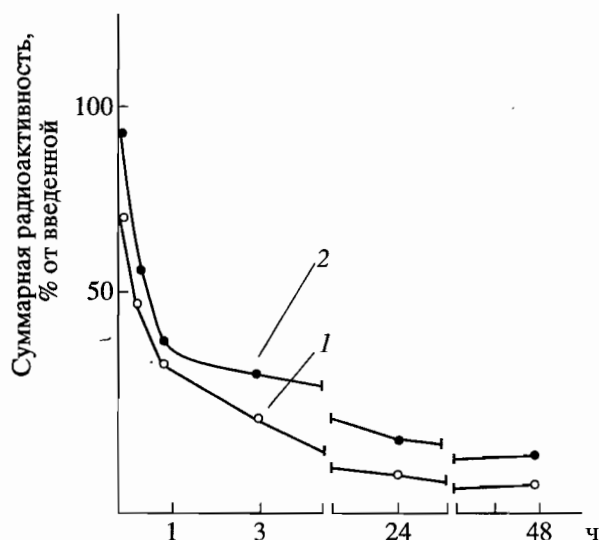


Рис. 3. Фармакокинетическое биораспределение радиоактивно меченных препаратов (в % от введенной дозы) нативной урокиназы (1) и конъюгата UK-Fbg (2) после внутривенного введения мышам (суммарно по всем исследуемым органам (печень, почки и др.) и крови).

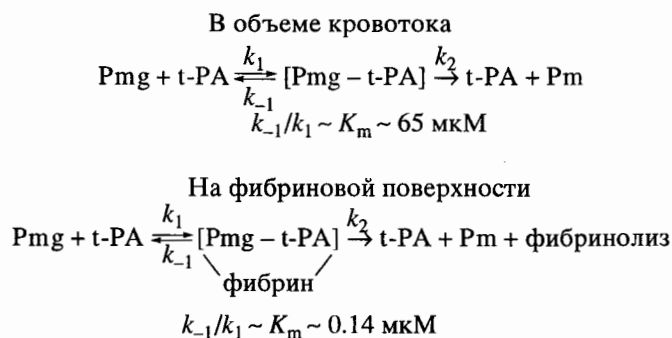


Рис. 4. Эффекторное влияние фибриновой поверхности на активацию плазминогена тканевым активатором (t-PA).

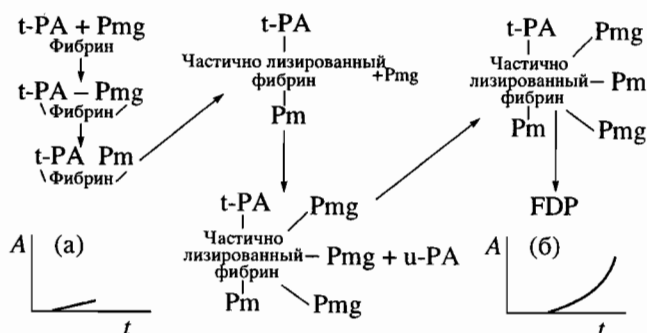


Рис. 5. Предположительная схема взаимодополняющего фибринолитического действия t-PA и урокиназы при деструкции фибринового сгустка. Слева: совместная сорбция t-PA и пламиногена на интактном фибрине приводит к образованию тройного комплекса, в котором пламиноген эффективно превращается в плазмин под действием t-PA. Благодаря этому инициируется фибринолиз, характеризуемый низкой начальной скоростью деструкции фибринового сгустка и наличием лаг-фазы (а) в ходе процесса. В центре рисунка: на частично деградированном фибриновом сгустке экспонируются центры связывания пламиногена второго типа, средство пламиногена к которым выше, чем к центрам интактного сгустка. При лизисе фибрин насыщается пламиногеном, который активируется предпочтительнее урокиназой (u-PA), чем t-PA. Справа: благодаря совместному действию t-PA и u-PA резко ускоряется фибринолиз (б), вызывая эффективный лизис сгустка с образованием продуктов деградации фибрин(оген)а.

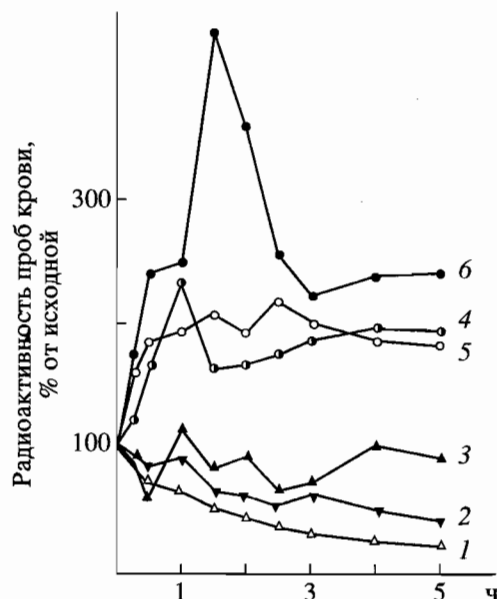


Рис. 6. Тромболизис радиоактивно меченного фибринового сгустка в бедренной артерии собак, определенный по присутствию радиоактивности в пробах крови после введения: 1 – изотонического раствора хлористого натрия; 2 – болюсно 2.5 мг t-PA; 3 – болюсно 250000 IU конъюгата UK-Fbg; 4 – болюсно 1 мг t-PA, инфузионно 1 мг t-PA и болюсно 250000 IU конъюгата UK-Fbg; 5 – болюсно 2.5 мг t-PA и болюсно 250000 IU конъюгата UK-Fbg; 6 – болюсно 2.5 мг t-PA и инфузионно 7.5 мг t-PA.

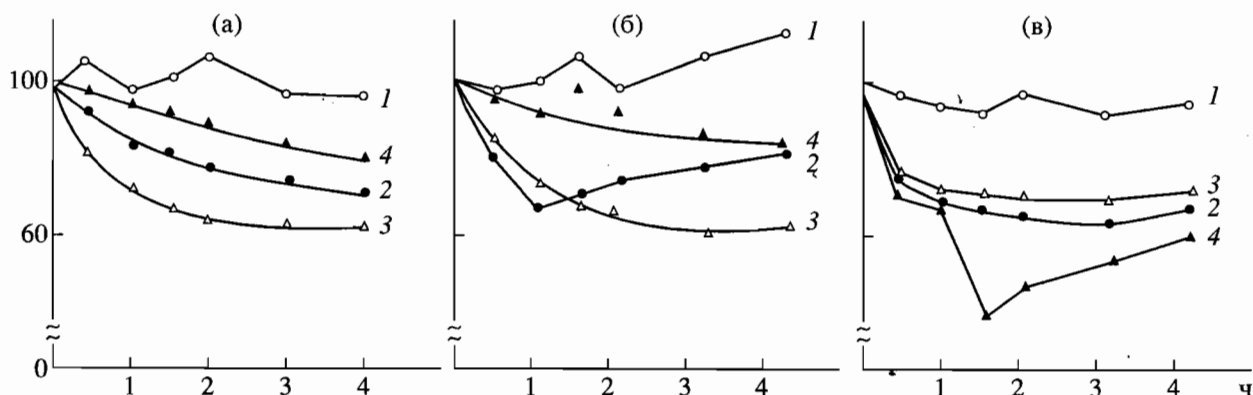


Рис. 7. Содержание в крови собак фибриногена (а), пламиногена (б), альфа-2-антиплазмина (в) при экспериментальном венозном тромболизисе после введения болюсно изотонического раствора (1), болюсно 1 мг t-PA, инфузионно 1 мг t-PA и болюсно 250000 IU конъюгата UK-Fbg (2), болюсно 2.5 мг t-PA и болюсно 250 000 IU конъюгата UK-Fbg (3), болюсно 2.5 мг t-PA и инфузионно 7.5 мг t-PA (4).

Fbg – роль поддерживающего тромболизис агента пролонгированного действия [22]. Таким образом, комбинированное применение этих препаратов оказалось весьма перспективным для повышения эффективности тромболизиса.

Последовательный двойной болюс t-PA и конъюгата UK-Fbg (болюсно 2.5 мг t-PA и через 15 мин болюсно 250000 IU конъюгата UK-Fbg)

был логическим шагом в упрощении схемы введения этой комбинации тромболитиков. Оказалось, что ее быстрое действие *in vivo* превосходило эффект болюс-инфузия-болюсного введения такого же сочетания (рис. 6) [23]. При этом наблюдается лишь умеренное системное истощение уровня содержания гемостатических белков крови, не превосходящее 40%-ного снижения от исходного уровня фибриногена, пламиногена и

альфа-2-антиплазмина (рис. 7). Последнее весьма интересно и значимо.

В клинических испытаниях было показано [24], что в ходе комбинированной тромболитической терапии острого инфаркта миокарда частота реокклюзий (повторных закупорок сосуда после успешного тромболитического лечения), скорее, обусловлена системным гематостатическим фактором, чем остаточным поражением сосуда после тромболитического лечения. Сочетанная тромболитическая терапия t-PA и урокиназой продемонстрировала преимущество именно в снижении частоты реокклюзий по сравнению с монотерапией (3% против 13 и 9% для t-PA и урокиназы соответственно) [24]. Возможно, реализация указанного подхода будет способствовать систематическому снижению частоты осложнений при тромболитическом лечении. Конечно, переход к использованию таких более агрессивных схем введения тромболитиков следует проводить осмотрительно, поскольку иногда сочетание действия фибринолитического (как t-PA) и фибринолитического (как стрептокиназа) активаторов плазминогена повышало частоту фатальных геморрагических осложнений [25]. Однако при всей осторожности составления протокола и проведения клинических исследований нельзя не видеть перспективности развития приемов комбинированного лечения, способствующего оказанию скорой терапевтической помощи или самопомощи пациентам с острыми сердечно-сосудистыми поражениями.

Обычно схема введения большинства тромболитических препаратов отличается сложностью, громоздкостью и продолжительностью [26]. Использование композиций/смесей из активаторов плазминогена с разным фармакокинетическим поведением (коротким и пролонгированным) и взаимодополняющим тромболитическим действием может оказаться полезным как для упрощения способа введения лекарства, так и для достижения триггерного и поддерживающего тромболитического эффекта композиции (рис. 8) после ее однократного болюсного введения в кровоток. Суммарный фармакокинетический эффект этого сочетания, вероятно, может обеспечить требуемое длительное и сбалансированное фибринолитическое воздействие после единственной внутривенной инъекции. Такой подход является логическим этапом разработки высокоэффективных тромболитических средств скорой догоспитальной помощи с упрощенной схемой введения [1, 3–9, 26].

Можно полагать, что разработка тромболитических композиций/смесей на основе взаимодополняющего действия активаторов плазминогена с существенно различающимся фармакокинетическим профилем составит одно из актуальных направлений будущих исследований. В XXI веке тромболитические композиции, вероятно, могут

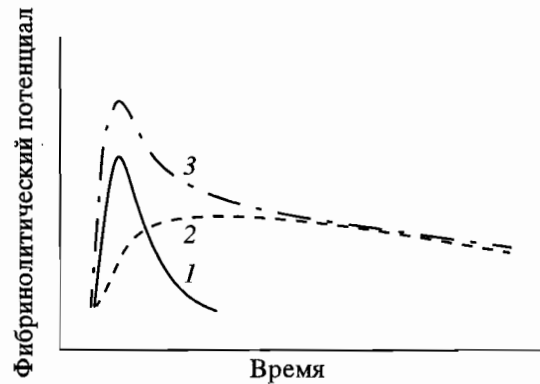


Рис. 8. Схематическое представление фармакокинетики фибринолитического потенциала болюсно введенных: t-PA (1), конъюгата UK-Fbg (2), сочетания/смеси t-PA и конъюгата UK-Fbg (3). Фармакокинетический профиль сочетания представлен исходя из данных об аддитивности действия его компонентов [23].

стать одним из основных и распространенных средств лечения тромбоэмболической болезни.

Данная работа частично финансировалась из средств Государственной научно-технической программы 08.05 "Новейшие методы биоинженерии", направление "Инженерная энзимология" (гранты 4-85 и 2-36) и Министерством здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marder V.J., Sherry S. // *New Engl. J. Med.* 1988. V. 318. P. 1512–1520, 1585–1595.
2. Anderson H.V., Willerson J.T. // *New Engl. J. Med.* 1993. V. 329. P. 703–709.
3. Максименко А.В. // *Молекуляр. биология.* 1995. Т. 29. С. 38–60.
4. Haber E., Quertermous T., Matsueda G.R., Runge M.S. // *Science.* 1989. V. 243. P. 51–56.
5. Becker R.C. // *Cardiovasc. Drug Ther.* 1993. V. 7. P. 825–828.
6. Collen D. // *Circulation.* 1996. V. 93. P. 857–865.
7. Dewerchin M., Collen D. // *Bioconjug. Chem.* 1991. V. 2. P. 293–300.
8. Максименко А.В. // *Хим.-фармацевт. журн.* 1994. Т. 28. С. 4–11.
9. Hayzer D.J., Lubin I.M., Runge M.S. // *Bioconjug. Chem.* 1991. V. 2. P. 301–308.
10. Maksimenko A.V., Torchilin V.P. // *Thromb. Res.* 1985. V. 38. P. 289–295.
11. Maksimenko A.V., Samarenko M.B., Petrov A.D., Tischenko E.G., Ruda M.Ya., Torchilin V.P. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990. V. 613. P. 479–482.
12. Hoylaerts M., Rijken D.C., Lijnen H.R., Collen D. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 2912–2919.

13. Neuhaus K.L., Feuerer W., Jeep-Tebbe S., Niederer W., Vogt A., Tebbe U. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1989. V. 14. P. 1566–1569.
14. Collen D., Stassen J., De Cock F. // *Thromb. Haemostas.* 1987. V. 58. P. 943–946.
15. Fleury V., Loyau S., Lijnen H.R., Nieuwenhuizen W., Angles-Cano E. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 216. P. 549–556.
16. Grailhe P., Nieuwenhuizen W., Angles-Cano E. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 219. P. 961–967.
17. Sakharov D.V., Rijken D.C. // *Circulation.* 1995. V. 92. P. 1883–1890.
18. Sakharov D.V., Nagelkerke J.F., Rijken D.C. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 2133–2138.
19. Pannel R., Black J., Gurevich V. // *J. Clin. Invest.* 1988. V. 81. P. 853–859.
20. Gurevich V. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1987. V. 10. P. 16B–21B.
21. Максименко А.В. // *Хим.-фармацевт. журн.* 1994. Т. 28. С. 3–13.
22. Максименко А.В., Тищенко Е.Г., Петрова М.Л., Голубых В.Л. // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1996. Т. 21. С. 48–51.
23. Максименко А.В., Тищенко Е.Г., Голубых В.Л. // Тезисы докладов и стендовых сообщений. IV симпозиум “Химия протеолитических ферментов”. М., 1997. С. 137 (абстракт П.40).
24. Popma J.J., Califf R.M., Ellis S.G., George B.S., Kereiakes D.J., Samaha J.K., Worley S.J., Anderson J.L., Stump D., Woodlief L., Sigmon K., Wall T.C., Topol E.J. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992. V. 20. P. 1305–1312.
25. Van de Werf F. // *Haemostasis.* 1994. V. 24. P. 65–68.
26. Maksimenko A.V. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996. V. 799. P. 139–145.

Combined Thrombolysis by Pharmacokinetically Different Plasminogen Activators

A. V. Maksimenko*

Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiological Research and Production Center, Ministry of Health and Medical Industry of the Russian Federation, Moscow, Russia

Prospects for the search for thrombolytic compositions on the basis of short-term and long-term acting plasminogen activators were shown. These will be useful as potential ambulance remedies for effective prehospital treatment. Combined proteolysis by plasminogen activators with complementary action mechanisms and significantly different pharmacokinetic behavior was suggested for this purpose.

Key words: plasminogen activators, urokinase, tissue-type plasminogen activator, modification of thrombolytics, combined thrombolysis

* Phone: +7 (095) 414-6730; fax: 7 (095) 415-2962; e-mail: csc@adonis.ias.msk.su.