

ТРОМБОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СУБТИЛИЗИНОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Светлана Владимировна МИШЕНИНА¹, Константин Игоревич ЕРШОВ^{1,2},
Павел Геннадьевич МАДОНОВ^{1,2}, Герман Игоревич БАЙКАЛОВ¹

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

² ООО «Саентифик Фьючер Менеджмент»
630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, ул. Технопарковая, 10

Представлены материалы по экспериментальному изучению тромболитического действия лекарственного препарата на основе субтилизина. В экспериментах *in vitro* показано прямое тромболитическое действие с описанием кинетики тромболитического действия. Установлено, что тромболитическое действие препаратом происходит послойно снаружи внутрь без образования крупных агрегатов; его протеиназы эффективно лизируют 1-, 2- и 24-часовые тромбы и уменьшают их массу в 8 раз: свежие тромбы за 90 мин, суточные – за 135 мин. В экспериментах *in vivo* на модели венозного тромбоза показана эффективность препарата по устранению тромбоза и восстановлению кровотока в бассейне тромботической окклюзии.

Ключевые слова: венозный тромбоз, тромболитическое действие, субтилизин.

Наряду со значительными успехами применения антикоагулянтной и антиагрегантной терапии тромботических заболеваний вопрос об эффективной и безопасной тромболитической терапии остается до конца не решенным. В настоящее время в мировой научной литературе много внимания уделяется потенциальным возможностям протеолитических ферментов субтилизинов в качестве тромболитических лекарственных препаратов [4, 5]. Между тем на фармацевтическом рынке присутствует только один лекарственный препарат с прямым тромболитическим действием – тромбовазим, созданный на основе субтилизина. В нескольких публикациях представлена его клиническая эффективность [2, 3, 6]. Фибринолитическое действие тромбовазима на этапе доклинического исследования показано только на модели тромбоза сонных артерий, индуцированного аппликацией хлорного железа [1]. В течение последних пяти лет появились публикации о новых возможностях

экспериментального моделирования тромбозов [7–11]. Эти модели можно рассматривать в качестве экспериментального материала по оценке фармакодинамических свойств тромболитиков. Одним из наиболее удобных в экспериментальной работе нам представляется тромбоз, индуцированный к-карагинаном [12]. После инъекции к-карагинана в основание хвоста лабораторных животных изменяются системные коагуляционные параметры крови – снижается протромбиновое и частично активированное тромбoplastиновое время, возрастает количество фибриногена и увеличивается протромбиновая активность, формируется тромбоз в хвостовых венах и артериях.

Наряду с исследованием *in vivo* авторами проведен эксперимент *in vitro* по демонстрации прямого тромболитического действия тромбовазима и подтверждено отсутствие воздействия лекарственного препарата на основе субтилизина на физиологическую систему фибринолиза.

Мишенина С.В. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Ершов К.И. – к.м.н., ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Мадонов П.Г. – д.м.н., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, e-mail: madonov@scpb.ru

Байкалов Г.И. – студент 5-го курса лечебного факультета

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Как сказано выше, лекарственные препараты на основе субтилизина (ЛПОС) представлены на фармацевтическом рынке только тромбовазимом (ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск). Активное фармакологическое ядро тромбовазима представляет собой иммобилизованный на полиэтиленоксиде субтилизин. В отличие от тромболитиков – активаторов пламиногена, ЛПОС вызывает протеолиз фибриногена не через образование пламина, а посредством самостоятельного гидролиза доступных пептидных связей. Таким образом, ЛПОС является прямым тромболитиком.

Исследование *in vitro* прямого тромболитического действия ЛПОС выполнено с использованием 20 крыс-самцов Wistar в возрасте 5 месяцев. У животных под эфирным наркозом из хвостовой вены забирали кровь в пробирки-эппендорфы, где происходило дальнейшее формирование тромбов в течение 1, 2 и 24 ч. Образовавшиеся тромбы массой 0,4 г переносили в стеклянную емкость, входящую в состав экспериментальной установки, представляющую собой замкнутую систему силиконовых трубок, подключенную к перфузомату Minipuls 2 (Gilson, США). Перфузомат прокачивал ЛПОС, растворенный в 100 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия с концентрацией 2,4 ЕД/мл, через стеклянную емкость с тромбом со скоростью 24 мл/мин при температуре 37 °С. Создаваемый давлением перфузомата поток жидкости не приводил к механическому разрушению тромба, происходило его омывание со всех сторон. В процессе исследования определяли массу тромба каждые 15 мин в течение 135 мин. Контрольная группа представляла собой аналогичный эксперимент со 100 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия без добавления ЛПОС.

Экспериментальное исследование тромболитического действия ЛПОС *in vivo* проведено с использованием модели каррагинан-индуцированного тромбоза. В работе использовали 30 мышей-самцов линии BALB/c с массой тела 19–21 г. Каждому животному внутри группы был присвоен индивидуальный номер от 1 до 15, нанесенный с помощью меток. Мыши распределены по группам рандомизированно, в качестве критерия была использована масса тела таким образом, чтобы ее индивидуальное значение не отклонялось от среднего более чем на 10 %. Данные (масса тела и номер) отобранных животных ранжированы в порядке убывания веса. В эксперименте сформированы следующие группы: 1) 15 животных с моделью к-каррагинанового тромбоза, ко-

торым внутривенно вводили 200 мкл ЛПОС из расчета 390 ЕД/кг; 2) 15 животных с моделью к-каррагинанового тромбоза, которым внутривенно вводили 200 мкл 0,9%-го раствора хлорида натрия. Животных наркотизировали диэтиловым эфиром. От кончика хвоста мыши отмеряли 7 см и накладывали лигатуру, затем вводили подкожно 4%-й раствор к-каррагинана в 5 инъекциях, общим объемом 50 мкл. Через 10 мин лигатуру снимали. Известно, что тромбоз, индуцированный введением к-каррагинана, развивается в течение суток. Через 24 и 48 ч измеряли длину тромбоза хвостовых сосудов.

Исследование выполнено в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), Приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «О правилах надлежащей лабораторной практики». Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли на рисунках в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное исследование *in vitro* прямого тромболитического действия ЛПОС. После начала перфузии «свежего», образовавшегося через 1 ч, тромба в течение первых 15 мин скорость снижения его массы была одинаковой как при перфузии 0,9%-м раствором хлорида натрия, так и при добавлении ЛПОС (рис. 1, а). Поскольку «свежий» тромб представляет собой довольно рыхлую субстанцию, то вначале происходит потеря 25 % его массы за счет смывания клеток крови, поэтому разница по уменьшению массы тромба при перфузии ЛПОС и контрольным раствором была не столь очевидна. После 15-й минуты перфузии отчетливо видно различие в эффективности тромболитического действия двух растворов. В опытной группе интенсивность снижения массы тромба происходила следующим образом: к 45-й минуте масса тромба уменьшается на 50 %, к 75-й минуте – на 75 %, к 90-й минуте – на 88 % (предел детекции минимальной массы). В опытной группе визуальная оценка демонстрирует постоянно повторяющуюся динамику морфологических изменений тромба. Это обстоятельство позволяет выделить два этапа тромболитического действия для субтилизина: 1) послойное отмывание с поверхности тромба клеток крови с появлением тяжистой фибриновой структуры; 2) послойное разрушение тяжистой фибриновой структуры по типу «тающего мороженого».

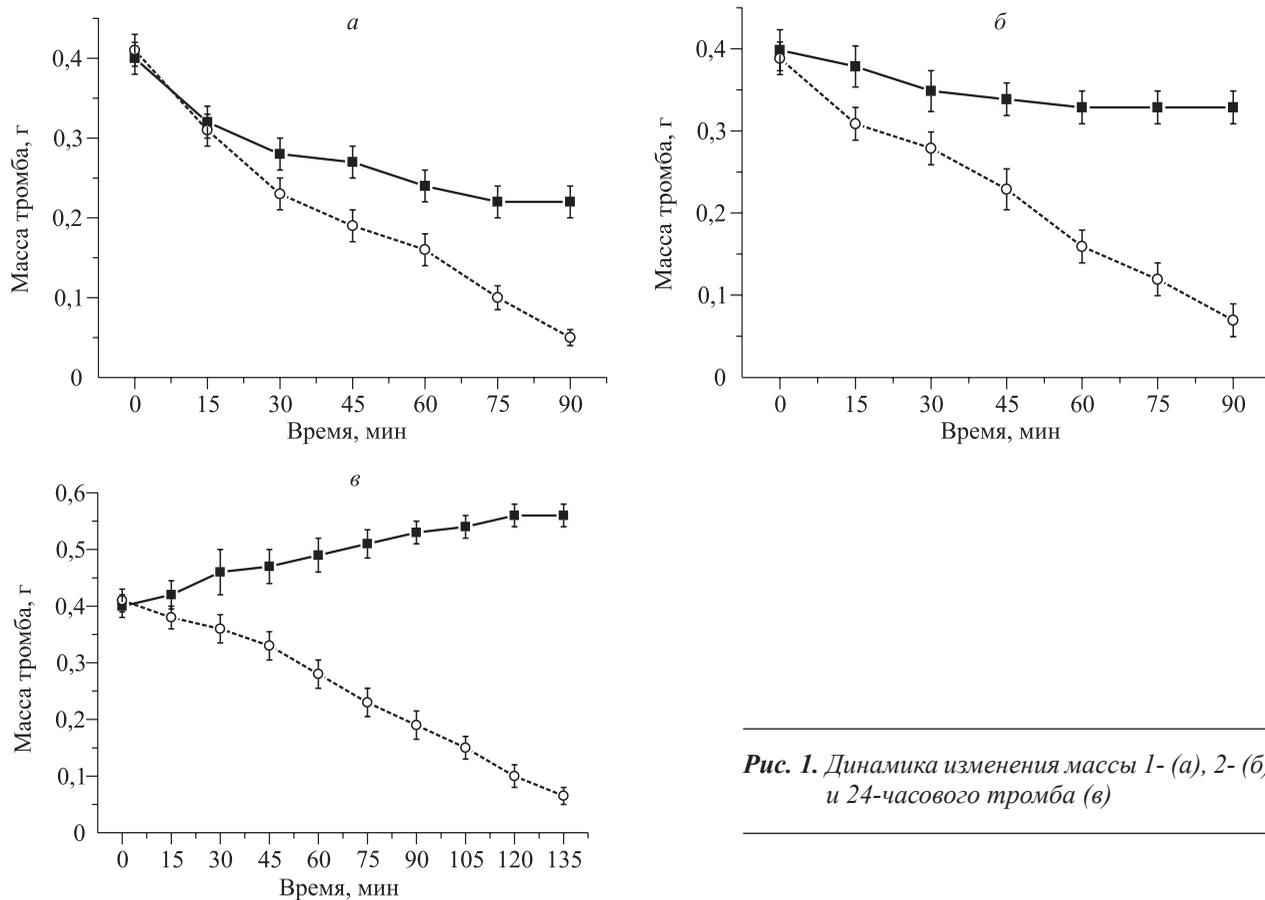


Рис. 1. Динамика изменения массы 1- (а), 2- (б) и 24-часового тромба (в)

Необходимо отметить, что на втором этапе тромболитического действия в оттекающей из стеклянной емкости жидкости не определяются фрагментированные тромботические массы, что подтверждает поверхностное разрушение тромба без образования крупных фрагментов. Это очень важно с клинической точки зрения, так как в организме крупные фрагменты тромба могут приводить к эмболии сосудов.

В контрольной группе при перфузии 0,9%-м раствором хлорида натрия после 15 мин интенсивность снижения массы тромба существенно отличается от тромболитического действия ЛПОС и к 75 мин эксперимента останавливается. Способность изотонического раствора снижать массу на 37 % в данном эксперименте объясняется исключительно рыхлостью «свежего» тромба и вымыванием белково-клеточного детрита, заключенного в фибриновый каркас тромба.

Общеизвестно, что морфогенез образования тромба имеет своей заключительной стадией ретракцию кровяного сгустка, когда происходит уплотнение фибринового каркаса и выдавливание клеточно-белкового компонента. Таким образом, в «зрелом» тромбе превалирует содержание фибрина над белково-клеточным детритом.

По нашему мнению, было совершенно логично провести серию экспериментов по оценке тромболитического действия ЛПОС «зрелых» тромбов, выявить динамику их тромболитического действия. С этой целью мы исследовали динамику тромболитического действия 2- и 24-часовых (суточных) тромбов. Методология эксперимента полностью повторила описанную ранее.

Интенсивность тромболитического действия двухчасового тромба представлена на рис. 1, б. Обращает на себя внимание, что в контрольной группе при перфузии 0,9%-м раствором хлорида натрия уменьшение массы «зрелого» тромба существенно отличалось от таковой «свежего» тромба. Одночасовой тромб к 75-й минуте перфузии уменьшился на 37 %, а двухчасовой – лишь на 17 %. По нашему мнению, это объясняется произошедшей ретракцией двухчасового тромба, существенным снижением доли клеточно-белкового детрита в нем и, соответственно, уменьшением вымываемой безфибриновой составляющей. В опытной группе динамика тромболитического действия существенно не отличалась от динамики одночасового тромба, величина тромба к 45-й минуте уменьшилась на 55 %, к 75-й минуте – на 72 %, к 90-й минуте – на 85 % (почти до предела детекции минимальной массы).

Далее провели аналогичный эксперимент с 24-часовым тромбом. За сутки тромб становится более плотным. Такие тромбы, если они образуются в условиях живого организма, лизируются намного дольше. Методология эксперимента полностью повторила описанную ранее. Суточный тромб под влиянием протеаз также начинал быстро поверхностно растворяться. Через 135 мин нахождения в циркулирующем растворе ЛПОС старый тромб уменьшился в размере в 8 раз до нижней точки детекции массы ($0,06 \pm 0,01$ г) (рис. 1, в). При его лизисе также не образовывалось крупных фрагментов. Единственное отличие его от свежих тромбов – это более продолжительное время растворения. В контрольной группе при перфузии суточного тромба 0,9%-м раствором хлорида натрия его самопроизвольного растворения не наблюдалось, на протяжении всего эксперимента масса тромба только возрастала и к концу эксперимента увеличилась на 40 %. Это объясняется тем обстоятельством, что тромб помещался на 24-часовое хранение, в процессе которого происходило дальнейшее уплотнение фиброзного сгустка. При помещении в 0,9%-й раствор хлорида натрия тромб набухает, в результате чего постепенно увеличиваются его масса и объем.

Очевидно, что ЛПОС способен эффективно лизировать тромбы. В процессе эксперимента установлено, что тромболитическое действие ЛПОС происходит послойно снаружи внутрь без образования крупных агрегатов. Выявлено, что протеиназы ЛПОС эффективно лизируют 1-, 2- и 24-часовые тромбы и уменьшают их массу в 8 раз: свежие тромбы за 90 мин, суточные – за 135 мин.

Экспериментальное исследование *in vivo* тромболитического действия ЛПОС. Тромбоз, индуцированный введением к-каррагинана, развивается в течение суток, поэтому длину тромба измеряли через 24 ч после инъекций. В контрольной группе длина участка с индуцированным тромбозом составила $6,9 \pm 0,2$ см, т.е. весь участок, где была наложена временная лигатура (рис. 2, Б), при этом отчетливо видна область выше места сдавливания, не подвергшаяся тромбозу. В эксперименте уже через сутки была видна внешняя разница. Животные группы контроля потеряли в массе в среднем $2,5 \pm 0,7$ г. Также у мышей без лечения препаратом отмечался цианоз кожных покровов. При этом в группе с введением ЛПОС масса животных и внешние покровы кожи остались без изменений. В группе с лечением ЛПОС через 24 ч после инъекции тромбоза в хвостовых венах не отмечалось. На участке, где были сделаны инъекции, к-каррагинан вызвал лишь воспалительную реакцию, отмечаю-

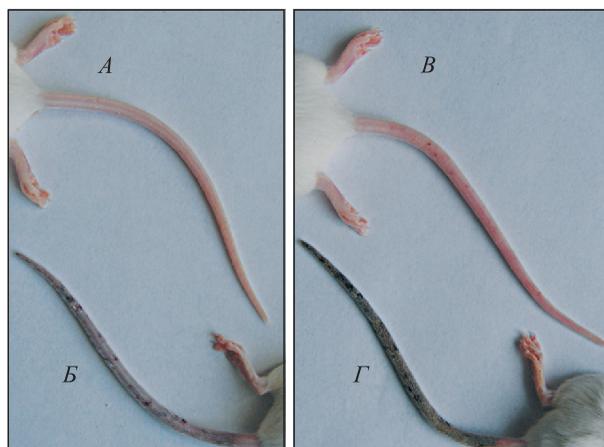


Рис. 2. Изменение хвостов мышей в процессе эксперимента: А – интактные животные, Б – контрольная группа через 24 ч после подкожного введения к-каррагинана, В – группа с лечением ЛПОС через 24 ч после инъекции, Г – группа контроля через 48 ч

щуюся покраснением кожных покровов хвоста (рис. 2, В). Через 48 ч в группе без лечения препаратом тромбоз привел к некротизации тканей хвоста (рис. 2, Г). В группе с введением ЛПОС тромбоза в хвостовых венах не отмечалось, в месте, где подкожно вводили к-каррагинан, видна лишь эритема.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛПОС обладает прямым тромболитическим действием. Кинетика тромболитического действия ЛПОС имеет вид послойного растворения тромба без его фрагментации. Это обстоятельство представляется чрезвычайно важным для клинического применения ЛПОС, поскольку исключает эмбологенность проводимого тромболитического действия. Результаты экспериментов *in vivo* демонстрируют, что ЛПОС присущ быстрый и очевидный тромболитический эффект, сочетающийся с явным противовоспалительным действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плотников М.Б., Дыгай А.М., Алиев О.И. и др. Антитромботический и тромболитический эффекты нового отечественного протеолитического препарата тромбовазима // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. 147. (4). 418–421.
2. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Шилова М.А. Фармакологические свойства и клиническое применение тромбовазима // Флебология. 2014. 8. (2). 90–91.
3. Мадонов П.Г., Кинит Д.Н., Ершов К.И. и др. Опыт клинического применения нового лекарственного препарата тромбовазим в сосудистой хи-

- рургии // Ангиол. и сосуд. хирургия. 2015. 21. (1). 99–104.
4. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Кинит Д.Н., Кихтенко Н.В. Химические и фармакологические свойства субтилизинов // Сиб. науч. мед. журн. 2016. 36. (3). 13–22.
5. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Кинит Д.Н., Кихтенко Н.В. Таргетная фармакодинамика субтилизинов // Сиб. науч. мед. журн. 2016. 36. (4). 15–23.
6. Мишенина С.В., Мадонов П.Г., Кинит Д.Н. и др. Эффективность перорального препарата Тромбовазим® в терапии тромбозов глубоких вен нижних конечностей // Ангиол. и сосуд. хирургия. 2016. 22. (3). 91–95.
7. Diaz J.A., Obi A.T., Myers D.D., Jr. et al. Critical review of mouse models of venous thrombosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. 32. (3). 56–562.
8. Gailani D., Cheng Q., Ivanov I.S. Murine models in the evaluation of heparan sulfate-based anticoagulants // *Methods Mol. Biol.* 2015. 1229. 483–496.
9. Yan C., Liu G., Hou L. Research progress of preparing mice model with deep venous thrombosis // *Liaoning J. Tradit. Chin. Med.* 2014. (5). 1067–1068.
10. Fu J., Tang B., Chen Y. et al. Reproduction of a new inferior vena cava thrombosis model and study of the evolutionary process of thrombolysis in rats // *Med. J. Chin. People's Liberation Army.* 2015. 40. (8). 610–315.
11. Zhang X., Xiong G. Deep vein thrombosis establish methods and progress in animal models // *China Foreign Med. Treat.* 2015. (6). 197–198.
12. Ma N., Liu X.W., Yang Y.J. et al. Preventive effect of aspirin eugenol ester on thrombosis in κ-carrageenan-induced rat tail thrombosis model // *PLoS One.* 2015. 10. (7). e0133125.

THROMBOLITIC EFFECTS OF SUBTILYZINE DRUG ON EXPERIMENTAL MODELS

Svetlana Vladimirovna MISHENINA¹, Konstantin Igorevich YERSHOV^{1,2}, Pavel Gennad'evich MADONOV^{1,2}, German Igorevich BAYKALOV¹

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

² Scientific Future Management
630559, Novosibirsk district, settlement Koltsovo, Tekhnoparkovaya str., 10

The article presents materials on the experimental study of the thrombolytic action of a drug based on subtilisin. A direct thrombolytic effect *in vitro* and a description of the kinetics of thrombolysis are shown. It has been established that thrombolysis by the drug occurs layerwise from the outside to the inside without the formation of large aggregates; its proteases effectively lyse 1-, 2- and 24-hour thrombi and reduce their weight eightfold: fresh blood clots in 90 min, daily – in 135 min. The effectiveness of the drug to eliminate thrombosis and restore blood flow in the pool of thrombotic occlusion is shown on the model of venous thrombosis *in vivo*.

Key words: venous thrombosis, thrombolysis, subtilisins.

Mishenina S.V. – candidate of medical sciences, associated professor of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Yershov K.I. – candidate of medical sciences, assistant of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Madonov P.G. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine, e-mail: madonov@scpb.ru

Baykalov G.I. – student