

ТАРГЕТНАЯ ФАРМАКОДИНАМИКА СУБТИЛИЗИНОВ

Павел Геннадиевич МАДОНОВ^{1,2}, Светлана Владимировна МИШЕНИНА¹, Дмитрий Николаевич КИШТ^{1,2},
Наталья Владимировна КИХТЕНКО²

¹Новосибирский 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

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

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

Кишт Д.Н. - к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины Кихтенко

Н.В. - заместитель начальника научно-исследовательского отдела

Субтилизины - протеолитические ферменты, продуцируемые бактериями рода *Bacillus subtilis*, имеют перспективное значение в фармакотерапии тромбозов. Это обусловлено их прямым тромболитическим действием и отсутствием побочных эффектов, вызываемых широко применяемыми последние 20 лет активаторами плазминогена. Возможность клинического использования субтилизинов в последние годы изучается довольно активно, и исследования показывают их эффективность не только для лечения тромбозов, но и для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и деменции. Однако применение субтилизинов в медицине ограничено их низкой биодоступностью. Новый отечественный препарат Тромбовазим на основе пегилированного субтилизина, созданный с применением технологии радиационного синтеза, обладает таргетным тромболитическим, кардиопротективным и противовоспалительным действием и на сегодняшний день является единственным зарегистрированным пероральным тромболитиком. Иммуобилизованные субтилизины имеют масштабные перспективы для внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: субтилизины, наттокиназа, Тромбовазим, тромболитическая терапия, антикоагуляционная активность, тромбоз венозный синусов, инфаркт миокарда.

Применение субтилизинов в медицине со времени их углубленного изучения выглядело очень перспективно [15]. В обзоре Н.П. Балабан и М.Р. Шариповой [3] рассматриваются ведущие направления практического использования протеолитических ферментов для лечения ран, ожоговых инфекций, артрита, при заболевании желудочно-кишечного тракта, а также при лечении тромбозомболических и послеоперационных осложнений в качестве противовоспалительных агентов. Дефицит сырья животного происхождения стимулировал в конце XX в. быстрое развитие биотехнологического производства медицинских препаратов из микробного сырья. Так, разработанный в 1994 г. препарат протеиназы из *Bacillus subtilis* 316M с эластазолитической активностью успешно заменил препарат животного происхождения для лечения ожогов, гнойных ран, фурункулов, карбункулов и глубоких абсцессов. По мере нарастания объема научно-исследовательской информации о субтилизинах расширялись и перспективы их применения в клинической практике [1, 10, 22, 24, 31, 32, 35, 37,38,41-43,48-51]. Особенно привлекательным обстоятельством для врачей-клиницистов выглядела перспектива применения субтилизинов в качестве прямого тромболитика. Последние 20 лет тромболитическая терапия проводилась исключительно посредством применения активаторов плазминогена - проурокиназы, альтеплазы, стрептокиназы и др. Активаторы плазминогена по своей химической сущности являются протео-литическими ферментами из группы сериновых протеиназ. Их фармакологическое действие заключается в сайт-специфичном гидролизе плазминогена и превращении его в плазмин. Плазмин также представляет собой сериновую протеиназу, он сайт-специфично гидролизует молекулу фибрина, но при этом вызывает гидролиз и фибриногена, тем самым существенно снижая коагуляционный потенциал плазмы и, соответственно, повышая риск кровотечений во время проведения тромболитической терапии. Таким образом, в каждом случае применения активаторов плазминогена присутствует высокий риск геморрагических осложнений. Именно поэтому разработки прямого фибринолитика всегда привлекали внимание фармакологов и врачей-клиницистов. По мнению Е. Kotb [32], фибринолитические ферменты привлекают гораздо больше внимания, чем типичные тромболитические препараты - активаторы плазминогена, из-за высоких цен и побочных эффектов последних.

В работе S. Majumdar [36] показано, что субтилизин бревитромболазы (brevitrombolase) не ингибирует фактор Ха, и механизм его антикоагуляционного действия связан с ферментным расщеплением тромбина. В совокупности свойства бревитромболазы свидетельствуют о терапевтическом потенциале фермента в разработке кардиоваскулярного препарата на ее основе. Тромболитическая активность бревитромболазы превосходит таковую плазмина и стрептокиназы, по антикоагуляционной активности фермент сравним с гепарином / антитромбином III и варфарином. Бревитромболаза *in vitro* не показала цитотоксичность на клетках HeLa и HT29 или гемолитической активности. При тестировании *in vivo* на крысах-альбиносах линии Вистар субтилизин в дозе 10 мг/кг не был летален или токсичен.

Фибринолитические свойства отмечены и у субтилизинов, используемых в приготовлении пищи. Выяснилось, что они обладают хорошим потенциалом для разработки в качестве пищевых добавок и лекарственных препаратов для профилактики или лечения тромбоза и других связанных с ним заболеваний. Особое внимание было привлечено к наттокиназе - мощному фибринолитическому ферменту, экстрагированному из натто (традиционной японской еды, производимой из сброженных соевых бобов). В настоящее время наттокиназа производится как пищевая добавка для человека. В исследованиях *in vitro* субтилизин не только показал сильное фибринолитическое действие, но и способствовал значительному снижению степени агрегации эритроцитов и понижению вязкости крови. В результате применения наттокиназы существенно уменьшается склонность к образованию тромбов. В настоящий момент считается, что наттокиназа имеет большой потенциал в качестве терапевтического средства для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [26, 46, 41], однако для ее терапевтического использования возникли объективные сложности: так, исследование дуоденальной абсорбции *in vivo* у крыс показало, что происходит лишь частичное проникновение нативного фермента.

Действие наттокиназы, расщепляющей фибрин в плазме, было пролонгированным и обнаруживалось в образцах плазмы, взятых через 3-5 ч после приема фермента [28]. Показано, что свойства субтилизина очень схожи со свойствами пламина. Наттокиназа особенно эффективна, поскольку повышает естественную способность организма справляться с тромбами в крови несколькими различными способами, не только непосредственно растворяя фибрин, но и, по-видимому, повышая естественную выработку организмом как пламина, так и других ферментов, участвующих в лизисе тромба, например урокиназы. В сравнительных исследованиях *in vivo* на модели индуцированного тромба в сонной артерии крыс показано, что тромболитическое действие наттокиназы выше, чем пламина или эластазы [27].

При экспериментальном повреждении бедренной артерии у крыс установлено, что добавка к рациону экстракта наттокиназы сдерживает утолщение интимы, возникающее в результате эндотелиального повреждения бедренной артерии крыс. Эти эффекты, хотя бы частично, связаны с воздействием наттокиназы, которая вызывала усиление тромболитического действия около стенки сосуда и инактивировала ингибитор активатора пламиногена 1 типа, что, в свою очередь, повышает фибринолитическую активность [44, 45]. Исследование, проведенное с применением наттокиназы на 12 здоровых взрослых добровольцах (6 мужчин и 6 женщин в возрасте от 21 до 55 лет), показало выраженное фибринолитическое действие наттокиназы при пероральном применении. Добровольцы принимали по 200 г наттокиназы в виде пищи до завтрака, затем у них измерялось фибринолитическое действие крови через разные промежутки времени. В результате обнаружено, что наттокиназа повышает способность крови лизировать тромбы. В качестве контроля тем же добровольцам давали позже идентичное количество отваренных соевых бобов, после приема которых у обследованных фибринолитическая активность крови не изменялась [46].

Любопытное исследование проведено с целью измерения эффективности наттокиназы в профилактике тромбоза глубоких и поверхностных вен при продолжительных перелетах, длящихся 7-8 ч. у пациентов группы риска [23]. Из 300 человек было отобрано 204, которых разделили на две группы с использованием процедуры рандомизации. В группе, получавшей наттокиназу (таблетки Flite Tabs, содержащие пинокиназу - комплексный препарат, состоящий из наттокиназы и экстракта коры сосны), не возникло тромбозов. В группе из 94 человек, получавшей плацебо, зарегистрировано пять случаев тромбоза глубоких вен и два случая тромбоза поверхностных вен (7,6 %). После полета степень отечности увеличилась на 12 % в группе плацебо и уменьшилась на 15 % в группе, получавшей наттокиназу. Авторы пришли к выводу, что наттокиназа эффективно снижает уровень тромботических заболеваний, а также эффективна для контроля отеков в группе риска при длительных перелетах.

В статье R.-L. Hsu et al. [30] приведено обоснование использования субтилизина наттокиназы для лечения болезни Альцгеймера. Известно, что в образовании амилоидных фибрилл, являющихся патогенным фактором болезни Альцгеймера, участвуют не менее 20 белков. Основной целью в лечении этого заболевания является улучшение амилоидного клиренса. Понижение количества амилоидных фибрилл может способствовать профилактике, или, по меньшей мере, облегчению болезни Альцгеймера. В работе [30] продемонстрировано, что наттокиназа расщепляет амилоидные фибриллы, при этом плазмин и трипсин не обладают такими свойствами.

Очевидно, что наттокиназа оказывает выраженное положительное воздействие на группу риска пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, способна сократить риск возникновения тромбоза глубоких вен, инфаркта миокарда, тромбоэмболии легочной артерии и инсульта. Кроме того, ее свойство препятствовать утолщению комплекса интима-медиа артериальных стенок может приводить к нормализации артериального давления, а также снизить другие факторы риска, такие как атеросклероз [40]. Демонстрированное снижение агрегации эритроцитов и общей вязкости крови приводит к выводу, что наттокиназа способствует созданию условий, при которых менее вероятно образование тромбов в сосудах [29, 31, 34].

В декабре 2015 г. опубликованы материалы по проведению нескольких GCP-комплаентных исследований ферментного продукта на основе наттокиназы NSK-SD (Japan Bio Science Laboratory Co., Ltd.) [33]. *In vitro* доказано, что наттокиназа не мутагенна, а при исследовании субхронической токсичности на крысах Sprague-Dawley побочные эффекты не наблюдались на 28-й и 90-й день в дозе 167 и 1000 мг/кг в день соответственно. У мышей, которым вводились $7,55 \times 10^8$ КОЕ фермент-продуцирующего бактериального штамма, не проявлялось никаких признаков токсичности или остаточных тканевых концентраций живых бактерий. Дополнительное потребление 10 мг/кг в день наттокиназы в течение четырех недель хорошо переносилось здоровыми волонтерами. Эти данные позволяют предположить, что употребление наттокиназы имеет низкую токсикологическую опасность. Наивысшая тестируемая доза составила 1000 мг/кг в день в течение 90 дней при пероральном введении самкам и самцам крыс Sprague-Dawley.

Первое зарегистрированное клиническое исследование наттокиназы завершено в 2007 г. - Efficacy and Safety of Natto Extract Clinical Trials, идентификационный номер: NCT00447434 [25]. Целью данного исследования было сравнение действия экстракта наттокиназы на фибринолитические факторы и ферменты крови при приеме здоровыми добровольцами, больными на диализе и пациентами с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. Для каждой группы отобраны по пятнадцать добровольцев в возрасте от 20 до 70 лет, которые принимали капсулы с экстрактом натто перорально в течение двух месяцев. Через 3, 7 и 28 дней после начала приема и через две недели после окончания приема для определения эффективности оценивались фибринолитические факторы, жизненно важные симптомы и липиды. Однако по неизвестным причинам результаты этого исследования не опубликованы.

В настоящий момент проводится еще одно клиническое исследование по определению эффективности и безопасности наттокиназы - Nattokinase Atherothrombotic Prevention Study (NAPS), идентификатор: NCT02080520, верифицировано в мае 2015 г. Университетом Южной Калифорнии [39]. Потенциальная способность субтилизина снижать свертываемость крови посредством положительного антитромботического и фибринолитического действия представляет уникальную возможность для безопасного исследования такого воздействия на сердечнососудистые заболевания и когнитивные способности. К сожалению, подобные исследования антитромботического и фибринолитического путей профилактики ограничены из-за отсутствия безопасных соединений и побочных реакций, вызываемых используемыми в настоящее время препаратами, такими как варфарин. Применяя наттокиназу в целях первичной профилактики, исследователи проводят рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование для анализа возможности замедления развития атеросклероза и когнитивных нарушений посредством уменьшения атеротромботического риска.

Цель исследования J.Y. Kim et al. [31] состояла в изучении влияния добавки наттокиназы на артериальное давление у лиц с пре-гипертонией или гипертонией 1-й стадии. В рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании в течение 8 недель 86 человек в возрасте с 20 до 80 лет с начальным нелеченным систолическим артериальным давлением от 130 до 159 мм рт. ст. получали капсулы с плацебо или наттокиназой (2000

фибринолитических единиц на капсулу). 73 участника прошли исследование полностью. По сравнению с контрольной группой, после 8-недельного курса приема наттокиназы «чистые» изменения систолического, диастолического давления и активности ренина составили соответственно -5,55 мм рт. ст., -2,84 мм рт. ст. и -1,17 нг/(мл*ч). Эти наблюдения подтверждают, что прием наттокиназы может играть важную роль в профилактике и лечении гипертензии.

Стартовая идея разработки тромболитического лекарственного препарата на основе субтилизинов заключалась в создании тромболитика, который бы растворял тромбы самостоятельно, без вовлечения в фибринолиз плазмينا. Молекула должна представлять собой фибринолитический и тромболитический фермент, способный быстро и интенсивно растворить фибрин тромба, а также гидролизовать белковый и клеточный детрит тромба. Главная проблема создания такого препарата заключается в том, что при попадании фермента в кровеносную систему он неизбежно вызовет тяжелую аллергическую реакцию, вплоть до анафилактического шока. Таким образом, необходимо было так изменить химическую конфигурацию молекулы, чтобы ферментативная активность сохранилась, а аллергическое и иммунотоксическое действие утратилось. Интерес к созданию иммобилизованных форм тромболитических препаратов подтверждается научными публикациями. Но зачастую цель разработки заключается в решении узкой фармакологической задачи. Так, например, в исследовании В. Vaidya et al. [47] предпринята попытка модифицировать стрептокиназу посредством ее включения в липосому. Стрептокиназа является одним из наиболее часто используемых тромболитических средств, но короткий период полураспада фермента требует введения более высоких доз, что приводит к различным побочным эффектам, включая системное кровоизлияние из-за активации системного плазмина. Чтобы повысить селективность стрептокиназы и вместе с тем уменьшить побочные эффекты, разрабатываются разнообразные новые носители. Липосомы появились среди таких носителей как универсальный вариант. В данном исследовании *in vitro* и *in vivo* изучались разработанные высокоселективные «нацеленные» липосомы. Обнаружено, что разработанные липосомы *in vitro* выделяют стрептокиназу после связывания с активированными тромбоцитами. Прижизненные микроскопические исследования на мышинной модели тромба выявили высокое скопление липосом в области тромба. Результаты исследования тромболитиза на крысиной модели инокулированного кровяного сгустка человека показали, что «нацеленные» липосомы растворяют существенно больший объем тромба по сравнению с нелипосомальной стрептокиназой, а также уменьшают время растворения сгустка. Авторы сделали вывод, что разрабатываемые липосомы могут быть перспективными носителями для лечения тромботических заболеваний.

Оригинальный метод иммобилизации предложен в работе Н. Baharifar et al. [21]. Путем самосборки были получены наночастицы, состоящие из стрептокиназы и хитозана. Анализ лизиса сгустка эуглобулина показал, что наночастицы хитозан/стрептокиназа обладают слабым токсическим эффектом в отношении клеток фибробластов легкого плода человека Мгс-5 по сравнению с хитозаном и стрептокиназой по отдельности. При этом тромболитическая активность инкапсулированной стрептокиназы в наночастицах немного уменьшилась по сравнению с чистой стрептокиназой. Однако препарат сохраняет хороший потенциал для использования в качестве тромболитического агента *in vivo*.

В 1990-х годах в НИИ цитологии и генетики и НИИ ядерной физики СО РАН проведены экспериментальные исследования возможности электронно-лучевого пегелирования субтилизина с целью создания лекарственного препарата для введения в кровеносное русло, впервые показавшие возможность радиационной иммобилизации субтилизина на полиэтиленгликоле при использовании пучка ускоренных электронов [2, 19]. В настоящее время в литературе активно используется термин «электронно-лучевое пегелирование белковых молекул» [8, 11]. В работе П. Г. Мадонна [11] представлено, что белково-полимерные препараты, созданные по технологии электронно-лучевого синтеза, обладают специфической фармакологической активностью, свойственной нативным белкам. Изучено и показано, что одноступенчатый электронно-лучевой синтез нативного белка с полиэтиленгликолем модифицирует фармакокинетические характеристики нативного белка и обеспечивает новые, терапевтически значимые пути его введения в организм. Для фармакологического препарата на основе пегелированного посредством электронно-лучевого синтеза субтилизина молекулярной массой 30 кДа в экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрирован свойственный нативному белку выраженный фибринолитический эффект. Тромболитический эффект лекарственного средства на основе пегелированного субтилизина подтвержден в клинических исследованиях при лечении венозной недостаточности и инфаркта миокарда [12]. В настоящее время существует единственный в мире лекарственный препарат на основе иммобилизованных субтилизинов - Тромбовазим (производитель - ЗАО «СЦФБ», Россия).

Посредством метода ВЭЖХ-масс-спектрометрии в режиме наноэлектроспрея получен белковый сиквенс субтилизина Тромбовазима.

Субтилизин Тромбовазима имеет молекулярную массу 27,7 кДа, состоит из 275 аминокислотных остатков. При сопоставлении уникальных пептидных фрагментов с базами данных по бактериальным белкам установлена высокая степень идентичности протеиназы Тромбовазима с субтилизином DFE, выявлено полное совпадение по трем уникальным пептидным фрагментам из 11, 11 и 18 аминокислот. Субтилизин DFE, выделенный в 2003 г. из *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4, представляет собой сериновую протеиназу с высокой фибринолитической активностью. Проведенный ингибиторный анализ показал, что активность субтилизина Тромбовазима полностью ингибируется фенилметилсульфонилфторидом, специфическим ингибитором сериновых протеиназ, но не ЭДТА. Фермент показал высокую активность в отношении специфического субстрата субтилизинов Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Максимальная активность получена в достаточно широком диапазоне pH - от 7,5 до 10, при этом при значениях pH 6,0 и 11 сохраняется около 50 и 60 % максимальной активности соответственно. Температурный оптимум протеолитической активности при pH 8.0 наблюдался при +47 °С. Субтилизин показал высокую фибринолитическую активность как по формированию зоны лизиса в фибриновом слое (метод Аструпа - Мюллерца), так и по лизису искусственного фибринового сгустка. Продукты деградации фибрина в различных концентрациях (1,56, 3,13 и 6,25 мг/мл в пересчете на фибриноген) не ингибировали активность исследуемого фермента, оцененную по гидролизу специфического хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa[1],

На этапе государственной регистрации Тромбовазим прошел полный курс доклинических исследований. Фибринолитическое и антитромботическое действие препарата исследовано *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* выявлено прямое дозозависимое фибринолитическое действие препарата на сгусток фибрина, полученного из очищенного фибрин-мономера. Механизм действия отличен от действия плазмина, поскольку данный препарат не разрушает лизиновые связи специфического хромогенного субстрата. Препарат не вызывает активацию плазминогена, напротив, концентрация последнего в плазме крови увеличивается на 40 %. Данное лекарственное средство препятствует полимеризации фибрин-мономеров, эффект связан с действием субтилизинов, так как исчезал при

инактивации фермента. Тромбовазим на 40 % снижал АДФ-индуцированную адгезию тромбоцитов *in vitro* и увеличивал скорость лизиса эуглобулинового сгустка при внутривенном введении [11].

На крысах проведено исследование тромболитической и антитромботической активности Тромбовазима *in vivo* при внутривенном введении. Профилактическое введение субтилизина эффективно ограничивало процесс тромбообразования в сонной артерии в первые 1,5 ч после воздействия на нее хлоридом двухвалентного железа: доля животных с полной окклюзией сонной артерии к 90-й минуте была в 4 раза меньше, чем в контрольной группе. При терапевтическом введении Тромбовазима через 24 ч. доля животных с полной окклюзией сонной артерии снижалась в 3 раза. При наличии остаточного тромба в сонной артерии масса тромба была в среднем в 3 раза меньше по сравнению с группой контроля [16]. При исследовании тромболитической активности Тромбовазима при приеме *per os* установлено, что масса тромбов у крыс на фоне терапии препаратом была достоверно меньше (на 25 %) величины показателя в контроле, а кровоток - достоверно выше. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о выраженной тромболитической активности препарата *in vitro*, а также *in vivo* при лечебном и профилактическом применении.

Помимо таргетной тромболитической активности на этапе доклинических исследований доказан противовоспалительный эффект Тромбовазима. Выявлена антипролиферативная активность исследуемого препарата на фоне развивающихся пролиферативных процессов у крыс с имплантированной «ватной» гранулемой. Противовоспалительное и антиэкссудативное действие наблюдалось при профилактическом и лечебном введении Тромбовазима крысам с артритом, вызванным адьювантом Фрейнда. Противовоспалительный эффект связан с влиянием Тромбовазима на окислительную функцию нейтрофилов крови, макрофагов легких и перитонеальной полости. Исследование кардиопротективного действия препарата на адреналиновой модели инфаркта миокарда показало, что после развития адреналинового миокардита внутрибрюшинное введение Тромбовазима достоверно снижало количество некрозов (в 1,5 раза к концу трех суток) и дистрофических изменений в сердечной мышце (в 2,5 раза к концу седьмых суток) по сравнению с контролем.

Препарат не токсичен, относится к 4-й группе токсичности лекарственных средств. При энтеральном введении Тромбовазима летальность не установлена. Результаты проведенных исследований хронической токсичности показали, что и внутривенное, и внутрижелудочное введение препарата в течение 14 дней не оказывает токсического влияния на показатели периферической крови и костного мозга и не приводит к изменениям средних величин биохимических показателей сыворотки крови при сравнении с исходными данными. Отсутствовало влияние на показатели миелограммы как при внутривенном, так и при энтеральном приеме Тромбовазима. Препарат не обладает тератогенным, мутагенным и канцерогенным эффектами, хорошо переносится животными, не вызывая аллергии, флебита и местнораздражающего действия.

Детально исследованы фармакокинетические параметры Тромбовазима. При однократном внутривенном введении общий клиренс Cl составляет 1,2 мл/мин, константа скорости элиминации K_{el} - 0,057/мин, период полувыведения $T_{1/2}$ - 0,2 ч. Препарат выводится почками в активном виде с сохранением специфической активности, определяемой по гидролизу хромогенных белковых субстратов. Связывания с белками плазмы и форменными элементами крови не установлено. Тромбовазим не обладает кумулятивным действием при соблюдении рекомендуемых доз и кратности введения, которые учитывают $T_{1/2}$ и другие фармакокинетические показатели. Фармакокинетические параметры при энтеральном введении: время достижения максимальной концентрации T_{max} - 5 ч, максимальная концентрация C_{max} - 0,044 ЕД/мл, биодоступность F - 17 %, $T_{1/2}$ - 0,43 ч, объем распределения $-V_{po}$ - 1,277 л, среднее время удержания MRT_{po} - 4,832 ч, клиренс Cl_{po} - 6,792 мл/ч. K_{el} - 5,3191/ч, нулевой момент AUC - 0,132 (ЕД*ч²)/мл, первый момент $AUMC$ - 0,640 (ЕД*ч²)/мл, второй момент $AUMMC$ - 0,778 (ЕД*ч²)/мл.

В результате проведенных клинических исследований установлено, что электронно-лучевое пегилирование субтилизина обеспечивает энтеральную биодоступность, низкую токсичность, выраженное тромболитическое, цитопротективное, противовоспалительное действие в организме человека при энтеральном и парентеральном путях его введения. Фармакологический препарат пегилированного субтилизина создан в двух лекарственных формах. Продемонстрирована его эффективность как прямого тромболитика при остром инфаркте миокарда с более благоприятным соотношением эффективность/безопасность по сравнению с активаторами плазминогена. На основании этих исследований зарегистрированы лекарственные формы в виде лиофилизата для приготовления раствора для внутривенной инфузии и капсулированная для лечения хронической венозной недостаточности.

Регистрационные клинические исследования пероральной формы Тромбовазима проводились у больных с хронической венозной недостаточностью. В исследовании приняли участие 119 пациентов мужского и женского пола в возрасте от 40 до 75 лет, прием препарата осуществлялся в течение 20 дней. В группе больных, в которой использовался для лечения Тромбовазим, отмечено уменьшение площади поражения и заживление трофических язв, уменьшение отека нижних конечностей и болевого синдрома, увеличение скорости и объема венозного и лимфатического оттока, снижение динамического сопротивления лимфовенозному оттоку. Позитивные изменения, зарегистрированные посредством лазерной флоуметрии, свидетельствовали об улучшении микроциркуляции в пораженных конечностях [9]. У пациенток со сформировавшейся хронической венозной недостаточностью на фоне применения гормональной заместительной терапии и гормональных оральных контрацептивов проведено апробационное клиническое исследование, в котором приняло участие 13 женщин, суточная доза препарата составила 1600 ЕД, длительность приема - 14 дней. После проведения курса терапии с применением Тромбовазима у всех пациенток, включенных в исследование, отмечены положительная динамика по модифицированной шкале CEAP и повышение толерантности к физическим нагрузкам. После проведения терапии препаратом отмечались нормализация показателей свертывающей системы крови, статистически значимое уменьшение уровня маркеров тромбинемии [13].

В клиническом исследовании у пациентов с тромбозом венозной системы головного мозга приняло участие 13 лиц, страдающих цереброваскулярными расстройствами и выявленным при компьютерной томографии тромбозом венозной системы головного мозга. По данным томографического исследования наблюдались сочетанные тромбозы. Локализация тромбов: поперечный, сигмовидный, прямой синусы. По характеру расположения тромба: пристеночное, внутривенное и субтотальное. После проведения курса комплексной терапии с применением препарата Тромбовазим в дозе 1600 ЕД/сут в течение 12 дней у девяти пациентов отмечено исчезновение тромба, у четырех тромб визуализировался, но уменьшился в размерах. При оценке динамики кровотока в скомпрометированном

бассейне у шести больных наблюдалось полное восстановление мозгового кровотока, у семи -увеличение по сравнению с исходными значениями. Концентрация фибриногена, а также тромбиновое и протромбиновое время статистически значимо не изменялись [13].

В одном из пострегистрационных клинических исследований [17] выполнена сравнительная оценка результатов графической регистрации процесса свертывания крови с использованием метода низкочастотной вибрационной пьезометрической гемокоагулографии у пациентов с ИБС. комплексная терапия у которых была дополнена курсовым назначением Тромбовазима. Установлено, что курсовой прием препарата обеспечивает статистически значимое снижение контактной фазы свертывания крови с 318 ± 19 до 178 ± 21 и увеличение времени ее достижения (с $1,1 \pm 0,3$ до $3,2 \pm 0,4$ мин). При этом существенно снижается интенсивность контактной фазы коагуляции (с $141,82 \pm 13,21$ до $18.13 \pm 6,27$) и константа тромбиновой активности (с $58,82 \pm 4,37$ до $23,81 \pm 3,36$). Эти изменения регистрируются на фоне уменьшения интенсивности коагуляционного драйва (с $41,89 \pm 2,35$ до $25,34 \pm 3,12$) и возрастания времени свертываемости цельной крови (с $3,7 \pm 0,1$ до $10,3 \pm 1,1$ мин). Полученные результаты демонстрируют эффективность Тромбовазима в отношении не только его фибринолитической активности, но и снижения прокоагулянтной активности в тромбоцитарно-сосудистом и прокоагулянтном звеньях гемостаза. Проведенное исследование позволило установить, что курсовой прием препарата Тромбовазим в суточной дозе 1600 ЕД обеспечивает выраженную эффективность в отношении повышения резервных возможностей антикоагулянтного звена гемостаза и снижения агрегационной активности тромбоцитов на фоне оптимизации соотношения ряда цитокинов, ответственных за реализацию про- и противовоспалительной активностей.

В статье [18] авторы обсуждают способы лечения окклюзионных заболеваний сосудов системы нижней поллой вены и профилактики тромбоэмболии легочной артерии, сравнивают качество жизни пациентов, получающих традиционную комплексную терапию окклюзионных заболеваний сосудов системы нижней поллой вены, и терапию с применением Тромбовазима. На основании полученных результатов даны рекомендации по включению препарата в комплексную терапию венозного тромбоза. Также было проведено несколько пилотных исследований в офтальмологии [4], нейрохирургии [20], кардиологии [5-7].

Таким образом, таргетная фармакодинамика субтилизинов создает объективные предпосылки для создания на их основе пероральных тромбо-литических препаратов. В настоящий момент такой фармакотерапевтической группы не существует, но вероятность ее появления достаточно высока и зависит от инициативы компании-производителя и, в большей степени, от заинтересованности Министерства здравоохранения Российской Федерации. Совершенно очевидно, что иммобилизованные субтилизины имеют масштабные перспективы для внедрения в клиническую практику. На сегодняшний день они могут применяться в качестве инъекционного тромболитика для лечения острого инфаркта миокарда и тяжелой хронической венозной недостаточности (пероральная форма) с выраженным тромболитическим эффектом. Для субтилизинов однозначно существует несколько показаний к применению: в сосудистой хирургии - острый венозный тромбоз и тромбоэмболия легочной артерии, в офтальмологии - тромбоз сетчатки, в кардиологии -тромбоз ушка предсердия, в неврологии - ишемический инсульт и тромбоз венозных синусов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев А.А., Куценогий П.К., Мирошни-ков П.Н. и др. Выделение и свойства фибринолитической сериновой протеиназы, секретируемой штаммом *Bacillus subtilis* B2805 // Докл. РАН. 2014. 455. (5). 595-598.
2. Ауслендер В.Л., Брызгин А.А., Воронин Л.А. и др. Ускорители электронов серии ИЛУ и их применение в промышленности и медицине // XI Международное совещание по применению ускорителей заряженных частиц в промышленности и медицине: сб. докл. СПб., 2005. 78-81.
3. Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Практическое применение бациллярных протеаз // Учен. зап. Казан, гос. ун-та. Сер. Естеств. наук. 2011. 153. (2). 29-40.
4. Белоусова Н.Ю., Мазунин И.Ю., Кольчик О.В. и др. Опыт применения отечественного препарата тромбовазим в комбинированной терапии окклюзии ретинальных вен // Человек и лекарство: сб. матер. XVII Рос. конгр. М., 2010. 47.
5. Бувечич Е.И., Котовицкова Е.Ф., Сьюльжина Е.Н. и др. О состоянии эндотелия при остром инфаркте миокарда до и после приема Тромбовазима // Тромбоз, гемостаз и реология. 2009. (3). 33-37.
6. Вышков Е.В., Баталов Р.Е., Марков В. А. и др. Сравнительная эффективность ферментного препарата с тромболитическим действием при внутрипредсердном тромбозе и спонтанном эхоконтрастировании у больных с фибрилляцией предсердий // Рос. кардиол. журн. 2015. (9). 71-74.
7. Вышков Е.В., Марков Е.В., Попов С.В. Первый опыт применения тромбовазима для лизиса внутрипредсердных тромбов у больных с фибрилляцией предсердий // Сиб. мед. журн. 2011.(1). 102-105.
8. Дыгай А.М., Артамонов А.В., Бекарев А.А. и др. Нанотехнологии в фармакологии. М., 2011. 136 с.
9. Кинит Д.Н., Верещагин Е.И., Мадонов П.Г. и др. Эффективность препарата Тромбовазим в лечении хронической венозной недостаточности // Человек и лекарство: сб. матер. XVI Рос. конгр. М., 2009. 127-128.
10. Лютова Л.В., Андреев Г.В., Карабасова М.А. и др. Исследование тромболитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы (ТСП) из *Thermoactinomyces vulgaris in vivo* // Прикл. биохимия и микробиология. 1990. 26. (5). 623-628.
11. Мадонов П.Г. Фармакологические свойства и клинические эффекты белково-полимерных лекарственных средств, созданных электронно-лучевым синтезом: автореф. дис. д-ра мед. наук. Томск, 2012.
12. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В. и др. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // Медицина и образование в Сибири. 2013. (4). <http://www.ngmu.m/cozo/mos/article/pdf.php?id=1115>.
13. Мадонов П.Г., Кинит Д.Н., Ершов К.И. и др. Опыт клинического применения нового лекарственного препарата Тромбовазим в сосудистой хирургии // Ангиол. и сосуд. хирургия. 2015. 21. (1). 99-104.
14. Мадонов П.Г., Маринкин И.О., Кулеинов В.М. и др. Эффективность применения препарата Тромбовазим при хронической венозной недостаточности на фоне применения гормональной заместительной терапии и гормональных оральных контрацептивов // Человек и лекарство: сб. матер. XVI Рос. конгр. М., 2010. 175.
15. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Кинит Д. Н. Химические и фармакологические свойства субтилизинов // Сиб. науч. мед. журн. 2016. 36. (3). 13-22.

16. Плотников М.Б., Дыгай А.М., Алиев О.И. и др. Антитромботический и тромболитический эффект нового отечественного протеолитического препарата Тромбовазим // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. 147. (4). 418-421.
17. Соловьев М.А. Плейотропные эффекты перорального фибринолитика в комплексной терапии пациентов с ишемической болезнью сердца: стенокардией напряжения, ФК I-II. НК 0-1: автореф. дис. канд. мед. наук. Томск, 2011.
18. Сощенко Д.Г., Фокин А.А. Оценка качества жизни больных с окклюзионным поражением сосудов системы нижней полой вены и опыт применения нового лекарственного препарата Тромбовазим // Тромбоз, гемостаз и реология. 2011. (2). 59-64.
19. Троицкий А.В. Разработка способа получения лекарственных препаратов на основе иммобилизованных протеаз *Bac. subtilis*: автореф. дис. канд. мед. наук. Новосибирск, 1998.
20. Трофимов А.О., Кравец Л.Я. К вопросу о фибринолизе при внутримозговых кровоизлияниях // V Съезд нейрохирургов России: мат. съезда. Уфа, 2009. 464.
21. Baharifar H., Tavoosidana G., Karimi R. et al. Optimization of self-assembled chitosan/streptokinase nanoparticles and evaluation of their cytotoxicity and thrombolytic activity // J. Nanosci. Nanotechnol. 2015. 15. (12). 10127-10133.
22. Bi Q., Han B., Feng Y. et al. Antithrombotic effects of a newly purified fibrinolytic protease from *Urechis unicinctus* // Thromb. Res. 2013. 132. (2). e135-e144.
23. Cesarone M.R., Belcaro G., Nicolaidis A.N. et al. Prevention of venous thrombosis in long-haul flights with Flite Tabs: the LONFLIT-FLITE randomized, controlled trial // Angiology. 2003. 54. (5). 531-539.
24. Choi D.B., Cha W.-S., Park N. et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris* // Bioresour. Technol. 2011. 102. (3). 3279-3285.
25. Efficacy and Safety of Natto Extract. Clinical trial NCT00447434. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00447434?term=NCT00447434&rank=1>.
26. Effect of natto diet on blood pressure // Basic and Clinical Aspects of Japanese Traditional Food Natto II. Japan Technology Transfer Association (JTTAS) / Eds.: M. Maruyama, H. Sumi. Tokyo, 1998. 1-3.
27. Fujita M., Hong K., Ito Y. et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat // Biol. Pharm. Bull. 1995. 18. (10). 1387-1391.
28. Fujita M., Hong K., Ito Y. et al. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract // Biol. Pharm. Bull. 1995. 18. (9). 1194-1196.
29. Hsia CM, Shen M.C., Lin J.S. et al. Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects // Nutr. Res. 2009. 29. (3). 145-220.
30. Hsu R.L., Lee K.T., Wang J.H. et al. Amyloid-degrading ability of nattokinase from *Bacillus subtilis natto* // J. Agric. Food Chem. 2009. 57. (2). 503-508.
31. Kim J.Y., Gum S.N., Paik J.K. et al. Effects of nattokinase on blood pressure: a randomized, controlled trial // Hypertens. Res. 2008. 31. (8). 1583-1588.
32. Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. 97.(15). 6647-6665.4
33. Lampe B.J., English J.C. Toxicological assessment of nattokinase derived from *Bacillus subtilis* var. *natto* // Food Chem. Toxicol. 2016. 88. 87-99.
34. Lee A.J., Mowbray P.I., Lowe G.D. et al. Blood viscosity and elevated carotid intima-media thickness men and women: The Edinburgh Artery Study // Circulation. 1998.97. 1467-1473.
35. Mahajan P.M., Nayak S., Lele S.S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization // J. Biosci. Bioeng. 2012. 113. (3). 307-314.
36. Majumdar S., Sarmah B., Gogoi D. et al. Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B // Biochimie. 2014. 103. 50-60.
37. Mine Y., Wong A.H.K., Jiang B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods // Food Res. Int. 2005. 38. (3). 243-250.
38. Mukherjee A.K., Rai S.K., Thakur R. et al. Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, directacting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits *in vivo* anticoagulant activity thrombolytic potency // Biochimie. 2012. 94. (6). 1300-1308.
39. Nattokinase Atherothrombotic Prevention Study (NAPS). Clinical trial NCT02080520. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02080520?term=NCT02080520&rank=1>.
40. Ogasawara K., Inoue K., Park S. et al. Effects of nattokinase on blood pressure: a randomized, controlled trial // Hypertens. Res. 2008. 31. (8). 1583-1588.
41. Peng Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. 69. (2). 126-132.
42. Simkhada J.R., Cho S.S., Mander P. et al. Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel *Streptomyces* enzyme on carra-реепап-induced mice tail thrombosis model // Thromb. Res. 2012. 129. (2). 176-182.
43. Spreer A., Ruchel R., Reichard U. Characterization of an extracellular subtilisin protease of *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during invasive rhino-orbital mycosis // Med. Mycol. 2006.44. (8). 723-731.
44. Suzuki Y., Kondo K., Ichise H. et al. Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening // Nutrition. 2003. 19. (3). 261-264.
45. Suzuki Y., Kondo K., Matsumoto Y. et al. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery // Life Sci. 2003. 73. (10). 1289-1298.
46. Tai M.W., Sweet B.V. Nattokinase for prevention of thrombosis // Am. J. Health Syst. Pharm. 2006. 63.(12). 1121-1123.
47. Vaidya B., Nayak M.K., Dash D. et al. Development and characterization of highly selective target-sensitive liposomes for the delivery of streptokinase: *in vitro/in vivo* studies // Drug Deliv. 2016. 23. (3). 801-807.
48. Wang C., Ji B., Cao Y et al. Evaluating thrombolytic efficacy and thrombus targetability of RGDS-liposomes encapsulating subtilisin FS33 *in vivo* // Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2010. 27. (2). 332-336. [In Chinese].

49. Wang C.T., Ji B.P. Li B. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. 33. (9). 750-758.
50. Wang S., Deng Z. Li Q. *et al.* A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica* // *Corp. Biochem Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2011. 159.(1). 18-25.
51. Yan F. Yan J., Sun W. *et al.* Thrombolytic effect of subtilisin QK on carrageenan induced thrombosis model in mice // *J. Thromb. Thrombolysis.* 2009. 28. (4). 444-448.