

## ОБЗОРЫ

УДК 612. 115 12. 577. 112. 089

© Таран

### АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА И ТРОМБОЛИТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ.

*Л.Д.Таран*

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, 01601 Украина, Киев,  
ул.Леонтовича 9; тел./факс-(044)234-90-56, эл.почта: taran48@yandex.ru

В обзоре представлены данные о механизме активации плазминогена тканевым активатором, стрептокиназой и урокиназоподобными активаторами. Показана регуляторная роль фибрина в активации плазминогена тканевым активатором, обладающим прямым сродством к фибрину и стрептокиназой и урокиназоподобными активаторами, не обладающими прямым сродством к фибрину. Представлена также информация о создании новых активаторов плазминогена. Дискутируются результаты исследований мутантных производных активаторов плазминогена, полученных технологией рекомбинантных ДНК. Представлены результаты исследований химерных (гибридных) форм активаторов плазминогена и их конъюгатов, полученных химическими методами. Проанализирована тенденция в поиске активаторов плазминогена. Охарактеризовано новое направление в исследовании активаторов при их одновременном введении и дальнейшее развитие методов тромболитической терапии.

**Ключевые слова** активаторы плазминогена, рекомбинантные формы, химические конъюгаты, химерные формы, фибринолитическая активность, тромболизис.

**ВВЕДЕНИЕ.** Уже многие десятилетия сердечно-сосудистые заболевания держат первенство по распространенности [1]. Причина таких заболеваний кроется прежде всего в напряженном ритме современной жизни, сопровождающемся стрессами, в отсутствии должного внимания к вопросам экологии и медицинского обслуживания. Это в первую очередь объясняется экономическим кризисом, разразившемся в странах СНГ после распада СССР. Однако, даже в наиболее развитых странах мира доля летальных исходов от сердечно-сосудистых заболеваний составляет в общем показателе смертности 36-39% в основном за счет инфаркта миокарда [2]. Все это вызвало необходимость проведения биохимических исследований, позволяющих раскрыть суть процессов, лежащих в основе тромбообразования и предложить эффективные тромболитические препараты. Благодаря применению современной внутривенной тромболитической терапии при остром инфаркте миокарда удалось снизить смертность на 24-27% [2]. Необходимо отметить, что развивается и хирургическое направление в этой области [1]. Операции на сердце уже никого не удивляют и с каждым годом совершенствуются. Естественно, эффективные тромболитические лекарственные препараты обладают несомненным

преимуществом перед оперативным вмешательством.

В настоящем обзоре приведены сведения об используемых в мировой медицинской практике тромболитиках, их достоинствах и недостатках. Проанализированы пути дальнейшего развития и совершенствования тромболиза. Обобщены результаты биохимических и биомедицинских исследований по созданию высокоэффективных тромболитических агентов.

#### 1. Активация плазминогена стрептокиназой.

В качестве тромболитиков используют, главным образом, активаторы плазминогена (АП) и их модифицированные формы. Это связано с тем, что плазминоген (ПГ) является предшественником плазмина (ПМ) - фермента, осуществляющего лизис тромба *in vivo* [3-6]. В структуре нативной формы ПГ (Глу-ПГ) можно выделить три участка [7]:  $\text{NH}_2$ -концевой пептид, который отщепляется при активации ПГ физиологическими активаторами и стрептокиназой (СК), пять доменов, соответствующих пяти гомологичным крингловым структурам, которые играют важную роль при взаимодействии ПГ с фибрином,  $\alpha_2$ -антиплазмином и с известными ингибиторами фибринолиза - аминокaproновой кислотой (6-АГК) и ее аналогами и С-концевая часть молекулы, которая при активации ПГ после расщепления связи  $\text{Arg}_{561}$ - $\text{Val}_{562}$  становится протеазным доменом ПМ [8,9].

Одной из первых в клинике стала применяться СК [10,11], которая не является физиологическим активатором ПГ. Это белок, с молекулярной массой 47 кДа, который продуцируется гемолитическими стрептококками; он состоит более чем из 400 аминокислотных остатков [12]. Известно, что одноцепочечная молекула СК не имеет дисульфидных связей и состоит из трех доменов, которые обозначаются, начиная с  $\text{NH}_2$ -концевой части молекулы, как  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\chi$  [13]. Особенностью этого активатора является отсутствие энзиматической активности наряду со способностью превращать ПГ в ПМ. Кроме того, он обладает видовой специфичностью: этот фермент способен активировать ПГ человека, кошки, собаки, кролика, но не действует на профермент быка и лошади [14]. В настоящее время считают, что СК образует стехиометрический комплекс с ПГ (и ПМ), который обладает активаторным действием на ПГ [15]. Установлено, что активный центр локализован в плазминогеновой, а не стрептокиназной части комплекса [16]. При взаимодействии Глу-ПГ со стехиометрическими количествами СК сначала Глу-ПГ превращается в Глу-ПМ, а затем Глу-ПМ превращается в Лиз-ПМ при отщеплении  $\text{NH}_2$ -концевого пептида [17]. Фибриноген и фибрин ускоряют активацию Глу-ПГ СК, при этом активатор не обладает способностью связываться ни с фибриногеном, ни с фибрином [18]. В настоящее время считают, что активация Глу-ПГ СК происходит по уникальному механизму, включающему конформационные преобразования в молекуле профермента при его взаимодействии со СК в результате чего происходит образование активного каталитического центра в отсутствие протеолиза [19,20]. В дальнейшем, механизм неэнзиматического превращения ПГ в ПМ под действием СК был исследован более детально [21-23]. Нативная форма ПГ находится в компактной конформации, обусловленной внутримолекулярным взаимодействием  $\text{NH}_2$ -концевого пептида с кринглами 4 и 5. Отщепление  $\text{NH}_2$ -концевого пептида в молекуле Глу-ПГ приводит к переходу ПГ из компактной конформации к более объемной, которая реализуется в молекуле Лиз-ПГ. Разрушение внутримолекулярного взаимодействия в молекуле Глу-ПГ 6-АГК или ее аналогами также приводит к переходу Глу-ПГ от компактной к объемной конформации, но эта конформация не идентична объемной конформации Лиз-ПГ. Предпочтительное связывание СК с объемной конформацией Глу-ПГ по сравнению с компактной конформацией обуславливает такой переход Глу-ПГ посредством взаимодействия со СК по лизинсвязывающим участкам, что приводит к образованию комплекса ПГ-СК. Как было установлено, механизм

конформационной активации предполагает введение остатка Илей<sub>1</sub> аминокислотной последовательности СК в положение Вал<sub>562</sub> аминокислотной последовательности ПП и это действует как триггер, инициирующий поступательное движение Глу-ПП к объемной конформации и рассматривается как ранняя стадия активации. В дальнейшем происходит стабилизация активного белка, как результат высокого сродства СК к активной конформации каталитического домена.

В настоящее время СК – наиболее дешевый тромболитик, который широко используется в медицинской практике [24,25]. Если в течение четырех часов при введении СК в кровяное русло при инфаркте миокарда удавалось достичь проходимости поврежденной артерии, то смертность снижалась от 81% до 23%. Однако, СК не обладает фибриноспецифичностью действия и весьма антигенна. Из-за отсутствия способности связываться с фибриновым сгустком, использование этого агента сопровождается заметным истощением белков плазмы и, прежде всего, фибриногена, что в некоторых случаях полностью парализует процесс свертывания и приводит к летальному исходу. Кроме того, использование СК часто приводит к аллергиям из-за ее антигенности и в 15-17% случаев наблюдается реокклюзия, а время полувыведения ее из кровотока составляет лишь 15-25 минут.

## **2. Активация плазминогена урокиназой.**

Урокиназа (УК) – физиологический активатор ПП, который также давно используется в медицинской практике в качестве тромболитика. Ее выделяют из мочи человека, из культуры почечных клеток эмбриона человека, а также методами гепной инженерии [26,27]. Механизм активации Глу-ПП УК установлен [28]. На первой стадии активатор катализирует расщепление Арг<sub>561</sub>-Вал<sub>562</sub> связи в молекуле профермента, что приводит к образованию Глу-ПМ. Затем Глу-ПМ превращается в Лиз-ПМ в результате отщепления NH<sub>2</sub>-концевого пептида. УК не обладает специфическим сродством к фибрину [29-31]. Если фибриновый сгусток образовать в присутствии УК, то из него экстрагируется лишь 6% активности активатора. Присутствие фибриногена или фибрина увеличивает активаторную активность УК. При этом, ни фибриноген, ни фибрин не влияют на активность и специфичность УК или на активность ПМ. Следовательно, ускорение активации Глу-ПП следует отнести на счет конформационных изменений, происходящих при его взаимодействии с фибриногеном или фибрином. Именно поэтому Лиз-ПП активируется с большей скоростью по сравнению с нативным ПП, а наличие или отсутствие фибрина не влияет на активацию этой формы ПП. Показано, что предполагаемые конформационные изменения в молекуле Глу-ПП при его активации УК в присутствии лизина приводят к увеличению сродства активатора к проферменту в 10 раз [32].

УК секретируется в кровоток в виде профермента проурокиназы (ПУ) [24]. При расщеплении связи Лиз<sub>158</sub>-Илей<sub>159</sub> ПМ происходит образование активного двухцепочечного активатора. NH<sub>2</sub>-концевая часть молекулы содержит домен, гомологичный эпидермальному фактору роста, и крингловый домен, а С-концевая часть – каталитический домен, который чувствителен к необратимому ингибированию ингибитором активатора ПП 1 (ИАП-1). Это высокомолекулярная форма УК. В дальнейшем при расщеплении связи Лиз<sub>135</sub>-Лиз<sub>136</sub> под воздействием ПМ происходит образование двухцепочечной низкомолекулярной формы УК, которую также необратимо ингибирует ИАП-1.

В клинической практике используют обе формы УК [33]. Несмотря на значительное снижение смертности при использовании УК при остром инфаркте миокарда (сравнимо с действием СК) и отсутствием антигенности, в этом случае также выявлены осложнения. Так, примерно, в 30% случаев через 1,5 часа после введения тромболитика не удается достичь проходимости поврежденной артерии, а частота реокклюзии составляет 10%. В некоторых случаях наблюдаются также

геморрагии, а время полувыведения УК из кровотока составляет лишь 15-20 мин.

### 3. Активация плазминогена тканевым активатором.

Тканевой активатор плазминогена (ТАП) является физиологическим АП, который отличается от УК биохимическими и иммунохимическими свойствами и, прежде всего, большей эффективностью активации профермента на фибриновом сгустке [34]. Этот тип активатора обнаружен в плазме, различных тканях организма человека и животных, в растворах после перфузии сосудов нижних конечностей трупов [35-37]. ТАП секретируется эндотелиальными клетками в кровоток в виде одноцепочечного гликопротеина с молекулярной массой = 70 кДа. Молекула нативного активатора состоит из нескольких доменов, которым присущи различные функции [38]: пальцеобразный домен ответственен за связывание с фибронектином, этот же домен и домен, соответствующий кринглу 2, ответственны за связывания с фибрином [39,40], домен, гомологичный эпидермальному фактору роста, - за рецепторное связывание с клетками печени и ускоренный клиренс, а домен, соответствующий кринглу 1, важен для связывания с рецепторами эндотелиальных клеток. Эти домены расположены в NH<sub>2</sub>-концевой части молекулы. С-концевая часть содержит потенциальный протеазный домен, который после ограниченного протеолиза ПМ пептидной связи Арг<sub>275</sub>-Илей<sub>276</sub> превращается в каталитический домен двухцепочечной формы активатора, содержащий в своей последовательности участок связывания с ИАП-1. Это соответствует превращению одноцепочечной формы активатора, который в норме практически не активен, в двухцепочечную. В присутствии фибрина (или тромба) обе формы ТАП со сходной эффективностью катализируют превращение ПГ в ПМ [41]. Для клинических целей используется преимущественно одноцепочечная форма рекомбинантного активатора, (коммерческое название активатора или альтеплаза). Технология рекомбинантных ДНК позволила достичь масштабированного производства ТАП.

Общепринятой точкой зрения на механизм активации ПГ в присутствии фибрина этим типом активатора является представление о связывании молекулы ТАП с поверхностью сгустка и последующим присоединением молекулы ПГ с образованием тройного циклического комплекса [42]. Кинетическими исследованиями *in vitro* было установлено, что эффективность активации Глу-ПГ и Лиз-ПГ в присутствии фибрина увеличивается в 700 и 1000 раз соответственно по сравнению с активацией в тех же условиях, но в отсутствие фибрина, (в результате снижения K<sub>m</sub>). В дальнейших исследованиях [43] в условиях, исключающих гидролиз фибрина, было показано, что эффективность активации обеих форм ПГ определяется, главным образом, стабильностью тройного циклического комплекса. Установлено, что в ходе активации ПГ ТАП на фибриновом сгустке последовательно образуются два активаторных комплекса, соответствующих двум фазам активации [44]: первой - с относительно слабой эффективностью активации [45,46] и второй, связанной с частичным гидролизом образующимся ПМ фибринового сгустка и высвобождением С-концевых остатков лизина. Дополнительное связывание по этим остаткам Глу-ПГ в измененной конформации обеспечивает большее сродство ТАП к проферменту и, следовательно, большую эффективность активации [47-49]. Образующийся на первой стадии ПМ катализирует превращение Глу-ПГ в Лиз-ПГ и одноцепочечной формы активатора в двухцепочечную форму [50,51]. Первая фаза активации начинается после отщепления фибринопептидов А от фибриногена и образованием протофибрилл, вторая - после начальной деградации полимерного фибрина образующимся ПМ [52]. На первой стадии образование активаторного комплекса происходит, по-видимому, с участием αС доменов, которые аффинно связывают и ПГ и ТАП; частичное же отщепление этих доменов приводит к переходу реакции во вторую стадию [53]. На второй стадии активаторный комплекс образуется на междоменных

суперспирализованных участках, прилегающих к ДЕД-триаде [54].

Что касается результатов биомедицинских и клинических исследований по применению рекомбинантного ТАП в качестве тромболитического препарата, то с сожалением пришлось констатировать, что характер и величина осложнений после введения тромболитика была сравнима в этом случае с результатами, полученными при использовании СК и УК [33]. Частота реперфузии через 1,5-3 часа после введения ТАП составляет примерно 60-70%, частота реокклюзии – 20%; наблюдаются также геморрагические осложнения. Время полувыведения тромболитика из кровотока оказалось незначительным, составляя 4-8 мин. И это при гораздо более высокой стоимости лечения. Основная причина наблюдаемых осложнений в этом случае объясняется, по-видимому, необходимостью введения значительных доз ТАП (50-100 мг) по сравнению с физиологическими концентрациями, прежде всего, в связи с незначительным временем пребывания его в кровотоке. Это объясняют необратимым ингибированием ТАП ИАП-1 [24]. Необходимо иметь в виду, что экспрессия мРНК антигена ИАП-1 повышена в эндотелиальных клетках атеросклеротических коронарных артерий [55]. То есть снижение фибринолитической активности при коронарной болезни связано с повышением уровня ИАП-1, который коррелирует с увеличением концентрации триглицеридов, инициирующих секрецию ингибитора. [56].

Необходимость введения значительных количеств ТАП при тромботической терапии, вероятно, также обусловлена снижением эффективности активации ПГ ТАП при патологии.

Эффективность активации, вероятно, снижается в результате ингибирования этого процесса тромбин активированным ингибитором фибринолиза (ТАИФ), активная форма которого (ТАИФа) катализирует отщепление С-концевых остатков лизина в фибрине, важных на второй, наиболее эффективной стадии активации ПГ этим типом активатора [47-49]. При образовании фибринового сгустка в плазме наблюдается увеличение концентрации ТАИФа. При проведении тромболитической терапии ТАП с предварительным введением ингибитора ТАИФа обнаружено значительное усиление лизиса тромба или уменьшение количества ТАП, необходимого для достижения максимальной фибринолитической активности [57]. В опытах *in vitro* показано [58,59], что ковалентная модификация фибринового сгустка фактором XIIIa, то есть прошивка сгустка по  $\chi$  и  $\alpha$  цепям и ковалентное включение в сгусток фибронектина (моделирование ситуации *in vivo* при патологии) значительно снижает эффективность активации ПГ этим типом активатора (более, чем на порядок), главным образом, за счет увеличения  $K_m$  [60]. Это свидетельствует о том, что, вероятно, при тромболитической терапии ТАП введение его непомерно больших количеств обусловлено еще и дефицитом свободного ПГ, так как известно [1], что примерно 65% ПГ плазмы находится в комплексе с другими белками. Поэтому в норме только 5% ПГ способен связываться с фибрином и активироваться ТАП, а при патологии возникает дефицит свободного ПГ из-за снижения  $K_m$  реакции активации. В экспериментах на животных [1] морским свинкам вводили в вену тромб, образованный *in vitro* и меченный флуоресцинизотиоцианатом. Параметры фибринолиза определяли при введении проазина (агента, вызывающего секрецию ТАП) и ПГ. Разницу в увеличении фибринолитической активности и пролонгированности действия между опытами с последовательным введением ПГ и проазина, или только проазина устанавливали по нарастанию фибринолитической активности в эоглобулиновой фракции и по увеличению продуктов деградации фибрина в образцах крови. При этом уровень активности ПМ, содержание фибриногена и продуктов деградации фибриногена свидетельствовали об отсутствии системных осложнений при одновременном введении либератора и ПГ. В этом случае был также отмечен эффект пролонгированного действия тромболитика (до 120 мин). Таким образом, есть

основания полагать, что введение дополнительных количеств ПГ при терапии ТАП позволит уменьшить концентрацию вводимого активатора и тем самым снизить системные осложнения и добиться пролонгированности его действия. Следует отметить также, что введение больших доз ТАП полностью ингибирует профибринолитическую функцию протеина Са, вытесняя его из комплекса с ИАП-1 [61-63].

#### 4. Активация плазминогена проурокиназой.

Несколько позже ТАП биомедицинским и клиническим исследованиям подверглась проурокиназа (ПУ) - физиологический активатор ПГ урокиназного типа. В клинике при остром инфаркте миокарда используют ее рекомбинантную форму под названием саруплаза [33]. ПУ представляет собой гликопротеин с молекулярной массой = 55кДа [24]. Расщепление ПМ пептидной связи Лиз<sub>158</sub>-Илей<sub>159</sub> в молекуле ПУ соответствует превращению ее в УК, которая реагирует с протеазными ингибиторами плазмы и энзиматически более активна. В норме каталитическая активность ПУ составляет 0,4-6% от активности УК. Она была первоначально выделена из мочи человека [64], из культуры клеток различных типов [65], а также из плазмы, где ее концентрация составляет 5 нг в мл [66]. ПУ лишь слабо гидролизует небольшие амидные субстраты и практически не чувствительна к синтетическим ингибиторам и протеазным ингибиторам плазмы, что позволило отнести ее к проферменту [67]. В отличие от ТАП и УК она резистентна к необратимому ингибированию ИАП-1 [24]. При исследовании активации ПГ ПУ *in vitro* было установлено [68], что она описывается последовательностью трех реакций и подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен. На первой стадии происходит активация ПГ до ПМ с  $K_m = 0,4$  мкМ и  $k_{кат.} = 0,02$  сек.<sup>-1</sup>, вторая стадия соответствует превращению ПУ под действием ПМ (образовавшегося на первой стадии) в УК с  $K_m = 3,3$  мкМ и  $k_{кат.} = 1,2$  сек.<sup>-1</sup> и, наконец, третья стадия соответствует активации ПГ УК, образовавшейся на второй стадии с  $K_m = 50$  мкМ и  $k_{кат.} = 1,0$  сек.<sup>-1</sup>. В опытах *in vitro* установлено, что превращение ПУ в УК составляет важный начальный этап растворения фибрина, так как фибринолитическая активность ПУ на 2-3 порядка превосходит эффект мутантной негидролизуемой ПМ формы ПУ и в 2-5 раз эффективнее УК в тех же условиях [69]. То есть, в плазме в отсутствие фибрина ПУ стабильна, но в присутствии фибринового сгустка ПУ, но не УК, индуцирует специфический лизис фибрина. Известно [24], что ИАП-1 конкурентно ингибирует ПУ в плазме, но как только происходит взаимодействие ПУ в комплексе с ПГ на фибрине - ингибитор освобождается. Следует отметить, что механизм специфической активации ПГ ПУ на фибриновом сгустке окончательно не установлен, так как активатор не обладает непосредственным сродством к фибрину [70]. ПУ обнаружила более высокую специфическую тромболитическую активность по сравнению с УК при исследованиях в присутствии сгустка плазмы [71] и в модельных опытах на животных [72]. На интактном фибрине она оказалась слабым активатором ПГ, но в результате частичного гидролиза фибрина образующимся ПМ, ПУ обладала активаторным потенциалом ТАП по отношению к ПГ [67]. Установлено, что частично деградированный фибрин представляет собой контактную поверхность, способную стимулировать активацию ПУ (до 20-25% от активности УК) для активации ПГ, связавшегося по С-концевым остаткам лизина на деградированном фибрине. Показано, что фрагменты молекулы фибрина при их связывании с Глу-ПГ замечают стимулируют активацию профермента ПУ, очевидно, в результате конформационных преобразований, происходящих при связывании ПГ [73]. Эффективность активации Глу-ПГ ПУ в присутствии частично деградированного фибрина была сравнима с таковой для УК в растворе в отсутствие фибрина. При этом, фибриноспецифичность ПУ не требует превращения ПУ в УК или перехода Глу формы ПГ в Лиз форму, а является, по-видимому, следствием дополнительного связывания ПГ к частично

деградированному фибрину. Именно поэтому ПУ можно считать функциональным физиологическим активатором ПГ в плазме. Роль же незначительных количеств УК, обнаруженных в плазме (99 нг в мл), каталитическая эффективность которых значительно выше по сравнению с ПУ в отсутствии фибрина и стимулируется фибрином, заключается в индуцировании образования ПМ, вызывающего частичный лизис фибринового сгустка [74]. Способность ПУ лизировать фибриновый сгусток, не затрагивая при этом фибриноген, уже описана [73].

Результаты клинических испытаний саруплазы обнаружили, тем не менее, необходимость введения ее в значительных количествах, что, естественно, сказалось на стоимости лечения (большей, чем в случае использования ТАП), а также на возникающих после терапии этим тромболитиком осложнениях, присущих ранее используемым активаторам ПГ [33]. Время полувыведения ПУ из кровотока тоже оказалось незначительным - 6-10 мин. Одной из причин следует, очевидно, считать ингибирование процесса активации ПГ ПУ на частично деградированном фибрине ТАИФа и дефицит свободного ПГ плазмы. Подтверждением этого предположения послужили опыты по одновременному введению ПУ и ПГ [75], что дало возможность доставить активатор к очагу поражения и восполнить дефицит ПГ. Эффект введения Лиз-ПГ (5% от общей концентрации ПГ в плазме) в смеси с ПУ оказался выше, чем при использовании смеси Глу-ПГ с ПУ или просто ПУ. При этом не было отмечено сколько -нибудь значительного расщедования  $\alpha_2$  - антиплазмина, что указывало на практически полное отсутствие активации ПГ плазмы в отличие от аналогичных опытов с использованием СК и УК.

#### **5. Тромболитики на основе СК.**

Следует упомянуть еще о двух тромболитиках, используемых в настоящее время в клинической практике. Оба препарата получены путем химической модификации СК.

Поддерживать заметную фибринолитическую активность в кровотоке удалось с использованием ацилферментов [76]. Так анизилированием по активному центру комплекса ПГ-СК [77], активность которого *in vivo* восстанавливалась благодаря медленному деацелированию, получен тромболитический препарат под названием апсак (эминаза, анистреплаза). В модельных опытах на животных показано, что такой препарат может обеспечить меньшую степень деградации фибриногена по сравнению с использованием УК и СК. При этом удалось увеличить время полувыведения активатора из кровотока до 50-90 мин. [33]. Тем не менее, остается угроза возникновения аллергических реакций, наблюдаются геморрагические осложнения, частота реокклюзии составляет 10%, а цена препарата примерно в три раза превышает стоимость СК. Частота достижения реперфузии не отличается от случаев применения уже используемых тромболитиков.

В результате модификации СК растворимым альдегидодекстраном получен препарат стрептодеказы [33]. Таким образом удалось добиться пролонгированного действия тромболитика, то есть сохранения высокого уровня фибринолитической активности (до 80 часов) без подавления звена коагуляции. Частота реокклюзии составляет в этом случае лишь 5%, частота аллергических осложнений - 2%, частота реперфузии не отличается от случаев применения вышеупомянутых тромболитиков. Кроме того, наблюдаются также случаи геморрагических осложнений. Цена препарата в два раза превышает стоимость СК.

#### **6. Современные направления в разработке тромболитиков нового поколения.**

Таким образом, несмотря на беспрецедентный прогресс в разработке тромболитических препаратов на основе АП, который значительно повысил эффективность тромболитической терапии, с сожалением приходится констатировать, что успехи тромболитизиса оказались неполными. Приблизительно в

30% случаев не удается достичь проходимости поврежденной артерии, а в последующие часы и дни после введения всех используемых тромболитиков в некоторых случаях наблюдается реокклюзия сосуда и геморрагические осложнения. Следует отметить также, что применение наиболее современных тромболитиков, полученных технологией рекомбинантных ДНК (ТАП, ПУ), при их существенно высокой стоимости и значительных средствах, затраченных на производство и испытание, не показало преимуществ в достижении по-настоящему эффективного тромболизиса [78]. Сравнительные клинические испытания ПУ при остром инфаркте миокарда продемонстрировали, что она по показателю смертности в течение 30 суток от начала лечения по крайней мере эквивалентна СК, а по начальным показателям терапии (в интервале 45 мин. – 40 часов) отмечалось, что ПУ эквивалентна ТАП. Такие скромные результаты тромболизиса позволили сделать вывод, что до сих пор идеальный тромболитик не найден, и в этой области наметился заметный кризис. Это, естественно, стимулировало исследования по разработке новых, более совершенных тромболитических препаратов на основе активаторов ПГ [78,79].

В связи с этим, следует остановиться на критериях для разработки и отбора новых активаторов ПГ [80].

Существенным представляется повышение собственной каталитической эффективности АП, позволяющей достичь максимальной скорости лизиса фибринового сгустка и минимальной лаг-фазы фибринолиза.

Очень важно увеличить сродство АП к тромбу, что приведет к локальному образованию ПМ в очаге поражения без активации всей системы фибринолиза.

Важный критерий – увеличение времени пребывания тромболитика в кровотоке при допустимых иммунологических и токсикологических показателях. Это позволит вводить препараты в меньших дозах при продолжительном сохранении и доставке к тромбу фибринолитического потенциала, достаточного для ликвидации патологии.

С этих позиций представляет интерес охарактеризовать основные направления научных биохимических и биомедицинских исследований, направленных на разработку и испытание новых форм АП для использования в тромболитической терапии.

В качестве одного из направлений поиска относительно дешевых тромболитиков, обладающих высокой каталитической эффективностью, следует отметить стафилокиназу. Она состоит из 136 аминокислотных остатков и продуцируется *Staphylococcus aureus* [81,82]. Стафилокиназа не является ферментом, но подобно СК формирует стехиометрический комплекс с ПГ, который затем активирует другие молекулы профермента. Образование активного центра происходит с заметной лаг-фазой, за которой следует экспоненциальная фаза, соответствующая превращению ПГ в ПМ. Стафилокиназа не обладает непосредственным сродством к фибрину, а комплекс ее с ПГ в плазме быстро нейтрализуется  $\alpha_2$ -антиплазмином и это предотвращает активацию профермента не связанного с фибрином. В присутствии фибрина плазмы ПГ (в комплексе со стафилокиназой) связывается с ним по лизинсвязывающим участкам и ингибирование  $\alpha_2$ -антиплазмином не происходит, а доминирует активация профермента на сгустке. Стафилокиназа обладает большей каталитической эффективностью и является более фибриноспецифичным агентом по сравнению со СК. Ее получают также технологией рекомбинантных ДНК [82].

Использование методов генной инженерии позволило не только достичь масштабированного производства природных биологических веществ, но и конструировать путем направленного мутагенеза их модифицированные формы, в которых произведена одна или несколько замен аминокислотных остатков природной последовательности или замены определенных участков в молекуле. Мутантные производные на основе ТАП [83] и ПУ [84] представляют собой АП нового поколения.



Ожидается появление интересных клинических данных по изучению мутантной формы ТАП [78], в структуре которой отсутствует пальцеобразный домен, а также домен, подобный эпидермальному фактору роста и остаток Гли<sub>117</sub> заменен на Асп. Полученное производное отличается от природной формы ТАП увеличением времени полужизни в кровотоке (30-45 мин.) и более эффективным тромболитическим действием на модели тромбоза у кроликов. В качестве примера можно привести еще одно мутантное производное ТАП, получившее название ретеплаза [78]. Это - негликозилированная форма ТАП, у которой удалены пальцеобразный домен, домен, гомологичный эпидермальному фактору роста и домен, соответствующий кринглу 1. Такая модификация обеспечила пролонгацию действия и повышенную каталитическую эффективность мутанта при артериальном тромбозе у собак, меньшее истощение гемостатических белков плазмы. Пролонгированный и быстродействующий эффект ретеплазы был подтвержден у пациентов с острым инфарктом миокарда после двойного болюсного внутривенного введения.

Мутантное производное ПГ [78], превращаемое в ПМ тромбином, получено заменой вблизи расщепляемой связи Арг<sub>561</sub>Вал<sub>562</sub> по позициям R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> и R' на фрагмент R<sub>7</sub>-R' из фактора XI (Грп<sub>363</sub> - Илей<sub>370</sub>) - место действия тромбина. Мутантный ПМ, образованный под действием тромбина, быстро растворяет сгусток *in vivo*. Учитывая относительно длительное пребывание ПГ в кровотоке (2-2,5 сут.) мутантная форма может оказаться эффективным средством устранения тромба, поскольку аминокислотная последовательность подразумевает его активацию по месту развития сосудистых поражений.

Технологией рекомбинантных ДНК экспрессировали укороченную форму ПУ, у которой отсутствует NH<sub>2</sub>-концевая часть молекулы в результате гидролиза пептидной связи Глу<sub>143</sub>-Лей<sub>144</sub> [24]. При этом обнаружили, что селективность по отношению к фибрину такого производного остается на уровне высокомолекулярной формы ПУ. Кроме того, укороченная форма этого активатора оставалась резистентной по отношению к необратимому ингибированию ИАП-1. Для предотвращения превращения ПУ производного в УК, то есть предотвращения расщепления пептидной связи Лиз<sub>158</sub>-Илей<sub>159</sub> в мутантном производном остаток Лиз<sub>158</sub> был заменен на Глу или Гли. Оказалось, что мутантная форма ПУ активирует ПГ с более низкой K<sub>m</sub>, то есть с большей эффективностью по сравнению с природной формой.

Еще одно направление в получении АП нового поколения состоит в получении химических конъюгатов АП с агентами, обладающими высоким сродством к тромбу.

Так был синтезирован химический конъюгат УК с моноклональным антителом (59D8), полученным против синтетического гептапептида, включающего 7 NH<sub>2</sub>-концевых остатков β-цепи фибрина, с помощью сшивки бифункциональным химическим агентом [85]. Моноклональное антитело 59D8 показало способность связываться с мономерным и полимерным фибрином в присутствии фибриногена в опытах *in vitro* и *in vivo* [86]. Конъюгат обнаружил высокое сродство к фибрину и высокую фибринолитическую активность, в 100 раз превышающую активность УК в опытах *in vitro*. Наблюдали также увеличение времени полужизни тромболитика в плазме, что может позволить снизить дозу вводимой УК.

Такой же подход был использован при получении конъюгата на основе ТАП [87]. В результате удалось увеличить сродство конъюгата к фибрину, так как K<sub>d</sub> взаимодействия ТАП с фибрином составляет 0,16 • 10<sup>-6</sup> М, а антитела 59D8 - 0,77 • 10<sup>-10</sup> М, с одновременным увеличением эффективности фибринолиза. Высокое сродство к фибрину, вероятно, увеличивает концентрацию АП на сгустке и приводит к увеличению локальной концентрации ПМ на тромбе. При этом лизис фибрина преобладает над лизисом фибриногена. При активации ПГ в присутствии мономерного фибрина ТАП оказался в 10 раз эффективнее УК, в то время, как оба

конъюгата оказались в 100 раз эффективнее УК в тех же условиях. При испытаниях конъюгатов *in vivo* обнаружили незначительное расходование фибриногена,  $\alpha_2$ -антиплазмина и ПГ, а также значительное увеличение фибринолитического потенциала [88,89].

При помощи ковалентной сшивки бифункциональным химическим соединением был синтезирован также конъюгат биоспецифических антител 59D8 и TCL8 (антитело против ТАП, с  $K_d$  взаимодействия  $5 \cdot 10^{-9}$  М) [24]. Такой конъюгат после введения концентрирует тромболитик на тромбе, и это позволяет увеличить эффективность тромболизиса в 5 раз, что было показано в опытах на кроликах. При этом не обнаружили значительного расходования фибриногена и  $\alpha_2$ -антиплазмина плазмы. Подобные результаты получены для конъюгата с биоспецифическими антителами к фибрину и УК. Необходимость снижения иммуногенности таких производных диктует преимущественное конъюгирование не самих антител, а их фрагментов, без постоянной наиболее иммуногенной области.

На основе СК был получен и исследован АП, который представляет собой активатор, сшитый бифункциональным химическим агентом с рекомбинантным гирудином [90]. Авторы исходили из того, что в процессе формирования сгустка тромбин сорбируется на нем посредством участков, отличных от каталитического центра. Поэтому на сгустке он остается в активной форме и резистентен к инактивации комплексом гепарин-антитромбин. Такой тромбин может вызывать ретромбоз, агрегацию тромбоцитов, стимулировать высвобождение факторов тромбоцитов. Гирудин обладает способностью ингибировать тромбин, связанный с тромбом. Предложенный в этой работе тромболитический агент позволяет увеличить сродство активатора к тромбу, уменьшить количество вводимой СК (СК иммуногенна), пролонгировать терапию. Возможно, использование этого активатора приведет к снижению реокклюзии.

Следует отметить, что тромбоциты играют определяющую роль в тромбозомболических сердечно-сосудистых заболеваниях. Богатые тромбоцитами тромбы весьма резистентны к тромболитической терапии [91], а их скопление может способствовать реокклюзии коронарных артерий, вслед за успешной терапией у пациентов с острым инфарктом миокарда [92]. Введение ингибиторов агрегации тромбоцитов или гирудина, ингибирующего тромбин на сгустке, до введения ТАП, приводит к увеличению скорости реперфузии и предотвращению реокклюзии [93]. Известна также способность тромбоцитов секретировать ИАП-1, который снижает фибринолитический потенциал, что также может способствовать реокклюзии. [93]

На основе ПУ с использованием бифункционального сшивающего агента получены ее конъюгаты с моноклональными антителами, распознающие эпитопы, находящиеся на поверхности активированных тромбоцитов [92]. При исследованиях активации ПГ в присутствии фибрина, обогащенного тромбоцитами, наблюдали 15-кратное уменьшение эффективности активации ПУ, по сравнению с 3-кратным увеличением фибринолитического потенциала в случае использования конъюгатов. Наблюдали также снижение агрегации тромбоцитов, которое зависело от концентрации конъюгатов. Тромболитический потенциал исследуемых конъюгатов по отношению к сгустку плазмы, обогащенной тромбоцитами, на модели легочной эмболии у животных оказался в 2-3 раза выше по сравнению с неконъюгированной ПУ.

Еще одно направление в создании более эффективных АП – получение гибридных молекул, так называемых химер.

Примером может служить гибрид, полученный ковалентным присоединением сульфгидрильной формы  $\text{NH}_2$ -концевого участка тяжелой цепи ПГ (ПМ), определяющей связывание с фибрином, с С-концевым участком тяжелой цепи УК, содержащей активный центр [94]. Химерный активатор обладает большим сродством

к фибрину по сравнению с УК. Активация ПГ гибридом стимулируется растворимым фибрином в 10 раз больше по сравнению с нативным активатором. Аналогичная химера АП получена на основе ТАП [95]. Такой активатор обладал большим сродством к фибрину и большим фибринолитическим потенциалом по сравнению с химерой на основе УК.

Осуществляли также гибридизацию ТАП с УК и ПУ [96]. Химеры АП состояли из  $\text{NH}_2$ -концевой части молекулы ТАП и С-концевой части молекулы ПУ или УК. Сродство к фибрину обоих гибридов оказалось несколько ниже по сравнению с ТАП. Для обеих химер наблюдали стимуляцию активации ПГ в присутствии фибрина.

Следует отметить, что конструирование гибридов приводит к новым видам внутримолекулярных взаимодействий, что может сказаться на эффективности тромболизиса. Кроме того, особую роль приобретает иммунологическая оценка свойств химер, как новых белковых форм. Проблемой в использовании таких форм АП нового поколения является поиск высокопродуктивных способов их получения и усилий по снижению их стоимости.

Химическая модификация рекомбинантных мутантных или гибридных форм АП – еще одно направление в получении высокоэффективных тромболитических агентов.

С целью увеличения времени полувыведения ПУ из кровотока синтезировали химический конъюгат рекомбинантной низкомолекулярной формы ПУ (у нее отсутствует домен, соответствующий эпидермальному фактору роста и крингловый домен в результате расщепления связи Глу<sub>143</sub>-Лей<sub>144</sub>) и альбумина [97]. Известно, что успешному лечению инфаркта миокарда с помощью ПУ препятствует незначительное время пребывания ее в кровотоке, что заставляет использовать для лечения значительную дозу. При введении ПУ в лечебной дозе, она не определяется в плазме больного уже через 2 часа. А при введении конъюгата (5,2 мкг на мл. плазмы) через 3 часа концентрация ПУ составляла 0,9 мкг/мл.

Химическая модификация обратимого ацилированного по активному центру фрагмента молекулы ТАП (последовательность аминокислотных остатков 262-527) и ковалентная сшивка с фрагментом  $\text{NH}_2$ -концевой последовательности ПГ (последовательность аминокислотных остатков 1-544) приводит к 100-кратному увеличению времени полувыведения химерного конъюгированного производного из плазмы и значительному возрастанию эффективности венозного тромболизиса [98].

Следует отметить, что сложившееся представление о триггерной роли ТАП (из-за незначительного времени пребывания в кровотоке) в активации ПГ плазмы на фибриновом сгустке а, возможно, и УК из-за незначительных количеств, присутствующих в плазме, привело к заключению о том, что дальнейшее развитие фибринолизиса связано с активацией ПГ ПУ, сорбирующейся в комплексе с ПГ на специфических участках, появляющихся на деградированном фибрине. Такое комплементарное действие ТАП (или, возможно, и УК), как триггера фибринолиза и ПУ, как агента, поддерживающего фибринолиз, обеспечивает эффективное растворение фибринового сгустка. Эта схема одновременного действия активаторов была апробирована в клиниках на пациентах с диагнозом острый инфаркт миокарда. Одновременное введение активаторов ПГ-УК с ПУ [80] или ТАП с ПУ [78] позволило достичь реканализации, сходной с результатами монотерапии при существенно меньших дозах введения активаторов. Это дало возможность удешевить лечение и снизить процент осложнений. При комбинированном введении АП наблюдается снижение концентрации комплекса тромбин-антитромбин III, что свидетельствует о меньшей вероятности ретромбоза. Кроме того, наблюдается незначительное снижение концентрации фибриногена,  $\alpha_2$ -антиплазмина и ПГ в период лечения и малый промежуток времени, необходимый для восстановления их содержания в плазме, что свидетельствует о тромбоспецифичности действия и снижении

возможных геморрагических осложнений.

Удовлетворительные результаты получены также при использовании комбинированной терапии при введении ТАП и конъюгата УК с фибриногеном [99], что было продемонстрировано в опытах на собаках. В этом случае показано, что введение АП с комплементарным механизмом действия и фармакологически различным профилем достоверно способствует достижению эффективного тромболизиса *in vivo*.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, клиническое использование тромболитиков на основе АП, которое позволило значительно снизить показатель смертности при инфаркте миокарда, однако при этом обнаружился ряд существенных недостатков.

Известно, что примерно в 30% случаев при использовании современных тромболитических средств так и не удается достичь проходимости инфарктсвязанной артерии. Одна из причин заключается в образовании *in vivo* тромбов, обогащенных тромбоцитами, обладающими резистентностью к протеолизу ПМ независимо от типа используемого активатора. Комбинированное введение активаторов – наиболее современная тенденция в тромболитической терапии, не преодолевает этого осложнения, а лишь позволяет несколько снизить количество используемых тромболитических агентов, что удешевляет стоимость лечения. Кроме того, сочетанная тромболитическая терапия лишь снижает, но не преодолевает таких осложнений как реокклюзия коронарных сосудов и геморрагии, которые возникают вслед за успешной тромболитической терапией. Известные из литературы причины возникновения ретромбозов – скопление в сгустке тромбоцитов способных к агрегации и секретированию ИАП-1. Имеет значение также сорбция избытка тромбина на фибрине, который не ингибируется антитромбином III и, высвобождаясь в кровоток после успешной тромболитической терапии, снова увеличивает вероятность свертывания фибриногена.

Кровотечения, возникающие даже при использовании физиологических и наиболее специфичных к тромбу активаторов плазминогена (ТАП и ПУ), объясняются необходимостью введения их в значительно больших по сравнению с физиологическими концентрациями дозах, что приводит к системным осложнениям в результате истощения белков плазмы и, прежде всего, фибриногена. Это доказывает актуальность получения модифицированных форм физиологических активаторов ПГ, обладающих высоким сродством к тромбу и высокой каталитической эффективностью активации, что позволит увеличить фибринолитический потенциал.

Введение больших доз АП обусловлено, прежде всего, незначительным временем полужизни активаторов в плазме. В случае терапии ТАП незначительное время полувыведения его из кровотока связывают с необратимым ингибированием ИАП-1.

Кроме того, существенным является снижение эффективности активации ПГ ТАП при патологии, обусловленное несколькими причинами. Значительный вклад в ингибирование процесса активации вносит ТАИФ, который активируется вслед за образованием тромба. Он катализирует отщепление С-концевых остатков лизина, возникающих на фибрине по мере протеолиза его ПМ, играющих существенную роль на второй, наиболее эффективной стадии активации ПГ этим типом активатора.

Следует отметить также, что в опытах *in vitro* показано значительное снижение эффективности активации ПГ ТАП в случае прошитого по  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепям фибрина и при включении в такой сгусток фибронектина за счет увеличения  $K_m$  более чем на порядок, что в сочетании с опытами на животных подтверждает недостаточность свободного ПГ плазмы для достижения максимальной скорости активации ТАП связанного с фибрином ПГ при патологии.

Есть основания полагать, что использование значительных количеств ТАП при тромболитической терапии объясняется также нейтрализацией

профибринолитической функции АПС, что снижает фибринолитический потенциал.

В случае терапии ПУ (физиологическим и фибриноспецифичным активатором плазминогена) ингибирование активации ИАПГ-1 носит обратимый характер и не влияет на ее эффективность. Очевидно, определяющая роль в ингибировании активации ПГ этим типом активатора на фибриновом сгустке принадлежит ТАИФа, концентрация которого при патологии возрастает. Этот ингибитор значительно снижает эффективность активации ПГ на второй, определяющей стадии активации его на деградированном фибрине, где ПУ *in vivo* отводится основная роль. Возможно, существуют и другие причины, объясняющие необходимость введения значительных доз этого тромболитика.

Все эти соображения приводят к заключению, что комбинированная терапия, основанная на современном представлении о триггерном механизме активации ПГ *in vivo* должна развиваться по линии усложнения с учетом вышеперечисленных отрицательных факторов и использовании существующих направлений в разработке современных тромболитических агентов нового поколения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Кудинов С.А. (2000) Укр. биохим. журн., **72**, 90-98.
2. Sutherland J.E., Persky V.W., Brody J.A. (1990) J.Amer. Med. Assoc., **264**, 3178-3184.
3. Violand B.N., Castellino F.J. (1976) J. Biol. Chem., **252**, 3906-3912.
4. Rickli E.F., Otawsky W.J. (1971) Biochim. Biophys. Acta, **250**, 447-451.
5. Robbins K., Summaria L., Haich B.A. (1967) J. Biol. Chem., **242**, 2333-2342.
6. Wilcox R.J., Olsson C.J., Shent F.M. (1988) Lancet, **2**, 545-554.
7. Iwamoto M. (1975) Thromb. Diath. Haemorrh. **33**, 577-585.
8. Walen P., Kok P., Renby N. (1977) J. Biol. Chem., **252**, 117-128.
9. Davidson D.J., Higgins D.N., Castellino F.J. (1990) Biochemistry, **29**, 3585-3590.
10. Anderson H.V., Willerson J.T. (1993) J. New. Engl. Med., **69**, 703-709.
11. Collen D., Lijnen H.R. (1991) Blood, **78**, 3114-3124.
12. Brokway W.J., Castellino F.J. (1974) Biochemistry, **13**, 2063-2068.
13. Hiaogiang W., Xinli L., Jeffrey L.A. (1998) Science, **281**, 1662-1668.
14. Wulf W.J., Mertz E.F. (1969) Can. J. Biochem., **47**, 929-935.
15. Davies M.C., Englert M.E., Renzo E.C. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2615-2623.
16. Raidy K., Markus C. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. **51**, 672-688.
17. Mc Clintock D.K., Englert M.E., Dsiobkowaki G., Shederker E.H. (1974) Biochemistry, **13**, 5334-5338.
18. Robbins K.C., Summaria L., Haich B.A. (1967) J. Biol. Chem., **242**, 2333-2342.
19. Boxrud P.D., Fay W.P., Bock P.E. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 14579-14589.
20. Wang S., Rul G.L., Hedstrom L. (2000) Eur. J. Biochem., **267**, 3994-4001.
21. Boxrud D.B., Bock P.E. (2000) Biochemistry, **45**, 13974-13981.
22. Lei-Tong L., Huang A., Reed G.L. (2000) Biochemistry, **39**, 4740-4745.
23. Boxrud P.D., Verhamme J.M., Fay W. P., Bock P.E. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 26084-26089.
24. Haber E., Quertermous T., Matsueda G.R., Marschal S.R. (1989) Science, **243**, 51-56.
25. Лапшун В.В. (2000) Автор. дис. кан. мед. наук, Запорожье, Изд-во Госуд. мед. ун-та.
26. Ong E.B., Jonson A.J., Scheellman G. (1976) Biochim. Biophys. Acta, **429**, 252-257.
27. Веремеев К.Н., Кузим А.И. (1984) Вопр. мед. химии, **30**, 13-22.
28. Binder B.R., Beckmann R., Jorg M. (1981) Thrombos. Haemost., **46**, 12-20.
29. Thorsen S., Glas-Glenwalt P., Astrup P. (1989) Thrombos. Diathes. Haemorrh., **261**, 313-324.

# АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА И ТРОМБОЛИТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ

30. *Fears R.* (1989) *Biochem. J.*, **261**, 313-324
31. *Maksimenko A. V., Torchilin V.P.* (1985) *Thrombos. Res.* **38**, 289-295.
32. *Peltz B., Hardt T.A., Mangel W.V.* (1982) *Biochemistry*, **21**, 2798-2804.
33. *Максименко А.В.* (1995) *Мол. биол.*, **29**, 36-60.
34. *Mattsson C., Nyberg-Frrhenius V., Wallen P.* (1981) *Thrombos. Res.*, **21**, 535-545.
35. *Cole E.R., Bachmann F.W.* (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 3729-3757.
36. *Rijken D.C., Wijn Gaards M., Zaal De Long* (1979) *Biochim. Biophys. Acta* , **580**, 140-153.
37. *Aasted B.* (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **621**, 241-254.
38. *Pennica D., Holmes W. E., Kohr W., Harkins R.N.* (1983) *Nature*, №1301, 214-221.
39. *Nechein M.E., Fredenburgh J.C., Larsen J.R.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 21541-21548.
40. *Anton J.G., Horrevertents A.J.G., Smilde A. et.al* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 12639-12644.
41. *Rijken D.C., Heylayerts M.S., Collen D* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 2920-2925.
42. *Heylayerts M.S., Rieken D.C., Lienen H.R., Collen D.* (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2912-2916.
43. *Horrevertents A.J.G., Pannekock H., Nesheim M.E.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2183-2191.
44. *Norman B., Wallen P., Ranby M.* (1985) *Eur. J. Biochem.*, **149**, 193-200.
45. *Rijken D.C., Hoylayerts M.S., Collen D.* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 2920-2925.
46. *Таран Л.Д., Макогоненко Е.М., Назаренко Н.А., Кудинов С.А.* (1986) *Биохимия*, **51**, 1256-1261.
47. *Макогоненко Е.М., Курна С.А., Луговской Э.В. Назаренко Н.А.* (1987) *Биохимия*, **52**, 1746-1752.
48. *Fredenburgh J.C., Nesheim M.E.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 26150-26156.
49. *Suenson E., Lut Zen J., Thorsen S.* (1984) *Eur. J. Biochem.*, **140**, 513-522.
50. *Horrevertents A.J.G., Pannekock H., Nesheim M.PJ.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2176-2182.
51. *Suenson E., Thorsen S.* (1988) *Biochemistry*, **27**, 2435-2443.
52. *Suenson E., Bjerrum P., Holm et. al.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 22228-22237.
53. *Llood D.A., Cederholm-Williams S.A., Shorp A.A.* (1981) *Thrombos. Haemost.* **46**, 163-169.
54. *Дружина Н.Н., Макогоненко Е.М., Яковлев С.А.* (1993) *Доклады АН СССР, Сер.В, №2*, 151-154.
55. *Grancha S., Estelles A., Falko C., Chiraella M.* (1998) *Fibrinolys. Proteol.*, **12**, 53-60
56. *Eruksin P., Hamsten A.* (1997) *Fatty Acids*, **57**, 516-520.
57. *Redetz A., Nicolini F.A., Malycky J.L., Topol F.J.* (1996) *Circulation*, **93**, 1328-1330.
58. *Refino C. J., Schmitt D., Pater C., Eaton D.* (1998) *Fibrinolys. Proteol.*, **12**, 29-31.
59. *Nagashima M., Werner M., Zhad L., Light D.R.* (2000) *Thromb. Res.*, **98**, 337-342.
60. *Druzhina N.N., Yakovlev S.A., Makogonenko E.M.* (1995) *Thrombos. Haemost.*, **73**, 1130-1136.
61. *Rezaie A.R.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 15567-15570.
62. *Fay W.P., Ower W.J.* (1989) *Biochemistry*, **28**, 5773-5778.
63. *Fouw N.J., Noverkate F., Bertina R.N. et. al.* (1986) *Blood*, **67**, 1189-1192.
64. *Husocin S.S., Gurevitch V., Lipinsky B.* (1981) *Thrombos. Haemost.*, **46**, 11-16.
65. *Wun T.C., Ossiwsky L., Reish E.* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 7262-7268.
66. *Wun T.C., Schleuning W.D., Reich E.* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 3276-3283.
67. *Fleury V., Lijnen H.R., Angles-Cano E.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18554-18559.
68. *Collen D., Zamarron C., Lijnen H.R.* (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 1259- 1266.
69. *Sucly M.F., Ellis V., Watakike G., Kakkar V.V.* (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 434-446.
70. *Pannel A., Angles Comno E., Gurevich V.* (1990) *Thrombos. Haemost.* **64**, 556-558.
71. *Lijnen H.R., Wreedi K., Demqrsin T., Collen D.* (1984) *Thrombos. Haemost.*, **52**, 31-32.

72. Gurevich V., Pannel R., Louice S., Kelliy P (1984) *J. Clin. Invest.*, **73**, 1731-1739.
73. Liu J.N., Curevich V. (1992) *Biochemistry*, **31**, 6311-6317.
74. Dederk P.J., Lijnen H. R., Verstreken M. et. al. (1990) *Blood*, **75**, 1794-1800.
75. Badylak S.F., Voytik S.L., Henkin J., Burke S.L (1991) *Thrombos. Res.*, **62**, 115-126.
76. Smith R.A.J., Dupe P.J., English P.D. (1981) *Nature*, **290**, 505-508.
77. Dupe R.J., English P.D., Smith R.A.J. et. al. (1984) *Thrombos. Haemost.* **51**, 248-253.
78. Максименко А.В. (1999) *Биоорг. химия*, **25**, 563-571.
79. Tebbe U., Michels R., Adse Y.J., et. al. (1998) *J. Amer. Coll. Cardiol.* **31**, 487-493.
80. Pinder G., Kolhler M., Sen S. et. al. (1991) *Thrombos. Res.*, **62**, 115-162.
81. Lijnen H.R., Collen D. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 8284-8289.
82. Lijnen H.R., Hoef B.V., De Cock F. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 11826-11832.
83. Short R. (1996) *B. J. Cardiol.* **3**, 89-93.
84. Liu J.N., Tang W., Sun Z.Y et. al. (1996) *Biochemistry*, **35**, 14070- 14076.
85. Bode C., Matsueda G.R., Hui K.G. et. al. (1985) *Science*, **229**, 765-770.
86. Hui K.G., Haber E., Matsueda G.R. (1983) *Science*. **222**, 763-770.
87. Runge M.S., Bode C., Matsueda G.R. et.al. (1988) *Biochemistry*, **27**, 1153-1157.
88. Runge M.S., Bode C., Matsueda G.R. et. al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7659-7664.
89. Collen D., Dewrchin M., Smassen J.M. et. al. ( 1989) *Fibrinolysis*, **3**, 197-203.
90. Phaneuf M.D., Ozakic K., Johnstone M.T. et. al. (1994) *Thrombos. Haemost.*, **71**, 481-487.
91. Jang J.K., Gold H.R., Ziskind A.A. et.al. (1989) *Circulation*, **79**, 920-928.
92. Dewerchin M., Lijnen H.R., Stassen J.M., et. al. (1991) *Blood*, **78**, 1005-1018.
93. Topol E.J. (1998) *Circulation*, **97**, 211-218.
94. Robbins K.C., Tanaka G (1986) *Biochemistry*. **25**, 3603-3611.
95. Robbins K.C., Borewisha A.J. (1987) *Biochemistry*, **26**, 4661-4668.
96. Melles L., Lijnen H.R., Collen D. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 10855-10867.
97. Breton J., Pezzi N., Molirari L. (1995) *Eur. J. Biochem.* **235**, 563-569.
98. Robinson J.H., Browne M.J., Carey J.E. et. al. (1992) *Thrombos. Res.* **86**, 548-552.
99. Максименко А.В. (1998) *Хим. фарм. журн.*, **32**, 37-40.

Поступила: 15. 04. 2003 г.

#### PLASMINOGEN ACTIVATORS AND THROMBOLYTIC THERAPY.

**L.D. Taran**

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Leontovich str. 9, Kiev, 01601  
Ukraine; fax: (044) 234-90-56, e-mail: taran48@yandex.ru

The mechanism of plasminogen activation by streptokinase, tissue and urokinase-type plasminogen activators (PAs) were reviewed. The regulatory role of fibrin in plasminogen activation involving its direct interaction with tissue-type PA and indirect interaction with streptokinase and urokinase-type PAs was demonstrated. Recent information on the development of new PAs is also displayed. The result of studies of PA mutant derivatives synthesized by recombinant DNA techniques are discussed. Data on chimeric (hybrid) forms of PAs and their chemically synthesized conjugates are presented. The trend in search for PAs is analysed. A new direction in the study of PAs for combined plasminogen activation and the further development of the methods of thrombolytic therapy was outlined

**Key words:** plasminogen activators, recombinant forms, chemical conjugates, chimeric forms, fibrinolytic activity, thrombolysis.