Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 677-682.

ЛЕКЦИЯ

УДК 615.355:357.52
©Максименко

ТРОМБОЛИЗИС АКТИВАТОРАМИ ПЛАЗМИНОГЕНА: ПРИМЕНЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ, ПЕРСПЕКТИВЫ И РЕАЛИИ

А.В. Максименко

Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, 3-я Черепковская ул., 15А, 121552 Москва;
тел.: (495)-414-60-25, (495)-414-67-30; факс: (495)-414-66-99;
эл. почта: alexmak@cardio.ru, cclibr@comcor.ru

Физиологические активаторы плазминогена тканевого и урокиназного типа (сериновые протеиназы) зарекомендовали себя действенными агентами тромболитического назначения. Исследования и разработки их новых форм способствовали развитию тромболитической терапии, революционизировавшей лечение острого коронарного синдрома и позволившей существенно снизить показатель летальности. Научно-медицинский прогресс способствовал появлению методов и средств транслюминальной ангиопластики и стентирования, сформировавшими вместе с тромболитическим лечением направление реперфузионной терапии. Накопленные с её помощью результаты и данные биомедицинских разработок новых форм активаторов плазминогена позволили провести сравнительный анализ их развития и выделить особенности, определяющие перспективу дальнейших подходов к получению клинически эффективных активаторов плазминогена тромболитического действия на основе сериновых протеиназ.

Ключевые слова: сериновые протеиназы, активаторы плазминогена тканевого и урокиназного типа, тромбозы, острый коронарный синдром, тромболизис, реперфузия.

ВВЕДЕНИЕ

Использование ферментных препаратов в медицине известно давно и круг этих средств постоянно и неуклонно расширяется. Изучение ферментов как лекарств вызывает длительный и весьма заметный интерес исследователей к этому научно-медицинскому направлению. Значимые усилия для его развития приложили отечественные специалисты. Массовое применение ферментов характерно для гастроэнтерологии. Повышение эффективности лечебного действия биокатализаторов достигается варьированием их состава и последовательным наблюдением за зависимостью терапевтического эффекта от величины используемой дозы. Исследовательские данные по экспериментальной терапии таких патологий как болезнь Альцгеймера, онкологические поражения и другие случаи (диабеты, воспаления, метаболический синдром и т.д.) обоснованно подчеркнули необходимость разработки новых систем доставки лекарства к очагу поражения и модификации самих ферментных средств. Так, для терапии аспарагин-зависимых опухолей исследуется липосомальная форма аспарагиназы. Для внеклеточной антиоксидантной защиты предлагаются конъюгированные формы антиоксидантных ферментов. Сериновые протеиназы составили значимый пул препаратов тромболитической терапии [1, 2]. Внеклеточное терапевтическое действие таких ферментов (активаторов плазминогена) сформировало яркую страницу кардиологии и неотложного лечения случаев острого коронарного синдрома, проявляющегося и в развитии инфаркта миокарда, и приступов нестабильной стенокардии [3, 4].

1. РАЗВИТИЕ СОСУДИСТЫХ ТРОМБОЗОВ

Повреждение сосудистой стенки, разрыв атеросклеротической бляшки, эмболизация сосуда и другое могут приводить к постепенному, а порой и весьма внезапному и быстрому развитию сердечно-сосудистых нарушений. Доминантой их проявления становится закупорка (частичная или полная) кровотока в результате образования пристеночного или окклюзирующего тромба [5, 6]. На завершающих этапах развития сосудистой патологии растворимый белок крови фибриноген под ферментативным действием тромбина превращается в нерастворимый фибрин. Его полимерная сеть насыщается клеточными элементами крови, другими её компонентами, формируя основу для развития тромбов. Их появление ухудшает (снижает) или полностью (окклюзия) блокирует (останавливает) кровоток, приводя к острым сердечно-сосудистым поражениям. Быстрота и полнота их терапевтической ликвидации определяет успехи неотложной кардиологии.

2. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ТРОМБОЛИЗИС В КЛИНИКЕ

Одним из эффективных средств устранения таких сосудистых нарушений стали активаторы плазминогена, обоснованно вошедшие в клиническую практику как тромболитические препараты [1-4]. Исследование их модификации и научно-медицинские разработки [7, 8] определили набор основных тромболитических агентов терапевтического назначения. Сегодня это:

1) рекомбинантный тканевой активатор плазминогена (t-PA, альтеплаза, коммерческое название – Актилизе);

2) рекомбинантная проурокиназа (пуролаза), в которой первые 24 аминокислоты N-концевого домена заменены на 15 чужеродных аминокислот со снижением молекулярной массы продуцируемого производного до 43-46 кДа в сравнении с исходными 54 кДа белка дикого типа [9];

3) укороченная форма тканевого активатора плазминогена (r-PA, ретаваза/ретеплаза, представляющая негликозилированную форму активатора плазминогена тканевого типа с тремя удалёнными доменами);

4) мутантная форма тканевого активатора плазминогена (TNK-t-PA, тенектеплаза/метализе);

5) стрептокиназа [3, 8].

Следует, конечно, отметить, что стрептокиназа относится к первому поколению активаторов плазминогена. Рациональное использование методов генной инженерии способствовало эффективному введению в тромболитическую практику активаторов плазминогена второго и третьего поколения (рис. 1). Результаты их продолжительного клинического использования определили упомянутый выше набор терапевтических тромболитиков, практически применяемых с разными схемами введения [1-4, 10]. Обращает внимание вхождение в клинический обиход форм активаторов плазминогена с уменьшенной или сходной (в сравнении с родительской), а не увеличенной молекулярной массой (укороченные и мутантные виды активаторов плазминогена).

3. ФОРМИРОВАНИЕ РЕПЕРФУЗИОННОЙ ТЕРАПИИ

Успешное введение и закрепление в клинической практике препаратов активаторов плазминогена определило становление и развитие тромболитической терапии. Эффективность её применения ярко проявилась в сокращении интервала времени от появления симптомов поражения до начала терапии, упрощении процедур лечения, быстродействии препаратов, возможности их введения ещё на догоспитальном этапе бригадой скорой медицинской помощи, а в перспективе – и дома (даже посредством самопомощи) [3, 7]. Показатель госпитальной летальности от инфаркта миокарда, благодаря применению тромболитической терапии, был существенно снижен, достигнув уровня 6-8%.

Девяностые годы прошедшего века оказались весьма продуктивными для вхождения в клиническую практику методов и средств транслюминальной (баллонной) ангиопластики и стентирования (рис. 1). Эффективность этих интервенционных (ангиопластика и стентирование) методов восстановления кровотока (реперфузии) базировалась на осуществлении механического воздействия на поражённый участок сосуда и оказалась весьма высокой. Названные тромболитические и интервенционные подходы сформировали эффективно действующую в наше время реперфузионную терапию. В рамках неотложной кардиологии она достоверно и обоснованно занимает одно из центральных мест [1-3].

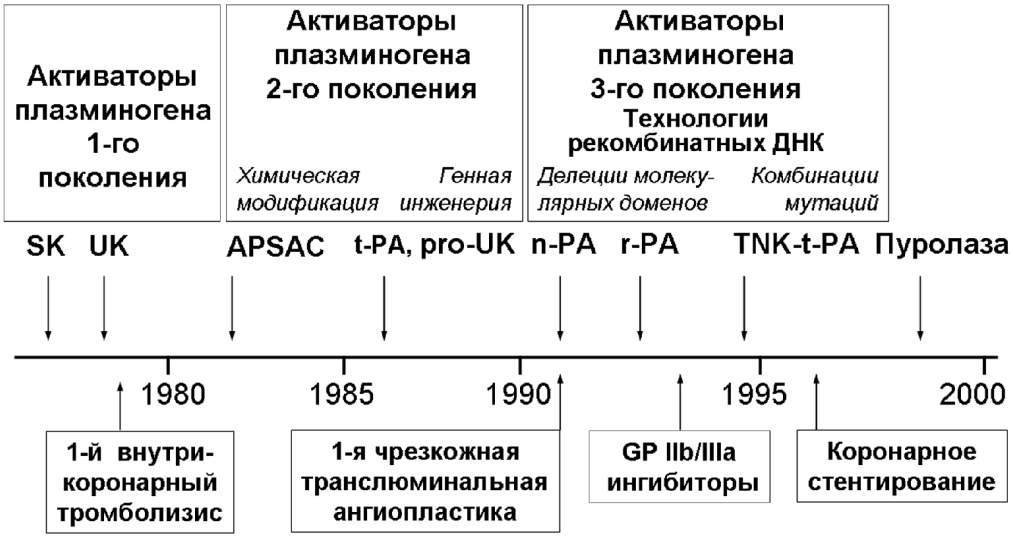

Рисунок 1. Вхождение в клиническую практику тромболитических агентов (активаторов плазминогена разных поколений) и ангиопластических средств (баллонные катетеры, стенты) в ходе формирования и становления реперфузионной терапии. Обозначения: SK - стрептокиназа, UK - урокиназа, APSAC - анизоилированный плазминоген-стрептокиназный активаторный комплекс, t-PA - тканевой активатор плазминогена, pro-UK - проурокиназа, n-PA - ланотеплаза, r-PA - ретеплаза (ретаваза), TNK-t-PA - тенектеплаза (метализе).

В целом, тромболизис и ангиопластика/стентирование, не преувеличивая их конкурентных взаимоотношений (рис. 1), выступают не взаимоисключающими, а взаимодополняющими способами помощи пациенту с острой сосудистой патологией. Такая ситуация определяется наличием и близостью к нему клиник, оснащенных средствами сосудистой ангиопластики и стентирования, действиями бригад скорой медицинской помощи (какова их специализация и квалификация, состав имеющейся в наличии "укладки" и т.п.), своевременным проведением тромболитической терапии (особенно при отсутствии оперативной возможности чрезкожного коронарного вмешательства). В определённых обстоятельствах (рис. 2) применяется комбинация тромболизиса и ангиопластики. При современном состоянии российского здравоохранения (как и для стран с большой и протяжённой территорией) такой подход выглядит вполне перспективным, опираясь на развитие обоих составных частей реперфузионной терапии.

Показатель летальности острого инфаркта миокарда (2012 г.) в Москве 17,4%, в Санкт-Петербурге 20,1%, по РФ ~15,8%, тогда как в сосудистых центрах ~6,3%. Такие данные обоснованно подчеркивают целесообразность акцентированного внимания системы здравоохранения к сосудистой терапии. Действительно, без проведения реперфузионной терапии уровень летальности составляет 16-18%, с выполнением тромболитического лечения 4,6%, чрезкожного коронарного вмешательства 4,4% (2011 г.). Уровень летальности при остром коронарном синдроме в Западной Европе оказывается в два раза ниже, чем в России (15-16%). Этот факт вместе с устойчивым клиническим мнением практиков – для двух третей пациентов с острым инфарктом миокарда тромболитическая терапия может оказаться достаточной – ярко подчеркивает необходимость развития системы здравоохранения, сосудистой медицины и самих тромболитических препаратов – активаторов плазминогена – сериновых протеиназ.

4. ИЗУЧЕНИЕ И ПОИСК НОВЫХ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

Результаты биомедицинских исследований и разработок последовательно пополняли список апробируемых и применяемых в клинике тромболитиков (рис. 1). Далеко не все из них получили дальнейшее распространение по ряду терапевтических показателей (анизоилированный плазминоген-стрептокиназный активаторный комплекс – APSAC, мутеин рекомбинантного тканевого активатора плазминогена – ланотеплаза, n-PA), клиническое применение других (r-PA – ретаваза, TNK-t-PA – метализе, пуролаза) постепенно растёт.

Среди названных активаторов плазминогена, в основном, сериновые протеиназы. Эффект

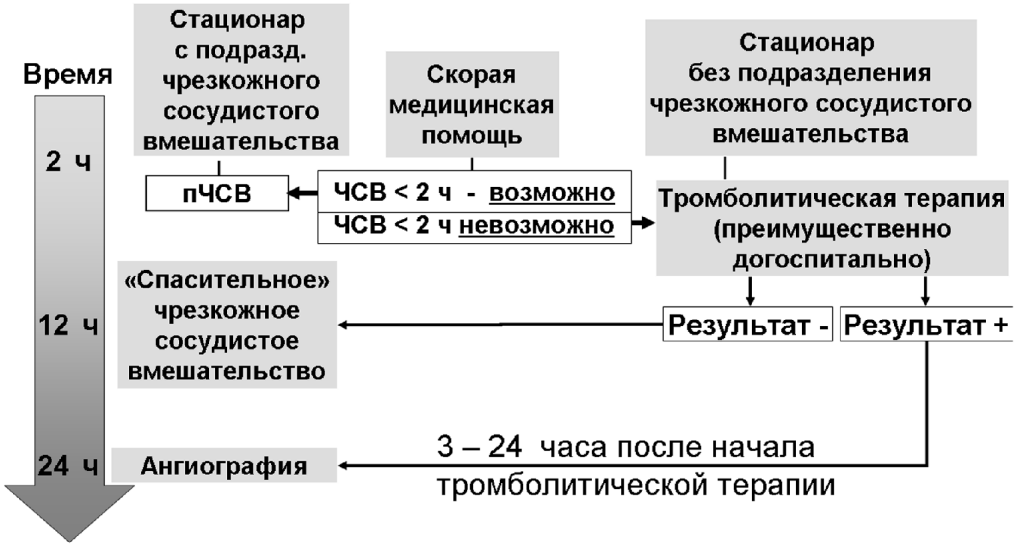

Рисунок 2. Схематическое представление реперфузионной стратегии при поступлении пациента с острым инфарктом миокарда (с подъемом ST - сегмента на ЭКГ) в зависимости от времени, прошедшего с начала развития симптомов поражения. Пациент доставляется бригадой скорой медицинской помощи в стационар, имеющий подразделение, выполняющее чрезкожное сосудистое вмешательство (ЧСВ): если прошло меньше двух часов от начала поражения, выполняется ЧСВ, если же его проведение невозможно (в частности, стационар не имеет подразделения ЧСВ), выполняется тромболитическая терапия и ведется наблюдение за её результатами. При её отрицательных данных, осуществляется “спасительное” чрезкожное сосудистое вмешательство (с выполнением быстрого переезда в соответствующий стационар с подразделением ЧСВ); при позитивных результатах тромболизиса ведется клиническое наблюдение с проведением ангиографии через 24 часа после начала тромболитической терапии (устоявшаяся схема контролирования состояния сосудистой проходимости).

их активирующего воздействия на плазминоген – протеолиз его одной и той же пептидной связи – Arg561–Val562 [8], благодаря чему образуется активная протеиназа – плазмин. Его можно назвать ударным звеном фибринолитической системы, обеспечивающим протеолитическую деградацию фибрина и удаление тромба из очага поражения. Никаких направленных изменений каталитического аппарата активаторов плазминогена проведенные исследования не предполагали. Роль активаторов плазминогена (сериновых протеиназ) – локальная своевременная протеолитическая активация плазминогена для обеспечения эффективной протеолитической деструкции тромботического сгустка плазмином в очаге сосудистого поражения. Исследовательские подходы, объединяющие научных сотрудников различных областей знания, при одинаковом для активаторов плазминогена каталитическом принципе их действия, были сосредоточены на использовании разнообразных механизмов сорбционных взаимодействий и участвующих в них различных биологических агентов для конструирования новых активаторов плазминогена с повышенной эффективностью фибринолитического и тромболитического действия [3, 5, 7, 10, 11].

Так, для достижения поставленных целей активатор плазминогена урокиназного типа конъюгировали через 4-сукцинимидилокси-карбонил-α-метил-α-(2-пиридилдитио)-толуол с моноклональными антителами (RE8F5) против поверхностного мембранного белка эндотелия капилляров лёгких для использования в случае лёгочной эмболии [3]. Биотинилированные эритроциты оказались эффективным носителем биотинилированного активатора плазминогена тканевого типа, ассоциированные через стрептавидин, для тромбопрофилактики церебральных нарушений [7]. Во избежание модификации эритроцитов использовали одноцепочечные антитела против гликофорина А, обильно представленного на поверхности эритроцитов, в составе рекомбинантной белковой формы с низкомолекулярной одноцепочечной урокиназой, селективно активируемой тромбином (scu-PA-T), или с мутеином тканевого активатора плазминогена (кринглдомен 2 и протеазный домен) [3]. Такое конструирование активаторов плазминогена значительно увеличивает время их циркуляции в кровотоке [3, 7, 10]. Расположенные на эндотелии молекулы клеточной адгезии (как молекула тромбоцитарно-эндотелиальной адгезии – PECAM-1) могут служить мишенями

для доставки лекарственных средств. Подтверждение этого было достигнуто в экспериментах, когда рекомбинантный одноцепочечный урокиназный активатор плазминогена с низкой молекулярной массой (lmw-scu-PA) соединялся с одноцепочечным вариабельным фрагментом антител (scFv) к молекуле PECAM-1 [7]. Дальнейшие исследования ответят на вопрос практической значимости названных производных активаторов плазминогена. Развиваемые подходы, следует заметить, ведут к увеличению молекулярной массы получаемых активаторов плазминогена (в сравнении с их родительской формой).

5. ОСОБЕННОСТИ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА В КЛИНИЧЕСКОЙ И ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ПРАКТИКЕ

Приведённые сведения позволяют обоснованно выделить особенность клинического использования активаторов плазминогена третьего поколения и исследовательских данных по поиску новых форм таких средств. Исследовательская практика, обогащается получаемыми биоконъюгатами активаторов плазминогена с увеличенными молекулярными размерами/массой (в сравнении с исходными формами сериновых протеиназ). Используемые в клинической практике тромболитические препараты (такие активаторы плазминогена как ретаваза, метализе) имеют меньшие или сходные молекулярные размеры с родительскими молекулами. Метализе и ретаваза представляют собой, соответственно, рекомбинантные мутантные и укороченные (делеционные) формы тканевого активатора плазминогена и клинически внутривенно вводятся по одно- или двухболюсной схеме. Терапевтическая практика применения антитромболитических биопрепаратов также подтверждает клиническую эффективность антител уменьшенных молекулярных размеров (абсиксимаб и монафрам, соответственно, Fab и $F(ab')_2$ фрагменты моноклональных антител к гликопротеину IIb/IIIa, поддерживающему агрегацию тромбоцитов) [3]. Указанная особенность различия клинической практики и исследовательских подходов ставит перед научными сотрудниками и разработчиками вопрос об оптимальном интервале молекулярных размеров кардиологических биоконъюгатов и важности их контролирования (эндотелий интернализует конъюгаты диаметром 100-300 нм, но не мономолекулярные антитела или конъюгаты микронных размеров [7]). С другой стороны, проявляется и обосновывается конкретный путь практического воплощения исследовательских проектов, а именно, комбинирование доменов/фрагментов белковых компонентов разрабатываемых биоконъюгатов направленного внеклеточного действия либо в форме белковых молекул ограниченного размера, либо наночастиц с их участием, либо сочетанным введением активаторов плазминогена разного типа [10, 12]. Конкретные ответы готовит и даст длительная и трудная дорога экспериментально-клинического изучения активаторов плазминогена и междисциплинарная биомедицинская разработка их новых форм с повышенной эффективностью терапевтического действия на основе сериновых протеиназ и других биокатализаторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несколько десятилетий исследования и клинического применения активаторов плазминогена позволили достоверно выявить успех практического использования для тромболизиса мутантных и укороченных форм сериновых протеиназ. В исследовательских работах доминирующее место занимают производные активаторов плазминогена, превосходящие по молекулярным размерам родительские формы. Такая разнонаправленность данных клинической практики и обширных исследований активаторов плазминогена обоснованно ставит вопрос, – каков продуктивный путь их биомедицинских разработок – в сторону уменьшения или увеличения молекулярных размеров? Сегодняшняя клиническая ситуация достоверно отдает предпочтение мутантным и укороченным производным активаторов плазминогена, а длительное отсутствие в практике тромболизиса производных активаторов плазминогена с увеличенными молекулярными размерами, в сравнении с родительскими формами, говорит о существенном замедлении развития этого подхода. Следует отметить и заметно различающиеся (со стороны исследователей и со стороны клиницистов) доминирующие критерии эффективности терапевтических препаратов. В исследовательской среде преобладает значимость оценки увеличенного сравнительного действия производного в модельной биосистеме, тогда как клиницисты предпочитают ориентироваться на показатели смертности, частоты осложнений, длительности госпитализации, переносимости препарата и т.п. Сближение этих позиций способствует формированию согласованных взглядов и реалистичных оценок перспективности проводимых мультидисциплинарных разработок.

Возможно, их успех будет связан с комбинированием разных доменов/фрагментов активаторов плазминогена в составе одной молекулы или с комбинированным/сочетанным введением компонентов разных активаторов плазминогена. Последовательное изучение таких приемов и подходов может дать внятный ответ на поставленные сегодня вопросы.

Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке грантами РФФИ 12-04-00015 и 12-08-00010, а также Министерством здравоохранения России.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Widimsky P., Coram R., Abou-Chebl A.* (2014) Eur. Heart J., **35**, 147-155.
2. *Lassen J.F., Botker H.E., Terklsen C.J.* (2013) Nat. Rev. Cardiol., **10**, 41-48.
3. *Максименко А.В.* (2012) Acta Naturae, **4**, №3, 76-86.
4. *Huber K., Goldstein P., Danchin N., Fox K.A., Welsh R., Granger C.B., Henry T., Gersh B.J.* (2013) Am. Heart J., **165**, 123-132.
5. *Maksimenko A.V., Tischenko E.G.* (2006) Curr. Med. Chem., **13**, 1617-1625.
6. *Kucher N., Boekstegers P., Muller O., Kupatt C., Beyer-Westendorf J., Heitzer T., Tebbe U., Horstokotte J., Muller R., Blessing E., Greif M., Lange P., Hoffmann R.T., Werth S., Barmeyer A., Hartel D., Grunwald H., Empen K., Baumgartner I.* (2014) Circulation. **129**, 479-486.
7. *Максименко А.В.* (2012) Рос. хим. журн. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), **LVI**, №3-4, 89-96.
8. *Максименко А.В.* (1999) Биоорган. химия, **25**, 563-571.
9. *Белогуров А.А., Бибилашвили Р.Ш., Горюнова Л.Е., Дельвер Е.П., Домкин В.Д., Ефимова Е.П., Рыбалкин И.Н., Савочкина Л.П., Сидоров М.А., Скамров А.В., Ченчик А.А., Шевелев А.Я., Южаков А.А.* (1990) Рекомбинантная плазмидная ДНК PUABC, кодирующая активатор плазминогена урокиназного типа, способ её конструирования и штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент активатора плазминогена урокиназного типа: А.с. СССР 4797901 (патент на изобретение RU 1692151C, 1995).
10. *Lippi G., Mattiuzzi C., Favaloro E.J.* (2013) Sem. Thromb. Haemost., **39**, 48-58.
11. *Maksimenko A.V.* (2002) Med. Sci. Monit., **8**, RA13-RA21.
12. *Maksimenko A.V., Tischenko E.G.* (1999) Thromb. Thrombol., **7**, 307-312.

Поступила: 08. 07. 2014.

THROMBOLYSIS WITH PLASMINOGEN ACTIVATORS: USE AND RESEARCH OF SERINE PROTEINASES, PROMISE AND ACTUALITY

A.V. Maksimenko

Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research-and-Production Complex, 15A, 3-ya Cherepkovskaya str., Moscow, 121552 Russia; tel.: +7-495-414-60-25, +7-495-414-67-30; fax: +7-495-414-66-99; e-mail: alexmak@cardio.ru, cclibr@comcor.ru

Physiological plasminogen activators of tissue and urokinase type (serine proteinases) are effective thrombolytic agents. Research and development of their novel forms contributed to progress of thrombolytic therapy, advanced treatment of acute coronary syndrome and a marked decrease in the lethal index.

Key words: serine proteinases, tissue and urokinase type plasminogen activators, thrombosis, acute coronary syndrome, thrombolysis, reperfusion.