

А. В. Максименко

МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНСАМБЛИ ВНЕШНЕГО И ВНУТРЕННЕГО ФИБРИНОЛИЗА. ПУТИ УСИЛЕНИЯ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

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

Сердечно-сосудистые заболевания остаются одной из наиболее распространенных патологий в индустриальных и развивающихся странах мира [1, 2]. В фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний важная роль принадлежит тромболитическим препаратам, использование которых у больных инфарктом миокарда приводит к существенному снижению смертности [3, 4]. Эффективными препаратами тромболитической терапии являются физиологические активаторы плазминогена, представляющие собой сериновые протеазы тканевого (тканевый активатор плазминогена — t-PA) или урокиназного (урокиназа — UK, проурокиназа — proUK) типа, и белки бактериального происхождения, приобретающие биокаталитические свойства после взаимодействия с плазминогеном (Pmg) или плазмином (Pm) (стрептокиназа — Strk, стафилокиназа — Stph). Эти препараты, называемые часто просто активаторами плазминогена (РА), катализируют расщепление Pmg по связи Arg⁵⁶¹ – Val⁵⁶² с образованием активного Pm, под влиянием которого происходит деградация нерастворимого фибринового сгустка, являющегося сетевой (или “арматурной”) основой тромбов.

Pm (время полужизни в кровотоке 0,1 с) эффективно ингибируется α_2 -антиплазмином (α_2 -AP) и в меньшей степени α_2 -макрोगлобулином (α_2 -MG), а тканевый или урокиназный РА ингибируются в плазме ингибитором активаторов плазминогена первого типа (PAI-1). Фибрин (Fb) выступает не только как субстрат для Pm, но и как поверхность, на которой специфически сорбируются Pmg и t-PA. Под действием пульсирующего давления кровотока Fb может насыщаться РА, не отличающимися заметным сродством к нему. Осуществление фибринолитических превращений на Fb защищает компоненты фибринолитической системы от действия плазменных ингибиторов и усиливает эффект активации Pmg. Такова в общих чертах (рис. 1) схема возможных взаимодействий РА при экзогенном тромболитическом.

Разработка новых эффективных активаторов плазминогена

Клиническое применение первых тромболитических препаратов (фибринолизин — Pm, Strk, UK) обнаружилось не только эффект их прямого действия (локальный тромболитический), но и развитие “гиперлитического” состояния, связанного с чрезмерным активированием фибринолиза по всему сосудистому руслу и подавлением коагуляционного звена системы гомеостаза. Развитие этих и других осложнений (ал-

лергические реакции, внутричерепные кровоизлияния и пр.) направило поиск новых РА в сторону повышения тромбоспецифичности их действия [5]. Естественно, что увеличение тропности РА к биологическому субстрату при их каталитической инертности способствует повышению эффективности локального тромболитического. Этим требованиям удовлетворяет t-PA [6], эффектором действия которого оказался Fb ($K_D \sim 0,14 - 1,40$ мкМ) [7]. В присутствии последнего кажущаяся K_M взаимодействия t-PA с Glu¹-плазминогеном (Glu-Pmg, полноразмерная форма Pmg) снижается более чем на два порядка (с 65 до 0,14 мкМ) [6, 7], что при незначительном изменении $k_{кат}$ существенно ускоряет образование Pm на Fb. Указанные кинетические изменения являются результатом конформационных перестроек t-PA и/или Pmg, индуцированных их прямым взаимодействием с Fb. В клинической практике t-PA оказался высокоэффективным тромболитическим препаратом [8]. К недостаткам t-PA можно отнести громоздкую схему его введения, заметную частоту осложнений и высокую стоимость препарата. С помощью рекомбинантных ДНК, химической модификации, выделения РА из ранее неизвестных источников был получен ряд новых белковых производных [3 – 5, 7 – 14], среди которых в клинической практике используют производные обратимо ацилированного по активному центру плазминоген-стрептокиназного комплекса (апсак, эминаза) [14], одноцепочечные активаторы плазминогена урокиназного типа (proUK, саруплаза — scu-PA), десмодеин (рекомбинантная форма активатора плазминогена из слюны кровососущих летучих мышей) [3], конъюгированная с полиэтиленгликолем рекомбинантная мутантная форма Stph [15], а также рекомбинантные мутантные формы t-PA: ретеплаза, тенектеплаза, ланотеплаза, монтеплаза [3, 11, 13].

Преимуществом новых фибринолитических препаратов является возможность их болюсного (разового), а не капельного введения, что ускоряет оказание терапевтической помощи больному [16]. Вместе с тем по клинической эффективности эти препараты не имеют существенных преимуществ перед Strk, тогда как их стоимость заметно выше [7, 16, 17], что явилось причиной ослабления интереса к развитию этого направления исследований. Большую актуальность для повышения эффективности тромболитического стали приобретать другие подходы.

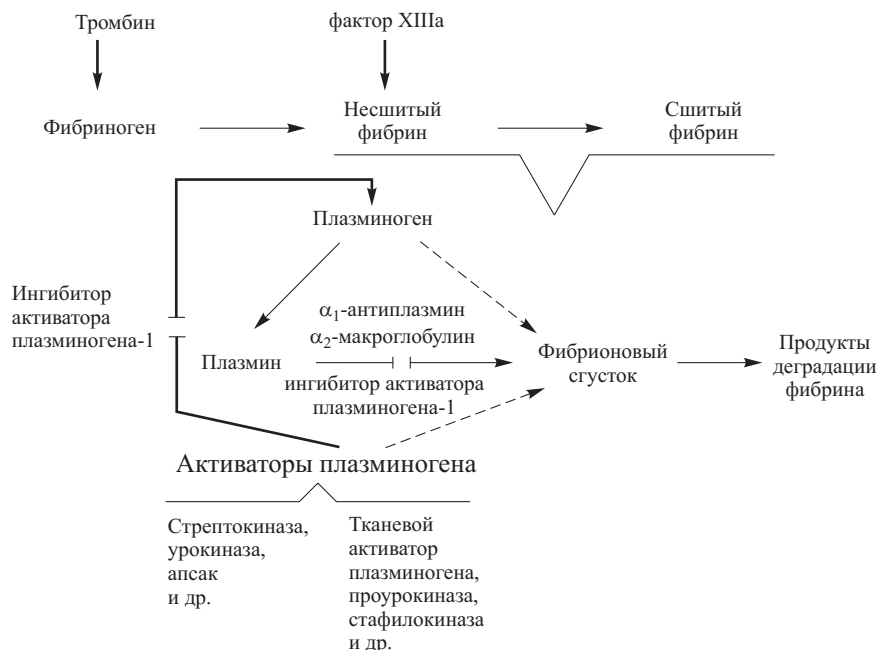


Рис. 1. Схематическое представление взаимодействий белков крови, приводящих к образованию фибринового сгустка. Стрелки означают: простые — превращение субстрата в продукт, утолщенные — действие фермента на субстрат, пунктирные — сорбцию Pmg и PA на фибриновом сгустке, пояснения см. в тексте.

Резервы увеличения тромболитической эффективности

В решении проблемы повышения эффективности тромболитической терапии можно обозначить три направления. На первом из них сотрудники системы здравоохранения составляют и реализуют образовательные и организационные программы, направленные на медицинское просвещение населения, повышение квалификации врачей и совершенствование оказания скорой (догоспитальной) медицинской помощи. Второе направление включает развитие мер профилактики тромбозов, упрощение схем введения тромболитиков и разработку приемов смежной (сопутствующей тромболитическому) терапии [16]. Третье направление связано с исследованием новых подходов для устранения тромбозов (ангиопластика, стентирование, кардиологическая генотерапия, воздействие ультразвука и др.) [1, 18], а также с изучением процессов тромбообразования, фибринолиза и тромболитического.

При исследовании фибринолиза обнаружены процессы, происходящие на поверхности фибринового сгустка (внешний фибринолиз) и внутри его (внутренний фибринолиз) [19] в условиях экзогенной деструкции биологического субстрата. Отмеченные эффекты демонстрировали возможность выявления лимитирующих стадий суммарного лизиса Fb. Это обещало, в свою очередь, создание высокоэффективных приемов и средств тромболитического. Актуальным и логичным для достижения быстрой и безопасной реперфузии стало определение схем, механизмов и закономерностей организации и функционирования макромолекулярных ансамблей на Fb, фармакологически регулирующих его присутствие в биосистемах. Таким образом, вопросы внутреннего и внешнего фибринолиза обозна-

чили потенциальную основу для повышения эффективности экзогенного тромболитического. Это определило интерес к фермент-субстратным взаимодействиям в ходе внутреннего и внешнего фибринолиза.

Взаимодействие плазминогена с фибрином

Молекула фибриногена (Fbg) состоит из двух субъединиц, каждая из которых построена из трех разных полипептидных цепей $A\alpha$, $B\beta$ и γ [20]. Субъединицы Fbg, как и его цепи, соединены между собой системой дисульфидных связей. Тромбин ферментативно отщепляет от молекулы Fbg фибрин-пептиды А и В, способствуя ее превращению в Fb-мономер. Последний полимеризуется в Fb, нити которого поперечно сшиваются между собой посредством реакции трансамидирования под действием фактора XIIIa (рис. 1). По данным электронно-микроскопических исследований кристаллических форм Fbg и Fb была предложена новая модель пространственной структуры молекулы Fbg в виде усложненной гантели, включающей семь глобулярных доменов (рис. 2, а) [21]. По конечным продуктам протеолиза Fbg (в условиях, близких к физиологическим) эти домены располагаются в двух D, одном E и двух αC структурных блоках. Каждый D-блок представлен парой глобул, образованных C-концевыми участками $B\beta$ -цепи (проксимальный) и γ -цепи (дистальный домен) соответственно и TSD-фрагментом (термостабильная область). E-фрагмент происходит из центральной части молекулы и состоит из трех пар N-концевых участков $A\alpha$, $B\beta$ и γ полипептидных цепей, соединенных между собой системой дисульфидных связей. А αC структурный блок составлен C-концевыми участками $A\alpha$ -цепей, формирующими дополнительный центральный домен [20, 21]. Электрон-

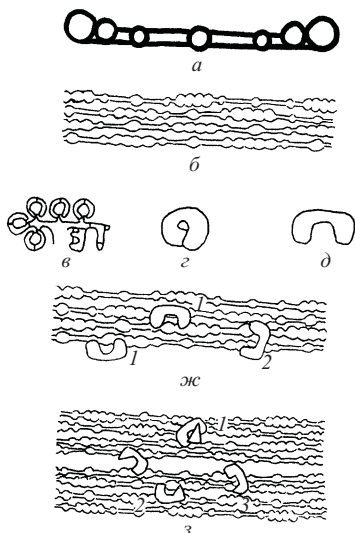


Рис. 2. Модельное двухмерное изображение молекул фибриногена (*а*), полимеризующегося в фибрин с соединением молекул Fb-мономера по типу конец к концу и их смещением на половину длины молекулы при укладке в двухнитевые протофибриллы (*б*); плазминогена (*в*), находящегося в компактной закрытой конформации в форме Glu-Pmg (*з*) и более объемной открытой конформации для Lys-Pmg (*д*). В открытой конформации Pmg связывается с фибрином (*ж*) по месту соединения молекул Fb-мономера конец к концу (*1*) и, в меньшей степени, при взаимодействии фибриновых нитей по типу центр к концу (*2*). Связывание Pmg в области соединения конец к концу молекул Fb-мономера в интактном Fb (т.е. еще не лизированном) (*з*) соседствует с присоединением к дистальному концу сверхспирального участка Fb-мономера молекул PA (например, t-PA, показан треугольником), способствуя образованию их продуктивного комплекса (*1*). Это ведет к возникновению на фибриновых нитях Pm, расщепляющего (по заостренному на картинке концу) С-концевой участок Fb (*2*) или действующего вблизи середины его сверхспирального участка (*3*).

но-микроскопически для указанной модели можно получить такую же систему поперечных полос, как и у волокон Fb, при укладке молекул со смещением на половину их длины (рис. 2, *б*) [21, 22].

Одним из важных белков, специфически взаимодействующих с Fb, является Pmg. Его молекула состоит из семи доменов (рис. 2, *в*): N-концевого пептида (пептид преактивации), пяти крингловых (кренделеобразных) доменов и обобщенного выделяемого протеазного домена [23, 24]. Полноразмерная молекула Pmg (Glu¹ — Glu-Pmg) находится в закрытой конформации (рис. 2, *з*), поддерживаемой за счет внутримолекулярного взаимодействия лизинсвязывающего участка пятого кринглового домена (анионный центр) и остатков Lys⁵⁰ и/или Lys⁶² N-концевого пептида [25]. Протеолитическое удаление N-концевого пептида (например, с помощью Pm) ведет к образованию Lys⁷⁸ (Lys-Pmg). Он находится в более открытой конформации (рис. 2, *д*) [22], чем Glu-Pmg, и с большей аффинностью связывается с Fb (K_D для Glu-Pmg 20 – 40 мкМ, а для Lys-Pmg — 0,2 – 10 мкМ) [14]. Связывание Pmg с Fb опосредуется лизинсвязывающими участками крингловых доменов Pmg и лизиновыми остатками Fb [26]. Лизинсвязывающие центры высокой специфичности располагаются на первом и четвертом кринглах

Pmg, а низкоаффинный центр связывания (аминогексилсвязывающий центр) располагается на пятом крингле [26]. Из всех кринглов Pmg именно пятый обладает наибольшим сродством к интактному Fb [26] и инициирует связывание Pmg к нему [25]. Центрами связывания Pmg на Fb могут выступать С-концевая, богатая лизином α -цепь, домены, экспонированные в X-фрагменте Fb, и С-концевые лизиновые остатки, образующиеся на более поздних стадиях плазминовой деградации Fb [22]. В ходе ее протекания экспонирующиеся новые высокоаффинные центры связывания Pmg стимулируют его накопление на лизирующемся сгустке [26, 27], повышая скорость активации Pmg и сам плазминолизис фибрина [25]. В основном Pmg связывается по месту соединения (конец к концу) молекул Fb (рис. 2, *ж*, *1*). Имеются Pmg-Fb комплексы, в которых Pmg оказывается мостиком между центром и концом фибрин-мономеров разных нитей протофибриллы (рис. 2, *ж*, *2*).

Активаторы плазминогена и их взаимодействие с фибрином

Используемые в клинической практике PA подразделяют на фибринспецифичные (t-PA и его производные, Stph и ее производные и в меньшей степени pro-UK) и фибриннеспецифичные (Strk, UK, апсак) препараты [4].

Молекула t-PA состоит из нескольких доменов, гомологичных другим белкам: пальцеобразного фибронектинового домена, домена эпидермального фактора роста, двух крингловых доменов и протеолитического домена (рис. 3, *а*). Последний для простоты рассмотрения обобщенно выделяют в сериновых протеазах и в нем располагается их активный центр. Одноцепочечная форма t-PA (sct-PA) превращается в результате ограниченного протеолиза Pm по связи Arg²⁷⁵ — Ile²⁷⁶ в двухцепочечную форму (tct-PA) [6]. Связывание t-PA с Fb опосредуется через пальцеобразный и второй крингловый домены [4]. Полагают, что эти домены участвуют в двух разных видах связывания: лизинзависимом (второй крингл и D-домен Fb) и лизиннезависимом (пальцеобразный домен и D-область Fb) [28]. Последняя пара реактантов дает основной вклад в суммарное взаимодействие, которое становится высокоаффинным благодаря кооперативности связывания по двум указанным выше низкоаффинным центрам t-PA и ускоряет активацию Pmg [29]. Оптимальная удельная (специфическая) каталитическая активность t-PA реализуется только в связанном с Fb виде в результате происходящих при этом конформационных изменений [4]. Последние, возможно, обусловлены непрямым взаимодействием второго кринглового домена t-PA с Fb, в результате чего стабилизируется открытая конформация t-PA, благоприятная для связывания с Fb [30]. Полагают [30], что закрытая конформация обладает высокоаффинным сродством к образующемуся Fb, а открытая конформация t-PA связывается по низкоаффинным центрам Fb. Последние появляются в заметных количествах после сшивки Fb под действием фактора XIIIa (рис. 1) в результате реакции трансамидиро-

вания [31]. На несшитом Fb имеется малое количество высокоаффинных центров связывания t-PA. Они маскируются при сшивании Fb фактором XIIIa, а экспонируется значительное число низкоаффинных центров связывания. И если с последними преимущественно связывается tct-PA (что позволяет существенно увеличить количество связанного с Fb активатора), то по первым — sct-PA. Таким образом, Pm и фактор XIIIa регулируют взаимодействие t-PA с Fb, а также процесс лизиса фибриновых сгустков [31]. Наряду с этим имеются данные об отсутствии различий в связывании Fb с одно- и двухцепочечной формами t-PA [32]. В отсутствие Fb эти формы имеют разные конформации и кинетические свойства [33]. Однако после взаимодействия с Fb кинетические параметры sct-PA становятся сходными с таковыми для tct-PA. По тромболитической эффективности *in vivo* одно- и двухцепочечные формы t-PA сопоставимы между собой [34]. Преимущественно t-PA связывается у дистального конца соединения молекул Fb (рис. 2, з, 1), что позволяет ему эффективно активировать Pmg [21]. Образующийся Pm может действовать как по периферийной (рис. 2, з, 2), так и центральной области Fb (рис. 2, з, 3).

Stph сама не обладает ферментативной активностью, но приобретает ее после комплексообразования со следовыми количествами Pm на сгустке Fb [4]. Комплекс Stph-Pm активирует другие молекулы Pmg на Fb, но быстро ингибируется при переходе в сосудистое русло.

Производные t-PA и Stph были получены с использованием методов генной инженерии и химической модификации [3, 4, 7–14]. Их конструирование опирается на использование тромбоспецифичных свойств родительских (базовых) молекул (так называемый дикий тип белка) и на достижение пролонгированного пребывания новых PA в кровотоке [15]. Связывание этих производных с Fb обусловлено отмеченными выше свойствами базовых PA.

Молекула урокиназного PA (u-PA) состоит из домена эпидермального фактора роста, кринглового и протеазного доменов (рис. 3, б) [3]. Сродство proUK к Fb носит не прямой, а опосредованный характер [4]. Полагают, что оно может быть обусловлено конформацией Pmg, сорбировавшегося по С-концевым лизиновым остаткам, экспонированным в ходе лизиса Fb. С такой конформацией ассоциированного с Fb Pmg происходит увеличенное связывание proUK [4, 7]. Другие возможности объясняются ингибированием proUK в объеме плазмы Pmg с последующей конформационной перестройкой этого Pmg-proUK комплекса после связывания на Fb, а также превращением proUK на Fb в UK [7]. Исследования взаимодействия u-PA с клетками, а также данные, полученные на животных, имеющих инактивированные гены разных PA, сформировали мнение, что u-PA обеспечивает протекание эндогенного (физиологического) фибринолиза, опосредованного клетками [19]. Он регулируется локальной секрецией u-PA клетками (рецепторнонезависимый фибринолиз) или связыванием u-PA с клеточной по-

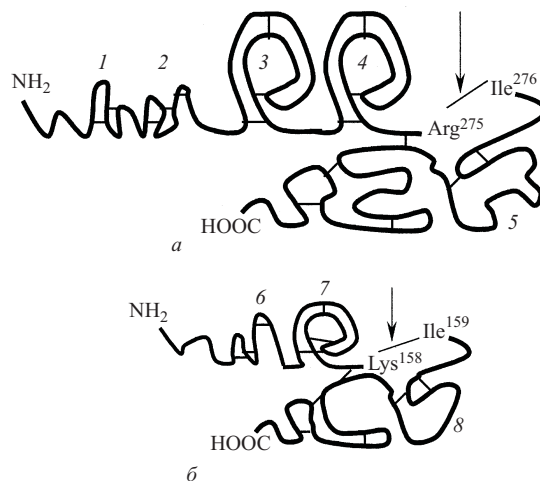


Рис. 3. Условное двухмерное представление структурной организации молекул физиологических PA. Молекула t-PA (а) состоит из пальцеобразного (1), ростового (2) доменов, кринглов 1 (3) и 2 (4) и протеолитического домена (5). Молекула u-PA (б) состоит из ростового (6), кринглового (7) и протеолитического (8) доменов. Стрелками показано место протеолитического разрыва Pm белковой цепи PA при превращении из одноцепочечной формы в двухцепочечную.

верхностью (рецепторнонезависимый фибринолиз). t-PA обеспечивает клеточнезависимый фибринолиз, обусловленный его Fb-связывающей способностью [19].

В результате расщепления Pm Lys¹⁵⁸ – Ile¹⁵⁹ пептидной связи одноцепочечный u-PA (scu-PA) превращается в двухцепочечный (tcu-PA) (рис. 3, б), называемый UK [4, 7, 8, 10]. UK не обладает сродством к Fb, из-за чего вызывает при введении пациентам не только лизис тромба, но и системную активацию фибринолиза [4].

Strk не является ферментом, но после взаимодействия с Pmg образует активаторный комплекс Strk-Pmg [4, 13, 23], в котором в результате конформационных изменений Pmg формируется активный центр. На втором этапе взаимодействия он каталитически превращает другую молекулу Pmg в Pm. Третий этап связан с превращением Strk-Pmg комплекса в Strk-Pm. При этом в комплексе протеолитическому воздействию подвергается как и Pmg, так и Strk [4]. Следует заметить, что Pm, в отличие от его комплекса со Strk, не способен активировать Pmg в крови, быстро подвергаясь ингибированию α_2 -AP. Strk-плазминогеновый комплекс им не ингибируется. В частности, поэтому комплекс может генерировать Pm не только на тромбе, но и в сосудистом русле, что угрожает развитием “гиперлитического” состояния.

Для контроля ферментативной активности Strk-Pmg комплекса было предложено провести ацилирование его активного центра. Полученное производное было названо апсак [14]. В результате ацилирования блокировалась работа комплекса в кровеносном русле, но при замедленном деацилировании ему возвращалась фибринолитическая активность. Такое обратимое ацилирование может генерировать плазминовую активность на тромбе после введения препарата и достиже-

ния им зоны тромботического поражения. Однако невысокая афинность к Fb не придала существенной тромбоспецифичности апсаку. Клиническое применение таких препаратов истощает уровень α_2 -АР и вызывает деградацию факторов коагуляции (прежде всего Fbg), что может, однако, защищать (при соответствующем подборе доз) от возникновения реокклюзий [35]. Для их предотвращения фибринспецифичные препараты применяются вместе с антикоагулянтами [4].

Внешний фибринолиз

Для осуществления фибринолиза на Fb формирует-ся комплекс из Pmg и его РА. На интактном Fb имеется малое число центров сорбции для t-РА (обладающего наибольшей среди физиологических РА афинностью к Fb) и Pmg [31]. При этом их сорбция может осуществляться по разным и независимым центрам [26] и происходит упорядоченным последовательным образом [4, 7], приводя к образованию циклического комплекса Fb – t-РА – Pmg – Fb. В результате продуктивного взаимодействия образуется Pm. Он лизирует фибриновые цепи с образованием С-концевых лизиновых остатках второго типа [26] (в отличие от остатков первого типа, изначально представленных на интактном Fb). По остаткам второго типа могут связываться t-РА и Pmg. Однако сродство к ним Pmg оказывается существенно выше, что ведет к накоплению на лизирующемся Fb именно Pmg при условии его достаточной концентрации в окружающем сгусток растворе [26]. Связанный на лизирующемся Fb Pmg имеет конформацию, обуславливающую повышенную каталитическую эффективность его активации при взаимодействии с ргоУК [36], что, вероятно, опосредует фибриноспецифичность ее действия [37]. По данным флуоресцентной микроскопии, пространственное распределение Pmg на Fb не зависит от типа РА [38]. При этом поверхность сгустка, вероятно, оказывается единственным местом, где реально создается (в результате плазминолиза) высокая концентрация Pmg-связывающих центров. Это обеспечивает увеличение связывания с лизирующимся фибриновым сгустком Pmg. С помощью флуоресцентной микроскопии установлено, что во время лизиса плазменного сгустка в присутствии t-РА или u-РА происходит поверхностное накопление Pmg на сгустке [38]. В модельной системе найдено, что в тонком поверхностном слое (глубиной приблизительно 50 мкм) фибринового сгустка, обработанного Pm, экспонируются около 2,5 Pmg-связывающих центров на молекулу Fb-мономера с K_D 2,2 мкМ. При физиологических концентрациях Pmg (1,5 – 2,0 мкМ) во внешней среде он десятикратно концентрируется на поверхности лизирующегося фибринового сгустка, образуя способный к сорбции РА слой толщиной 3 мкм [39]. Зависимость скорости лизиса сжатого (компактизированного) плазменного сгустка (т.е. с затрудненным доступом к Pmg внутри сгустка) от концентрации разных РА имеет вид колоколообразной кривой [19]. Такая форма кривой объясняется истощением Pmg в окружающей сгусток среде (при

высоких концентрациях РА), что предупреждает его накопление на поверхности сгустка и замедляет внешний фибринолиз. Подобного не удается наблюдать в экспериментах со сгустком, обогащенным Pmg, когда последний содержится на поверхности и внутри сгустка. Этот факт указывает на важную роль внутреннего фибринолиза.

Внутренний фибринолиз

Образование фибринового сгустка в крови происходит с удержанием (захватом) плазмы, содержащей Pmg, а также с включением в сгусток Pmg, сорбированного на первоначально образующихся фибриновых нитях. Это определяет в основном суммарное содержание внутреннего Pmg сгустка. Его активация вызывает внутренний плазминолизис, наглядно подтвержденный данными конфокальной микроскопии с флуоресцентно меченным Pmg [39]. Полагают, что скорость внутреннего фибринолиза прямо пропорциональна концентрации разных РА (с наличием лаг-фазы) [19]. Указанная зависимость проявляется при лизисе плазменных сгустков, обогащенных Pmg. насыщение сгустка Pmg происходит, главным образом, двумя путями: конвекцией и диффузией [40]. Диффузия эффективна на коротких дистанциях. Тем не менее именно увеличение коэффициентов диффузии t-РА и УК благодаря присутствию в системе фибрин-плэйт неионных или цвиттер-ионных детергентов увеличивает их фибринолитическую активность [41]. Это подчеркивает важность диффузии и в системах *in vivo*. Влияние конвекции существеннее. Благодаря конвекции происходит доставка компонентов фибринолитической системы к поверхности тромба и их проникновение внутрь его. Этому способствует градиент давления, пульсирующий характер кровотока, вязкость крови и эластичность стенки сосуда [42]. Проницаемость сгустка способствует движению жидкости. В сгустке возникают асимметричные каналы. По ним происходит внутреннее насыщение сгустка фибринолитическими компонентами. При этом в сгустке имеются неперфузируемые области. Проникновение Pmg и РА в них может обеспечиваться благодаря диффузии. Градиент давления влияет на изменение проницаемости сгустка. Это влияние весьма сбалансировано. С одной стороны, рост давления ингибирует полимеризацию Fb, обуславливая его плотную упаковку [43], а с другой, способствует проницаемости сгустка [44], стабилизируя его насыщение фибринолитическими компонентами. Прямопропорциональный характер зависимости доза – эффект для внутреннего фибринолиза подчеркивает его значимость как резерва для повышения эффективности тромболизиса, индуцированного экзогенными РА. При этом полагают, что Pm на Fb сгустке весьма слабо взаимодействует с его ингибиторами [19].

Сочетанное фибринолитическое воздействие

Можно резюмировать, что накопление фибринспецифичных РА на сгустке происходит в основном на его поверхности [39] и их проникновение внутрь сгу-

стка ограничено. Сорбция Pmg на поверхности лизирующегося сгустка приводит к образованию слоя (оболочки) Pmg, который непрерывно изменяется со снижением размера сгустка [38]. Как уже говорилось, зависимость доза – эффект для внешнего фибринолиза имеет вид колоколообразной кривой [19]. При этом высота ее пика, соответствующая максимальной скорости фибринолиза, для разных фибринспецифичных РА существенно не различается [19]. Истощение Pmg в окружающей сгусток среде ведет к замедлению внешнего фибринолиза. Для внутреннего фибринолиза зависимость доза – эффект предстает в линейно пропорциональной форме. Теоретически в указанном интервале концентраций она не имеет ограничений. Фибриннеспецифичные РА (УК), а также ретеплаза (мутантная форма t-РА) накапливаются на поверхности сгустка и проникают в него значительно глубже, чем t-РА [39, 45]. При этом ретеплаза, состоящая из второго кринглового и протеазного доменов t-РА (рис. 3, А), имеет сниженную в сравнении с t-РА фибринспецифичность и сходную клиническую эффективность [3, 4, 8, 13, 16]. Успешный тромболизис после двойного болюсного введения ретеплазы может быть обусловлен ее увеличенным временем полужизни в кровотоке и возможностью внутреннего насыщения ею плазменного сгустка [45]. Таким образом, обеспечение внутреннего фибринолиза пролонгированными формами РА представляется действенным приемом повышения эффективности тромболизиса. Прямых сравнительных исследований достижения этого либо за счет сбалансированного изменения тромбоспецифичности фибринселективных агентов, либо благодаря комбинированному применению РА внешнего и внутреннего фибринолиза выполнено еще не было. Определенно говорить о перспективности для тромболизиса оптимального РА, сочетающего внешнее и внутреннее воздействие на тромб, или комбинации РА сейчас затруднительно.

Перспективы повышения эффективности тромболизиса

Замедление фибринолиза при истощении содержания Pmg в окружающем сгусток растворе позволило заключить, что накопление Pmg на сгустке является необходимым условием лизиса [19]. Действительно, у гомозиготных мышей с генетически обусловленным дефицитом Pmg одна болюсная инъекция Glu-Pmg восстанавливает тромболитический потенциал кровотока [46]. Однако сочетанное введение *in vivo* Pmg с UK [47] или с pro-UK [48], или с t-РА [49] показало, что использование только Pmg существенно уступает по показателям тромболизиса введению одного РА [47]. Более того, увеличение эффективности тромболитического воздействия РА наблюдается лишь при сочетании с Lys-Pmg, но не Glu-Pmg [47 – 49]. Важно отметить, что указанный подъем в показателях тромболизиса наблюдается лишь при введении первым Lys-Pmg, а затем РА [50]. При обратном порядке введения Lys-Pmg не влияет на тромболитическую эффективность t-РА. Вероятно, открытая конформация

Lys-Pmg (рис. 2, *д*) и его большее сродство к фибрину в сравнении с Glu-Pmg [14] способствуют сборке на фибрине продуктивных белок-ферментных ансамблей [49]. Их образованию на сгустке препятствует короткое время полужизни в кровотоке РА дикого типа (т.е. с белковой структурой, идентичной эндогенной). Возможно, дополнительный вклад в тромболизис при введении последним Lys -Pmg не развивается из-за быстрого клиренса указанных РА [50]. Громоздкость и длительность клинических схем введения диких видов РА [16] задержали клиническое использование самого Pmg. Появление в арсенале кардиолога пригодных для болюсного (инъекционного) введения РА [3, 4, 8, 16] свидетельствует в пользу обоснованности их клинической апробации в комбинации с Lys-Pmg. Однако пока таких сообщений не появлялось. Следует помнить, что указанный подход потребует по крайней мере двух болюсных инъекций при 5 – 15-минутной задержке между ними. Учитывая достаточно высокую частоту реперфузий (65 – 75 %) после одноболюсного введения новых РА [3, 8, 16], понятны затруднения возвращения к более сложным процедурам лечения. Во всяком случае пока такая возможность не исследована.

Таким образом, фибринселективные РА, достаточно инертные и сохраняющие Pmg в окружающей среде, представляются предпочтительными для тромболизиса в сравнении с фибриннеселективными [38]. Основываясь на этой точке зрения, был разработан ряд фибринселективных производных [4, 9], пригодных для парентерального введения в клинической практике [3, 8]. Эффективность новых РА оказалась сходной с показателями традиционного лечения Strk [16, 18]. Видимо, фибриноспецифичность РА в большей мере регулирует насыщение ими плазменного сгустка при терапии, чем влияет на активацию Pmg [19]. Уменьшение фибринспецифичности ретеплазы, способствующее проникновению в сгусток [45], с увеличением ее времени пребывания в кровотоке [4] не приводит к существенному повышению эффективности тромболизиса по сравнению с терапией t-РА [3, 8]. Используя один препарат (монотерапевтически), пока не удалось достигнуть существенного повышения эффективности тромболизиса за счет реализации внутреннего и внешнего фибринолиза благодаря сбалансированному изменению свойств какого-то одного РА.

Комбинированное применение t-РА и пролонгированного фибринолитического ковалентного конъюгата UK-Fbg *in vivo* позволило добиться более быстрого тромболитического эффекта по сравнению с их отдельным применением при умеренном снижении уровня гемостатических белков крови [51]. Использование комбинации t-РА и UK-Fbg в виде однократной болюсной инъекции способствует заметному снижению эффективных доз ее компонентов и частоты реокклюзии [52 – 54]. Последнее могло быть связано с использованием РА с коротким временем полужизни в кровотоке. Остается открытым вопрос сочетанного применения триггера тромболизиса и пролонгированной формы

РА [13, 55]. Составление тромболитических композиций на основе РА третьего поколения (представляющих собой химически или биологически модифицированные производные РА) формирует новое направление их изучения [56, 57]. Вместе с тем клинические потребности тромболитизиса касаются не только достижения реперфузии, но и ее сохранения без появления сопутствующих осложнений.

Тенденции снижения эффективных доз тромболитиков

В настоящее время разработка средств и приемов смежной терапии для тромболитизиса приобрела доминирующий характер [16]. Одним из впечатляющих по результатам подходов является комбинированное использование тромболитиков с антиагрегантными средствами. В качестве последних сейчас интенсивно исследуются блокаторы интегринов гликопротеина P_{IIb}/P_{IIIa} тромбоцитов [58]. Сочетанное применение ретеплазы и абсиксимаба позволяет использовать для эффективного лечения сниженные дозы тромболитика. С учетом высокой стоимости таких препаратов [16] отмеченное удешевление лечения представляется важным для распространения тромболитической терапии [59]. Использование в такой комбинации вместо ретеплазы фибриннеспецифичной Strk приводит к увеличению частоты геморрагических осложнений [60], что требует снижения дозы тромболитика во избежание опасных кровотечений [61].

Появление в клинической практике пригодных для болюсного введения РА (ретеплазы, тенектеплазы, ланотеплазы, монтеплазы, памитеплазы) [62] привлекло внимание к результатам их клинического применения [3, 4, 8, 12]. Мета-анализ этих данных показал, что они увеличивают риск таких тяжелых осложнений, как внутримозговые кровоизлияния [63]. И хотя появляются сообщения о спорности данных указанного исследования [64 – 67], клиническая тенденция подчеркивает необходимость применения уменьшенных доз препаратов РА [19, 63], что согласуется с использованием приемов комбинированного применения разных РА [13, 16, 52, 56]. Такой подход может обеспечить не только удешевление стоимости лечения, быстроту и удобство его проведения, но и осуществление при тромболитизисе внешнего и внутреннего фибринолиза, создающего условия для повышения эффективности экзогенного тромболитизиса с использованием РА. Для реализации эффективного тромболитизиса разрабатываются внутрисосудистые интервенционистские (ангиопластика, стентирование), физические (обработка ультразвуком) и фармакологические подходы [68]. Среди последних возможна разработка новых РА, оптимально сочетающихся в своем действии внешний и внутренний фибринолиз. Перспективным является также создание тромболитических комбинаций на основе уже созданных РА третьего поколения. Сочетание в одном составе невысоких доз разных тромболитиков позволяет воздействовать через внешний и внутренний фибринолиз, обеспечивая быстрый, эффективный и безопасный тромболитизис. Указанные

выше подходы развиваются сейчас с разной степенью интенсивности, и какой из них приведет к реально значимому эффекту, покажут результаты дальнейших исследований.

Методами технологии рекомбинантных ДНК, приемами химической модификации, выделением РА из ранее неизвестных источников получены фибринолитические препараты нового поколения. Проведенные изучения продемонстрировали, что при сходстве каталитического аппарата ферментов активации плазминолизиса (сериновые протеазы) возможно широкое варьирование молекулярного состава и времени полужизни в кровотоке производных РА.

Некоторые из них (ретеплаза, тенектеплаза, ланотеплаза, монтеплаза и др.) вошли в практику тромболитической терапии. Однако по клинической эффективности они не имеют существенных преимуществ перед Strk, хотя их стоимость значительно выше. Такое положение изменило дальнейшие направления совершенствования тромболитизиса. Исследования сосредоточились на изучении процессов тромбообразования, фибринолиза и тромболитизиса. Данные взаимодействия Pmg или его РА с Fb указали на важность исследования закономерностей внутреннего и внешнего фибринолиза. Использование механизма внутреннего фибринолиза в ходе тромболитизиса является значимым резервом повышения эффективности последнего. Перспективным приемом для этого является разработка тромболитических комбинаций, состоящих из РА с разной фибриноспецифичностью и периодом пребывания в кровотоке. Такой подход формирует новое направление исследования РА третьего поколения и отвечает сегодняшним тенденциям развития клинического тромболитизиса, связанным с переходом к агрессивным схемам лечения и использованием сниженных доз тромболитических препаратов.

Автор искренне признателен и благодарен за внимание и поддержку настоящего направления исследований академику Е. И. Чазову и чл.-корр. РАН В. Н. Смирнову.

Представленная работа частично финансировалась из средств Федеральной целевой научно-технической программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники” Министерства промышленности и науки РФ по проектам “Биокаталитические технологии для химического синтеза, аналитических систем и медицины” и “Разработка средств и методов диагностики и лечения больших ишемической болезнью сердца”, ТОО “Альгаир” (Уральск, Республика Казахстан), а также Министерством здравоохранения РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. E. J. Topol, *Eur. Heart J.*, 2(Suppl. E), E18 – E28 (2000).
2. H. J. J. Wellens, *Lancet*, **354**, siv 8 (2000).
3. F. J. Van de Werf, *Eur. Heart J.*, **20**, 1452 – 1458 (1999).
4. D. Collen and H. R. Lijnen, *Fibrinol. Proteol.*, **14**, 66 – 72 (2000).

5. D. Collen, *Circulation*, **93**, 857 – 865 (1996).
6. J. Loscalzo and E. Braunwald, *New Engl. J. Med.*, **319**, 925 – 931 (1988).
7. А. В. Максименко, *Мол. биол.*, **29**, 38 – 60 (1995).
8. F. Van de Werf, *Am. Heart J.*, **138**(2), Part 2, S115 – S120 (1999).
9. M. Verstraete and H. R. Lijnen, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **8**, 801 – 812 (1994).
10. А. В. Максименко, *Хим.-фарм. журн.*, **28**(5), 4 – 11 (1994).
11. C. Bode, T. K. Nord, K. Peter, et al., *Fibrinol. Proteol.*, **11**(Suppl. 2), 63 – 70 (1997).
12. H. D. White, *Lancet*, **354**, 695 – 697 (1999).
13. А. В. Максименко, *Биоорган. химия*, **25**, 563 – 571 (1999).
14. R. Fears, *Biochem. J.*, **261**, 313 – 324 (1989).
15. D. Collen, P. Sinnaeve, E. Demarsin, et al., *Circulation*, **102**, 1766 – 1772 (2000).
16. А. В. Максименко, *Вопр. биол. мед. фарм. химии*, **2**(1), 3 – 10 (2001).
17. D. Massel, *Can. J. Cardiol.*, **15**, 999 – 1005 (1999).
18. S. R. Mehta, J. W. Eikelboom, and S. Yusuf, *Lancet*, **356**, 1850 (2000).
19. D. C. Rijken and D. V. Sakharov, *Fibrinol. Proteol.*, **14**, 98 – 113 (2000).
20. Л. В. Медведь, *Укр. биохим. ж.*, **57**, 36 – 49 (1985).
21. J. W. Weisel, C. V. Stauffacher, E. Bullitt, and C. Cohen, *Science*, **230**, 1388 – 1391 (1985).
22. J. W. Weisel, C. Nagaswami, B. Korsholm, et al., *J. Mol. Biol.*, **235**, 1117 – 1135 (1994).
23. J. Henkin, P. Marcotte, and H. Yang, *Progress Cardiovasc. Dis.*, **34**(2), 135 – 164 (1991).
24. С. А. Кудинов, *Укр. биохим. ж.*, **57**, 23 – 35 (1985).
25. C. S. Cockell, J. M. Marshal, K. M. Dawson, et al., *Biochem. J.*, **333**, 99 – 105 (1998).
26. V. Fleury, S. Loyau, H. R. Lijnen, et al., *Eur. J. Biochem.*, **216**, 549 – 556 (1993).
27. D. V. Sakharov, E. F. Plow, and D. C. Rijken, *J. Biol. Chem.*, **272**, 14477 – 14482 (1997).
28. P. Grailhe, W. Nieuwenhuizen, and E. Angles-Cano, *Eur. J. Biochem.*, **219**, 961 – 967 (1994).
29. A. J. G. Horrevoets, A. Smilde, C. De Vries, and H. Pannehoek, *J. Biol. Chem.*, **269**, 12639 – 12644 (1994).
30. A. H. F. Bakker, E. J. D. Weening-Verhoeff, and J. H. Verheijen, *J. Biol. Chem.*, **250**, 12355 – 12360 (1995).
31. S. S. Husain, A. A. K. Hasan, and A. Z. Budzynsky, *Blood*, **74**, 999 – 1006 (1989).
32. D. C. Rijken, M. Hoylaerts, and D. Collen, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2920 – 2925 (1982).
33. J. Loscalzo, *J. Clin. Invest.*, **82**, 1391 – 1397 (1988).
34. M. Yokoyama, Y. Ichikawa, A. Yatani, et al., *J. Cardiovasc. Pharm.*, **28**, 571 – 575 (1996).
35. D. Collen and H. R. Lijnen, *Blood*, **78**, 3114 – 3124 (1991).
36. V. Fleury, V. Gurevich, and E. Angles-Cano, *Fibrinolysis*, **7**, 87 – 96 (1993).
37. V. Fleury, H. R. Lijnen, and E. Angles-Cano, *J. Biol. Chem.*, **268**, 18554 – 18559 (1993).
38. D. V. Sakharov and D. C. Rijken, *Circulation*, **92**, 1883 – 1890 (1995).
39. D. V. Sakharov, Y. F. Nagelkerke, and D. C. Rijken, *J. Biol. Chem.*, **271**, 2133 – 2138 (1996).
40. A. Blinc and C. W. Francis, *Thromb. Haemost.*, **76**, 481 – 491 (1996).
41. E. K. O. Kruithof, A. Ransijn, and F. Bachman, *Thromb. Res.*, **28**, 251 – 253 (1982).
42. М. Ю. Матвеев, Д. В. Боровиков, В. Л. Голубых, С. П. Домогатский, *Бюл. экпер. биол. мед.*, **125**, 388 – 391 (1998).
43. M. Murayama, *Thromb. Res.*, **49**, 539 – 548 (1988).
44. M. Okada and B. Blomback, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **408**, 233 – 253 (1983).
45. S. Fischer and U. Kohnert, *Fibrinol. Proteol.*, **11**, 129 – 135 (1997).
46. H. R. Lijnen, P. Carmeliet, A. Bouche, et al., *Blood*, **88**, 870 – 876 (1996).
47. S. F. Badylak, S. L. Voytik, J. Henkin, et al., *Haemostasis*, **21**, 278 – 285 (1991).
48. S. F. Badylak, S. L. Voytik, J. Henkin, et al., *Thromb. Res.*, **62**, 115 – 126 (1991).
49. J. L. Mehta, L. Chen, W. W. Nichols, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **25**, 753 – 760 (1995).
50. L. Y. Chen, W. W. Nicols, T. G. P. Saldeen, and J. L. Mehta, *J. Cardiovasc. Pharm.*, **27**, 283 – 289 (1996).
51. А. В. Максименко, Е. Г. Тисченко, А. В. Добровольский, and V. L. Golubykh, *Fibrinol. Proteol.*, **12**, 45 – 52 (1998).
52. А. В. Максименко and Е. Г. Тисченко, *J. Thromb. Thrombol.*, **7**, 307 – 312 (1999).
53. J. J. Popma, R. M. Califf, S. G. Ellis, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **20**, 1305 – 1312 (1992).
54. L. Y. Zarich, G. J. Kowalchuk, W. D. Weaver, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **26**, 374 – 379 (1995).
55. А. В. Максименко, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **799**, 139 – 145 (1996).
56. А. В. Максименко, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **864**, 96 – 105 (1998).
57. А. В. Максименко, Е. Г. Тищенко, *Вопр. биол. мед. фарм. хим.*, **1**, 6 – 10 (2000).
58. E. M. Antman, C. M. Gibson, J. A. de Lemons, et al., *Eur. Heart J.*, **21**, 1944 – 1953 (2000).
59. P. W. Armstrong, *Eur. Heart J.*, **21**, 1913 – 1916 (2000).
60. E. Ronner, H. A. M. van Kesteren, P. Zijnen, et al., *Eur. Heart J.*, **21**, 1530 – 1536 (2000).
61. R. Wilcox, *Eur. Heart J.*, **21**, 1495 – 1497 (2000).
62. М. Ферстрате, *Тромбоз, гемостаз и реол.*, **1**(5), 4 – 13 (2001).
63. S. R. Mehta, J. W. Eikelboom, and S. Yusuf, *Lancet*, **356**, 449 – 454 (2000).
64. D. Collen and B. Sobel, *Lancet*, **356**, 1848 (2000).
65. I. B. A. Menown and A. A. J. Adgey, *Lancet*, **356**, 1848 – 1849 (2000).
66. P. W. Armstrong, C. Granger, and F. Van de Werf, *Lancet*, **356**, 1849 (2000).
67. F. Andreotti, *Lancet*, **356**, 1849 – 1850 (2000).
68. J. D. Kovac and A. H. Gershlick, *Eur. Heart J.*, **22**, 450 – 457 (2001).

Поступила 27.12.01