П. Г. МАДОНОВ, С. В. МИШЕНИНА, М. С. УФИМЦЕВ, Г. И. БАЙКАЛОВ
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Новосибирск

Новая фармакологическая технология лечения заболеваний вен

Мадонов Павел Геннадьевич
д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ
E-mail: pmadonov@yandex.ru

Резюме. Субтилизины – протеолитические ферменты, продуцируемые бактериями рода Bacillus subtilis, имеют перспективное значение в фармакотерапии тромбозов. Возможность клинического использования субтилизинов в последние годы изучается активно. Проведенные исследования показывают их эффективность для лечения тяжелой венозной патологии и тромбозов. Долгое время применение субтилизинов в медицине было ограничено их низкой биодоступностью. Новый отечественный препарат Тромбовазим® на основе пегилированного субтилизина, созданный с применением технологии радиационного синтеза, обладает таргетным тромболитическим, кардиопротективным и противовоспалительным действием и на сегодняшний день является единственным зарегистрированным пероральным тромболитиком.
Ключевые слова: субтилизины, пероральный тромболитик, Тромбовазим®, венозный тромбоз.

P. G. MADONOV, S. V. MISHENINA, M. S. UFIMTSEV, G. I. BAIKALOV
FSBEI HE «Novosibirsk state medical university» Ministry of health of the Russian Federation, Novosibirsk

New pharmacological technology for treatment of vienna diseases

Pavel G. MADONOV
MD, professor, head of the department of pharmacology, clinical pharmacology and evidence-based medicine of FSBEI HE «Novosibirsk state medical university» Ministry of health of the Russian Federation
E-mail: pmadonov@yandex.ru

Summary. Subtilisins – proteolytic enzymes produced by bacteria of the genus Bacillus subtilis, have a prospective value in the pharmacotherapy of thromboses. The possibility of clinical use of subtilisins in recent years is being studied actively. The conducted studies show their effectiveness for the treatment of severe venous pathology and thrombosis. For a long time, the use of subtilisin in medicine has been limited by their low bioavailability. The new domestic preparation Trombovazim® based on pegylated subtilisin, created using the technology of radiation synthesis, has targeted thrombolytic, cardioprotective and anti-inflammatory effects, and, to date, is the only registered oral thrombolytic.
Key words: subtilisins, oral thrombolytic, Trombovazim®, venous thrombosis.

Современная флебология удачно сочетает в себе возможности хирургического и фармакологического лечения заболеваний вен. В большинстве случаев два этих методологических подхода не только не исключают один другого, но и эффективно дополняют друг друга. На протяжении последнего десятилетия в клиническую практику успешно внедряются новые инструментальные методы лечения, которые быстро наполняют арсенал хирургического лечения. Среди фармакологических технологий лечения в качестве абсолютно инновационной появилась только одна. Это применение иммобилизированных субтилизинов.

Отличительной особенностью субтилизинов является их воздействие преимущественно на денатурированные или полимеризованные белки. Белки, сохраняющие свою нативную структуру, не гидролизуются субтилизинами. Например, субтилизины не расщепляют фибриноген, но после его полимеризации и превращения в фибрин вызывают активный гидролиз последнего. Субтилизины способны растворить поступающий из зоны ишемии белковый детрит, не только находящийся в просвете сосуда, но и адсорбировавшийся на эндотелии. При этом субтилизины не гидролизуют альбумин и глобулины плазмы крови. Уникальные химические свойства субтилизинов были известны давно, но на пути создания лекарственного препарата на их основе стояли две труднопреодолимые проблемы, связанные с большой молекулярной массой субтилизинов: аллергогенность и низкая всасываемость в кишечнике.

В 2001 году получен и опубликован патент на создание фармакологической композиции на основе субтилизина, в котором описана технология создания лекарственного препарата посредством электронно-лучевой конъюгации молекулы субтилизина и инертного полимерного носителя – полиэтиленгликоля (ПЭГ) [1]. Конъюгат субтилизина и ПЭГ – пегилированный субтилизин – сохранял свою специфическую ферментную активность, при этом был «невидимым» для иммунокомпетентных клеток и, соответственно, не вызывал аллергических реакций. Это позволило вводить данный препарат внутривенно и позиционировать его как прямой тромболитик для лечения острого инфаркта миокарда [2, 3, 4, 5]. Позднее было отмечено, что пегилированный субтилизин хорошо проникает в кровоток

из кишечника с биодоступностью 18 %. Это обстоятельство позволило создать пероральную форму препарата и начать разработку терапевтических схем его применения при тяжелой сосудистой патологии [6]. Работы над этим препаратом продолжались почти двадцать лет и собрали фундаментальные достижения биотехнологии, ядерной физики и фармацевтики. В России он зарегистрирован под оригинальным названием Тромбовазим®. На сегодняшний день Тромбовазим® является единственным на мировом фармацевтическом рынке лекарственным препаратом на основе иммобилизированных субтилизинов и своим появлением открывает новую группу пероральных тромболитиков.

Появление этой технологии примечательно как с позиции фармакологии, так и с позиции флебологии. С позиции фармакологии – это крупное научное достижение, поскольку удалось создать белковый лекарственный препарат, обладающий высокой для белка энтеральной биодоступностью, отсутствием аллергенности и иммунотоксичности. Это, на первый взгляд, невероятное сочетание достигается посредством применения уникальной технологии электронно-лучевой иммобилизации белковых молекул на полимерном носителе. С позиции флебологии – появился лекарственный препарат, обладающий тромболитической, лимфодренажной активностью, уменьшающий эндотелиальную дисфункцию. Этот препарат влияет не только на основные патогенетические звенья развития заболеваний вен, но и на ликвидацию связанных с ними осложнений.

Применение субтилизинов в медицине со времени их углубленного изучения выглядело очень перспективно. Первоначально рассматривалось их применение для лечения ран, ожоговых инфекций, артрита, при заболевании желудочно-кишечного тракта, а также при лечении тромбоэмболических и послеоперационных осложнений в качестве противовоспалительных агентов [7]. По мере нарастания объема научно-исследовательской информации о субтилизинах расширялись и перспективы их применения в клинической практике [8–23]. Особенно привлекательным обстоятельством для врачей-клиницистов выглядела перспектива применения субтилизинов в качестве прямого тромболитика.

В своей работе Сощенко Д. Г., Фокин А. А. [24] обсуждают способы лечения окклюзионных заболеваний сосудов системы нижней полой вены и профилактики тромбоэмболии легочной артерии, сравнивают качество жизни пациентов, получающих традиционную комплексную терапию окклюзионных заболеваний сосудов системы нижней полой вены и терапию с применением препарата Тромбовазим®. На основании полученных результатов даны рекомендации по включению «Тромбовазима» в комплексную терапию венозного тромбоза. Также было проведено несколько пилотных, апробационных исследований в офтальмологии [25], нейрохирургии [26], кардиологии [27–29].

Регистрационные клинические исследования пероральной формы препарата Тромбовазим® проводились у больных с хронической венозной недостаточностью (ХВН). Было необходимо показать эффективность по клиническим и параклиническим параметрам и оценить безопасность применения. В исследовании приняли участие 119 пациентов мужского и женского пола в возрасте от 40 до 75 лет. Все пациенты были разделены на две группы. 73 пациента на фоне стандартной терапии ХВН получали Тромбовазим® в суточной дозе 1600 ЕД, 46 пациентов получали венотоник «Троксевазин» в суточной дозе 600 мг. Наблюдение за пациентами осуществлялось в течение 20 дней. В группе больных, в которой использовался для лечения препарат Тромбовазим®, отмечен комплексный терапевтический эффект: достигнуто уменьшение размеров сопутствующих тромбов, у больных с трофическими язвами уменьшение площади поражения и заживление трофических язв. Уменьшение отека нижних конечностей и болевого синдрома сопровождалось увеличением скоростей и объема венозного и лимфатического оттока, а также снижением динамического сопротивления лимфовенозному оттоку. Позитивные изменения зарегистрированы посредством лазерной флоуметрии, которые свидетельствовали об улучшении микроциркуляции в пораженных конечностях. Данные результаты согласуются с результатами доклинических исследований, в которых был доказан тромболитический эффект, антитромботический и противовоспалительный эффекты, а также цитопротективный и репаративный эффекты. Тромбовазим® не влиял на нормальные показатели гемостаза. Тромбовазим® является препаратом комплексного действия, он хорошо совместим с флеботониками, и при их совместном использовании отмечается более выраженный терапевтический эффект («Открытое рандомизированное исследование нового лекарственного средства Тромбовазим® для лечения хронической венозной недостаточности – РОКИТ-ВН», 2007 г.) [6].

Первое пострегистрационное клиническое исследование (КИ) было проведено у пациенток с ХВН, сформировавшейся на фоне применения гормональной заместительной терапии и гормональных оральных контрацептивов. В исследовании приняли участие 13 пациентов женского пола в возрасте от 18 до 75 лет с клиническими проявлениями ХВН, сформировавшейся на фоне приема гормональных препаратов с целью заместительной терапии или контрацепции. Суточная доза препарата 1600 ЕД, длительность приема 14 дней. После проведения курса терапии с применением препарата Тромбовазим® у всех пациенток, включенных в исследование, были отмечены положительная динамика по модифицированной шкале CEAP и повышение толерантности к физическим нагрузкам. После проведения терапии препаратом Тромбовазим® статистически достоверно отмечалась нормализация показателей свертывающей системы крови, достоверное уменьшение маркеров тромбинемии. По результатам исследования установлено, что Тромбовазим® является эффективным и безопасным средством для лечения хронической венозной недостаточности и дисгормональных тромбофилических состояний у женщин на фоне длительного приема гормональной заместительной терапии и гормональных контрацептивов. Препарат может быть рекомендован для включения в программу превентивной терапии реогемостазиологических нарушений, что весьма позитивно отразится на уменьшении риска сосудистых осложнений и качества жизни женщин («Клиническое исследование для определения эффективности и безопасности применения препарата Тромбовазим® у пациенток с хронической венозной недостаточностью на фоне применения гормональной заместительной терапии и гормональных контрацептивов», 2010 г.) [30].

Следующее КИ было проведено у пациентов с ХВН и тромбозом венозной системы головного мозга. В исследовании приняли участие 13 пациентов, среди которых 7 мужчин и 6 женщин в возрасте от 18 до 75 лет с цереброваскулярными расстройствами и выявленными на компьютерной томографии тромбозами венозной системы головного мозга, протекающими на фоне хронической венозной недостаточности. По данным томографического исследования наблюдались сочетанные тромбозы. Локализация визуализированных тромбов: поперечный синус, сигмовидный, венозный, прямой. По характеру расположения тромба: пристеночное, внутристеночное и субтотальное. После проведения курса комплексной терапии с применением препарата Тромбовазим® 1600 ЕД/сутки в течение 12 дней у пациентов, включенных в исследование, наблюдалась следующая картина: из 13 пациентов у 9 – ликвидация тромбоза (69 %), у 4 – тромб визуали-

зировался, но уменьшился в размерах (31 %). При оценке динамики кровотока в бассейне скомпрометированного кровообращения наблюдалось полное восстановление мозгового кровотока у 6 (46 %) пациентов, увеличение в сравнении с исходным – у 7 (54 %). Концентрация фибриногена, а также показатели тромбинового и протромбинового времени статистически достоверно не изменялись («Клиническое исследование препарата Тромбовазим® с целью определения безопасности и эффективности применения у больных с хронической венозной недостаточностью и цереброваскулярными расстройствами», 2011 г.) [31].

В 2009–2013 гг. в двух исследовательских центрах – ГБУЗ «Городская клиническая больница № 1 им. Н. И. Пирогова», г. Москва (гл. исследователь академик РАН, д. м. н., проф. Кириенко А. И.) и ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск (гл. исследователь д. м. н., проф. Зотов С. П.) – было проведено рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое клиническое исследование препарата Тромбовазим®в комплексной терапии у больных с тромбозами венозного русла нижних конечностей – VETTER-1. В КИ приняли участие 154 пациента с диагнозом «острый венозный тромбоз». Были сформированы 2 группы пациентов: опытная и контрольная. Опытная группа состояла из 3 подгрупп: 1.1. – пациенты принимали Тромбовазим® в суточной дозе 1600 ЕД в сутки в течение 15 дней на фоне общепринятой терапии тромбоза; 1.2. – пациенты принимали Тромбовазим® в суточной дозе 3200 ЕД на протяжении 10 дней на фоне общепринятой терапии тромбоза; 1.3. – пациенты принимали Тромбовазим® в суточной дозе 4800 ЕД на протяжении 10 дней на фоне общепринятой терапии тромбоза. Контрольная группа состояла из пациентов, которые принимали плацебо в течение 15 дней на фоне общепринятого лечения тромбозов. Плацебо давалось в точной копии капсул препарата.

Критериями эффективности терапии были: нормализация кровотока в зоне скомпрометированного кровообращения, восстановление кровотока в тромбированной вене и размер тромба(-ов). С помощью ультразвуковой визуализации обнаружены статистически значимые различия между группами пациентов, получавших на фоне общепринятой терапии тромбоза Тромбовазим®, и пациентов, получавших плацебо. Относительная частота положительной динамики в группе пациентов, получавших Тромбовазим®, составила 0,728, в группе пациентов, получавших плацебо, – 0,585, p = 0,0031 (табл. 1).

Таким образом, с высокой степенью достоверности можно сделать вывод о том, что включение препарата Тромбовазим® в состав терапии острого венозного тромбоза как минимум на 14 % улучшает результаты лечения.

Наибольшая относительная частота положительной динамики при наибольшей статистической значимости результатов выявлена у пациентов, получавших Тромбовазим® в суточной дозе 4800 ЕД/сут, 0,747, p = 0,0082 (табл. 2). При использовании дозы 4800 ЕД/сут во всех случаях применения Тромбовазима® отмечались ликвидация тромбоза и восстановление кровотока в тромбированном сосуде.

Таким образом, применение Тромбовазима® в дозе 4800 ЕД/сут увеличивает эффективность проводимой терапии на 17 %.

У пациентов, получавших на фоне общепринятой терапии тромбоза Тромбовазим®, на основании данных инструментального исследования не зафиксировано случаев отрицательной динамики, а в группе пациентов, получавших плацебо, таких случаев зафиксировано 3 (5,1 %). Ни у одного пациента из всех групп, принимавших Тромбовазим®, не было выявлено серьезных нежелательных явлений по данным физикального обследования, анализа показателей жизненно важных функций, по данным лабораторных анализов и инструментальных методов, предусмотренных дизайном исследования на всех визитах. Статистический анализ результатов лабораторных исследований указывает на безопасность применения препарата Тромбовазим® в высшей суточной дозировке 4800 ЕД. В группе пациентов, получавших Тромбовазим® в суточных дозах 1600 ЕД, 3200 ЕД и 4800 ЕД, уровень фибриногена и АЧТВ статистически значимо не изменялся.

Внедрение в клиническую практику инновационного лекарственного препарата Тромбовазим® существенно расширяет возможности фармакотерапии тяжелых заболеваний вен. В некоторых случаях его применение становится альтернативой хирургическому методу лечения без ущерба по параметрам эффективности и безопасности. Отличительной чертой препарата Тромбовазим® являет-

Таблица 1. Частота положительной динамики в группах пациентов, получавших в составе комплексной терапии Тромбовазим® и плацебо

	Плацебо			Тромбовазим®, суточная доза 1600 ЕД, или 3200 ЕД, или 4800 ЕД			p
	Число случаев	Общее число наблюдений	Относительная частота	Число случаев	Общее число наблюдений	Относительная частота	
Всего случаев с положительной динамикой	86	147	0,585034	158	217	0,7281106	0,0031

Таблица 2. Частота положительной динамики в группах пациентов, получавших в составе комплексной терапии Тромбовазим® в суточной дозе 4800 ЕД/сут и плацебо

	Плацебо			Тромбовазим®, суточная доза 4800 ЕД			p
	Число случаев	Общее число наблюдений	Относительная частота	Число случаев	Общее число наблюдений	Относительная частота	
Всего случаев с положительной динамикой	86	147	0,585034	59	79	0,7468354	0,0082

ся его неконфликтное, содружественное взаимодействие с широко применяемыми препаратами из числа антикоагулянтов, антиагрегантов и флеботоников. Внедрение Тромбовазима® в протоколы лечения неизбежно вызовет удорожание лечения, но наряду с этим существенно улучшатся результаты, что в отсроченном периоде приведет к экономии денежных ресурсов как при лечении, так и при обследовании и реабилитации больных.

Литература

1. Артамонов А. В., Верещагин Е. И., Гришин О. В., Троицкий А. В. Фармацевтическая композиция, обладающая тромболитическими, противовоспалительными и цитопротективными свойствами // Пат. РФ 2213557 с приоритетом от 10.10.2003. (Доступен в открытом реестре ФИПС http://www1.fips.ru/wps/portal/Registers/).

2. Марков В. А., Вышлов Е. В. Тромболитическая терапия при инфаркте миокарда. Томск: STT, 2011. 148 с.

3. Вышлов Е. В., Верещагин Е. И., Гришин О. В. и др. Клинические исследования отечественного тромболитика Тромбовазим при остром инфаркте миокарда // Клиническая фармакология и терапия. 2007. № 5. С. 43–45.

4. Буевич Е. И., Котовщикова Е. Ф., Верещагин Е. И. и др. О состоянии эндотелия при остром инфаркте миокарда до и после приема Тромбовазима // Тромбоз, гемостаз и реология. 2009. № 3. С. 33–37.

5. Дыгай А. М., Артамонов А. В., Бекарев А. А. и др. Нанотехнологии в фармакологии. М.: Изд-во РАМН, 2011. 136 с.

6. Киншт Д. Н., Верещагин Е. И., Мадонов П. Г. и др. Эффективность препарата Тромбовазим в лечении хронической венозной недостаточности // Человек и лекарство: сб. материалов XVI Рос. конгресса. М., 2009. С. 127–128.

7. Балабан Н. П., Шарипова М. Р. Практическое применение бациллярных протеаз // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. 2011. 153 (2). С. 29–40.

8. Алексеев А. А., Куценогий П. К., Мирошников П. Н. и др. Выделение и свойства фибринолитической сериновой протеиназы, секретируемой штаммом Bacillussubtilis B2805 // Доклады Академии наук. 2014. № 455 (5). С. 1–4.

9. Лютова Л. В., Андреенко Г. В., Карабасова М. А. и др. Исследование тромболитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы (ТСП) из Thermoactinomyces vulgaris in vivo // Прикл. биохимия и микробиол. 1990. № 26 (5). С. 623–628.

10. Bi Q., Han B., Feng Y. et al. Antithrombotic effects of a newly purified fibrinolytic protease from Urechisunicinctus // Thrombosis Research. 2013. Vol. 132(2). Pp. e135–e144.

11. Choi D. B., Cha W.-S., Park N. et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean Cordycepsmilitaris // Bioresource Technology. 2011. Vol. 102 (3). Pp. 3279–3285.

12. Kim J. Y., Gum S. N., Paik J. K. et al. Effects of Nattokinase on Blood Pressure: A Randomized, Controlled Trial // Hypertension Research. 2008. Vol. 31 (8). Pp. 1583–1588.

13. Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes // Appl Microbiol Biotechnol. 2013. Vol. 97 (15). Pp. 6647–6665.

14. Mahajan P. M., Nayak S., Lele S. S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium Bacillus subtilis ICTF-1: Media optimization, purification and characterization // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2012. Vol. 113 (3). Pp. 307–314.

15. Mine Y., Wong A. H. K., Jiang B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods // Food Research International. 2005. Vol. 38 (3). Pp. 243–250.

16. Mukherjee A. K., Rai S. K., Thakur R. et al. Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from Bacillus sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency // Biochimie. 2012. Vol. 94 (6). Pp. 1300–1308.

17. Peng Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 69 (2). Pp. 126–132.

18. Simkhada J. R., Cho S. S., Mander P. et al. Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel Streptomyces enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model // Thrombosis Research. 2012. Vol. 129 (2). Pp. 176–182.

19. Spreer A., Rüchel R., Reichard U. Characterization of an extracellular subtilisin protease of Rhizopusmicrosporus and evidence for its expression during invasive rhinoorbital mycosis // Med Mycol. 2006. Vol. 44 (8). Pp. 723–731.

20. Wang C., Ji B., Cao Y. et al. (Evaluating thrombolytic efficacy and thrombus targetability of RGDS-liposomes encapsulating subtilisin FS33 in vivo) // Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2010. Vol. 27 (2). Pp. 332–336.

21. Wang C. T., Ji B. P., Li B. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of Bacillus subtilis DC33, isolated from Chinese traditional Douchi // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 33 (9). Pp. 750–758.

22. Wang S., Deng Z., Li Q. et al. A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, Neanthes japonica // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2011. Vol. 159 (1). Pp. 18–25.

23. Yan F., Yan J., Sun W. et al. Thrombolytic effect of subtilisin QK on carrageenan induced thrombosis model in mice // J Thromb Thrombolysis. 2009. Vol. 28 (4). Pp. 444–448.

24. Сощенко Д. Г., Фокин А. А. Оценка качества жизни больных с окклюзионным поражением сосудов системы нижней полой вены и опыт применения нового лекарственного препарата Тромбовазим // Тромбоз, гемостаз и реология. 2011. № 2. С. 59–64.

25. Белоусова Н. Ю., Мазунин И. Ю., Кольчик О. В., и др. Опыт применения отечественного препарата Тромбовазим в комбинированной терапии окклюзии ретинальных вен // Человек и лекарство: сб. материалов XVII Рос. конгресса. М., 2010. 47 с.

26. Трофимов А. О., Кравец Л. Я. К вопросу о фибринолизе при внутричерепных кровоизлияниях // V съезд нейрохирургов России: материалы съезда. Уфа: Здравоохранение Башкортостана, 2009. 464 с.

27. Буевич Е. И., Котовщикова Е. Ф., Сюльжина Е. Н. и др. О состоянии эндотелия при остром инфаркте миокарда до и после приема Тромбовазима® // Тромбоз, гемостаз и реология. 2009. № 3. С. 33–37.

28. Вышлов Е. В., Баталов Р. Е., Марков В. А. и др. Сравнительная эффективность ферментного препарата с тромболитическим действием при внутрипредсердном тромбозе и спонтанном эхоконтрастировании у больных с фибрилляцией предсердий // Российский кардиологический журнал. 2015. № 9. С. 71–74.

29. Вышлов Е. В., Марков Е. В., Попов С. В. Первый опыт применения Тромбовазима для лизиса внутрипредсердных тромбов у больных с фибрилляцией предсердий // Сибирский медицинский журнал. 2011. № 1. С. 102–105.

30. Мадонов П. Г., Маринкин И. О., Кулешов В. М., Опарина М. Н., Ковалева Н. В. Эффективность применения препарата Тромбовазим при хронической венозной недостаточности на фоне применения гормональной заместительной терапии и гормональных оральных контрацептивов // XVII Российский национальный конгресс Человек и лекарство. Тезисы докладов. М., 2010. 175 с.

31. Верещагин Е. И., Киншт Д. Н., Мадонов П. Г., Марков В. А., Вышлов Е. В. Клиническая эффективность нового отечественного тромболитического препарата Тромбовазим // XVI Российский конгресс Человек и лекарство. М., 2009. 629 с.