

# Пууролаза – отечественный тромболитический препарат третьего поколения. Использование при остром инфаркте миокарда

д.м.н. И.И. Староверов, К.Л. Коткин

Институт клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова РКНПК МЗ РФ, Москва

## Зачем нужно создавать новые тромболитические препараты?

Крупные многоцентровые исследования (*GISSI-1*, *ISIS-2*, *GUSTO*) показали, что тромболитическая терапия (ТЛТ) приводит к 15–20% снижению госпитальной летальности и существенно улучшает прогноз у больных инфарктом миокарда (ИМ). Результаты, полученные с позиций доказательной медицины, подтвердили основные положения теории «открытой артерии» (Е. Braunwald), в соответствии с которой своевременное восстановление кровотока по инфарктсвязанной артерии прямо коррелирует с размерами зоны некроза, функцией миокарда левого желудочка и, следовательно, степени уменьшения ближайшей и отдаленной летальности.

Установлено, что наиболее эффективным является раннее проведение ТЛТ. Мета-анализ ряда крупных исследований показал, что тромболитизис, проведенный в первый час от начала болезни, спасает 65 жизней (в первые 2 часа 20–30, а при начале лечения в первые 7–12 часов ИМ около 20 жизней) на 1000 пролеченных больных. Ранний (в течение первого часа от развития ангинозного приступа) тромболитизис в 40% обрывает процесс развития ИМ и препятствует расширению очага повреждения миокарда. Поэтому **первый час от начала ангинозного приступа получил название «золотого часа»** для проведения ТЛТ. В мировой практике считается, что при правильной организации помощи больным ИМ, ТЛТ должна быть проведена в первые 90 минут с момента обращения больного за помощью. Интервал времени до начала ТЛТ может быть сокращен в среднем на 1 час, если фибринолитическую терапию начинают на догоспитальном этапе.

Сегодня ТЛТ входит в перечень стандартных лечебных мероприятий у больных ИМ с elevациями сегмента ST на ЭКГ.

История тромболитической терапии началась в 50–е годы XX века с использования стрептокиназы (СК), получаемой из β-гемолитических стрептококков группы С и урокиназы, выделяемой из мочи человека (1–е поколение тромболитиков).

Стрептокиназа – наиболее часто применяемый в мире тромболитик, и именно при ее использовании впервые было показано улучшение прогноза ИМ (*GISSI*, *ISIS-2*). Введение препарата может сопровождаться анафилактическими реакциями, гипотензией, а выраженные антигенные свойства СК делают невозможным ее повторное применение, начиная с 5–го дня от первого введения и в течение последующих 5 лет.

Применение урокиназы (двухцепочечный активатор плазминогена урокиназного типа) не получило распространения из-за относительно высокой стоимости препарата, связанной с процессом ее получения и очистки ввиду опасности вирусной контаминации.

В 80–е годы прошлого столетия два новых тромболитических препарата (2–е поколение) – рекомбинантный тканевой активатор плазминогена – r-tPA (альтеплаза) и проурокиназа – начали широко применяться при ИМ.

Как и все другие активаторы плазминогена, r-tPA является природной сериновой протеазой. Его третичная структура представлена пальцевидным доменом, эпидермальным фактором роста (ЭФР), двумя крингл-доменами и протеазным доменом. r-tPA не обладает антигенными свойствами, и его можно вводить повторно. Использование альтеплазы приводит к более раннему и полному достижению коронарной реперфузии (КР), чем использование СК, однако альтеплаза несколько чаще вызывает геморрагические осложнения, в том числе и такие серьезные, как геморрагический инсульт. Распространение r-tPA ограничивает высокая стоимость и невысокие «потребительские» свойства, в частности, сложная схема введения.

В связи с этим продолжаются исследования, целью которых является создание препаратов со свойствами, предъявляемыми к «идеальному тромболитику»: быстрое достижение реперфузии (в течение 15–30 минут), 100% восстановление кровотока до 3 степени по TIMI, болюсное введение, низкая частота геморрагических осложнений, высокая специфичность к «свежему» тромбу, низкая частота реокклюзии, низкая частота внутричерепных кровоизлияний, устойчивость к ингибитору акти-

ватора плазминогена 1 типа (ИАП-1), отсутствие влияния на уровень артериального давления крови, отсутствие антигенных свойств, разумная стоимость.

Так, путем изменения нативной молекулы tPA были получены такие препараты, как ретеплаза, монтеплаза, ланетеплаза, тенекеплаза, обладающие рядом преимуществ по сравнению с исходным препаратом: возможность болюсного введения, фибринспецифичность и т.д.

Продолжаются клинические испытания новых тромболитических препаратов бактериального и животного происхождения – стафилокиназы (рекомбинантный белок из 136-и аминокислотных остатков) и активатора плазминогена из слюны летучих мышей – вампиров.

### Что такое проурокиназа рекомбинантная (Пуролоза)?

В 1977 г. был выделен одноцепочечный профермент урокиназы, получивший название проурокиназа. В 1985 г. было установлено, что проурокиназа способна самостоятельно расщеплять плазминоген с образованием пламина, в связи с чем проурокиназа стала именоваться одноцепочечным, а урокиназа соответственно двухцепочечным активатором плазминогена урокиназного типа.

Проурокиназа является естественным ферментом, который может быть выделен из мочи, культуры клеток почек эмбриона человека, однако для клинического применения препарат обычно получают ДНК-рекомбинантным методом. Проурокиназа секретируется клетками в виде белка, состоящего из 411 аминокислот. Вторичная структура проурокиназы представлена ЭФР, крингл и каталитическим доменами.

Первое сообщение о применении проурокиназы у человека сделал Van de Werf в 1986 г. В последующие годы проведен ряд крупных клинических исследований с препаратом, полученным методами генной инженерии с использованием нативной молекулы проурокиназы – саруплаза (**PASS, SESAM, COMPASS**), показавших сравнимую с t-PA эффективность.

Нативная проурокиназа обладает коротким периодом

полувыведения (3–9 минут). Связывание ЭФР проурокиназы со специфическими рецепторами клеток активизирует миграцию клеток эндотелия и обеспечивает деградацию внеклеточного матрикса, что необходимо для роста, деления и миграции клеток. Известно, что повышенное содержание проурокиназы и ее рецепторов в клетках опухолей ассоциируется с их ростом и метастазированием. В связи с этим высказывались предположения, что введение больших доз проурокиназы при проведении ТЛТ может способствовать активизации и метастазированию опухолей.

В лаборатории генной инженерии Кардиоцентра была получена модифицированная молекула нативной проурокиназы с заменой 24 аминокислотных остатков ЭФР (N-концевого домена) – Пуролоза. Пуролоза производится штаммом бактерии *E.Coli*, в которую встраивается плазмид, несущий ген модифицированной молекулы. Двухмерная структура Пуролозы представлена на рисунке 1.

Изменение аминокислотной последовательности ЭФР привело к невозможности связывания Пуролозы со специфическими рецепторами на поверхности клеток и таким образом исключило активизацию миграции клеток, но никак не повлияло на вторичную структуру молекулы и, соответственно, на ферментативные и фибринолитические свойства препарата. Важным результатом модифицирования структуры молекулы стало удлинение периода полувыведения препарата в три раза: с 9 до 30 мин.

Пуролоза преимущественно активирует фибрин-связанный плазминоген, имеющий иную конформацию по сравнению с циркулирующим плазминогеном. Кроме того, показано, что в области тромба проурокиназа не ингибируется специфическими ингибиторами, присутствующими в плазме крови. Сама одноцепочечная молекула Пуролозы под воздействием пламина превращается в двухцепочечную молекулу урокиназы, более активную, чем Пуролоза. Образуется «цепная реакция» взаимодействия Пуролозы с плазминогеном тромба, в результате которой тромб разрушается. На рисунке 2 и 3 представлены схемы активации плазминогена в плазмин и фибринолиза при использовании Пуролозы.

После проведения стандартных токсикологических исследований, показавших безопасность препарата и отсутствие мутагенных, иммуногенных и тератогенных свойств, Пуролоза была передана на клинические испытания в Отдел неотложной кардиологии РКНПК МЗ РФ.

### Кому и как мы проводили лечение Пуролозой?

В исследование было включено 237 больных ОИМ. Общая клиническая характеристика больных приведена в таблице 1.

Критерии включения в исследование: первые 6 часов от начала заболевания; возраст от 18 до 75 лет; ангинозный приступ более 30 минут; ЭКГ: подъем сегмента ST  $\geq$  1 мВ в любых двух отведениях от конечностей, подъем сегмента ST  $\geq$  2 мВ в двух смежных грудных отведениях; появление блокады левой ножки пучка Гиса, информированное согласие больного на включение в ис-

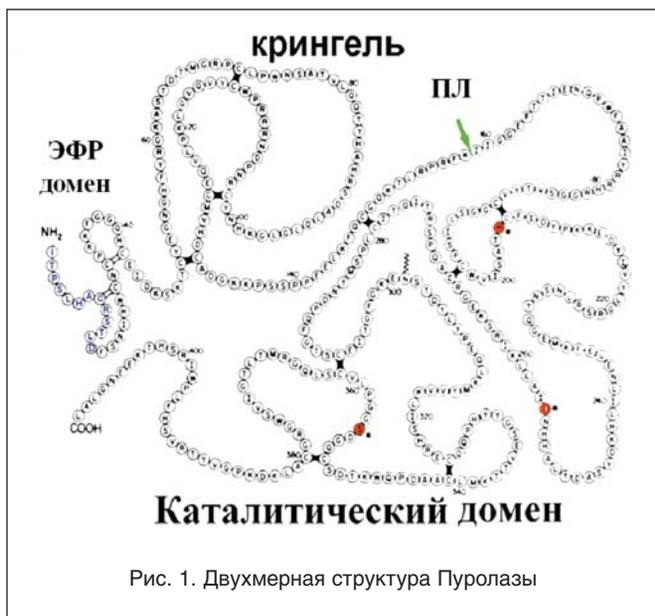


Рис. 1. Двухмерная структура Пуролозы

следование.

**Критерии исключения из исследования:**

– **абсолютные** – активное кровотечение; недавнее (в течение 4 недель) желудочно–кишечное или маточное кровотечение; обширное хирургическое вмешательство или обширная травма давностью до 4 недель; внутричерепное или внутриспинномозговое вмешательство давностью до 8 недель;

– **относительные** – травмы головы до 4 недель; проведение реанимационных мероприятий, потребовавших интенсивного непрямого массажа сердца, включая СЛР более 10 мин, связанную с данным случаем; пункция не-компрессируемых сосудов давностью до 2–х недель; диабетическая геморрагическая ретинопатия; нарушение мозгового кровообращения в анамнезе.

Всем больным вводилась Пууролаза по следующей схеме: 20 мг препарата разводились в 20,0 мл 0,9% раствора NaCl и вводились в/в болюсом за 1 мин с последующей инфузией 60 мг препарата, разведенного в 100,0 мл 0,9% раствора NaCl за 1 час; больные получали простую (не защищенную) ацетилсалициловую кислоту – 300 мг *per os* при поступлении, далее 100 мг/сут. На фоне инфузии пууролазы начинали инфузию гепарина в/в

болюсом 60 Ед/кг (но не более 4000 Ед), а далее инфузию со скоростью 1000 Ед/час на протяжении 48 часов под контролем активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Цель – увеличение АЧТВ в 2–2,5 раза выше нормы – в среднем до 50–70 секунд. Кроме того, все больные получали общепринятую терапию ИМ (инфузия нитроглицерина в первые сутки болезни, β–блокаторы, ингибиторы АПФ и т.д.).

**Что мы нашли при коронарной ангиографии?**

Для оценки эффективности Пууролазы у части больных мы провели коронароангиографию к 90–й минуте от начала ТЛТ. 21–у больному вводилась Пууролаза, 30 больным – СК по общепринятой схеме (1,5 млн. ЕД в/в за 60 мин).

К 90–й минуте от начала ТЛТ реперфузия ИСА была достигнута у 15 больных, которым вводилась Пууролаза (71%), и у 15 больных в группе стрептокиназы (50%). Для оценки степени восстановления коронарного кровотока мы использовали классификацию TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction), в соответствии с которой **степень 0 и 1** – полная или почти полная окклюзия; **степень 2** – частично окклюзированная артерия с замедленным кровотоком; **степень 3** – полное восстановление проходимости, когда контрастное вещество достигает дистальных участков коронарного русла с такой же скоростью, как и в непораженной коронарной артерии. Оказалось, что к 90–й минуте кровоток по TIMI 2 и 3 у получавших Пууролазу отмечался в 6 и 9 случаях соответственно, а в группе СК у 12 и 3 пациентов.

Таким образом, применение Пууролазы приводит к более частому и полноценному восстановлению коронарного кровотока, чем СК.

В дальнейшем достижение коронарной реперфузии (КР) оценивалось при наличии 2–х косвенных признаков: снижение сегмента ST в наиболее информативном отведении ЭКГ более чем на 50% от исходной элевации через три часа от начала ТЛТ и достижение пика активности МБ фракции креатинфосфокиназы до 16 часов от начала заболевания.

В группе из 237 больных КР была достигнута у 176

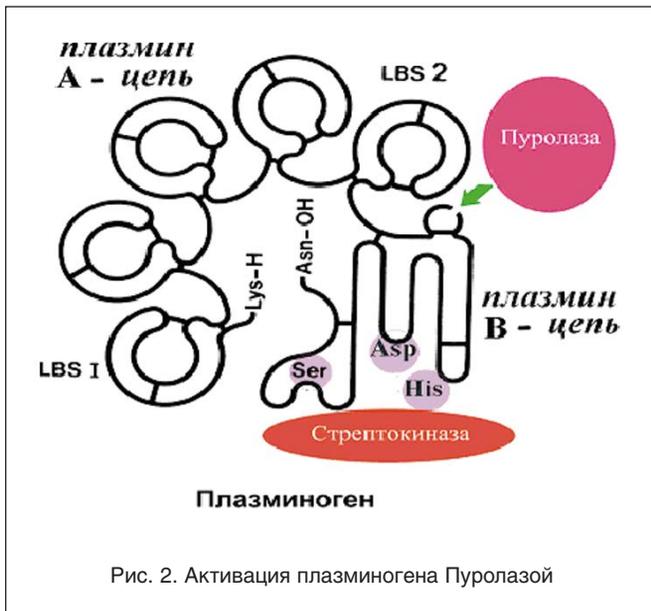


Рис. 2. Активация плазминогена Пууролазой

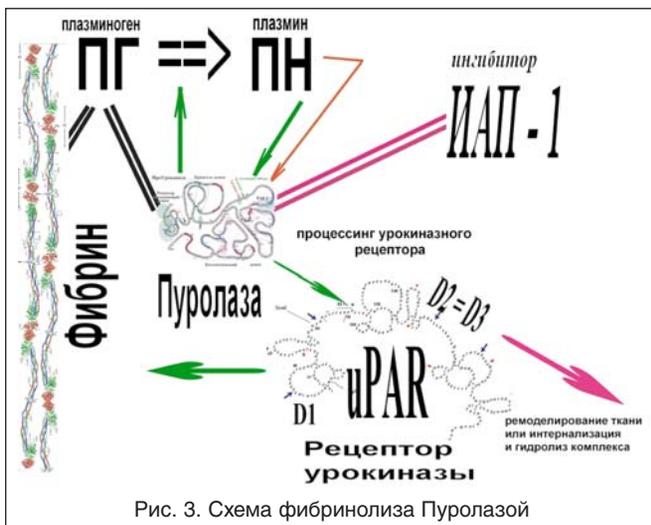
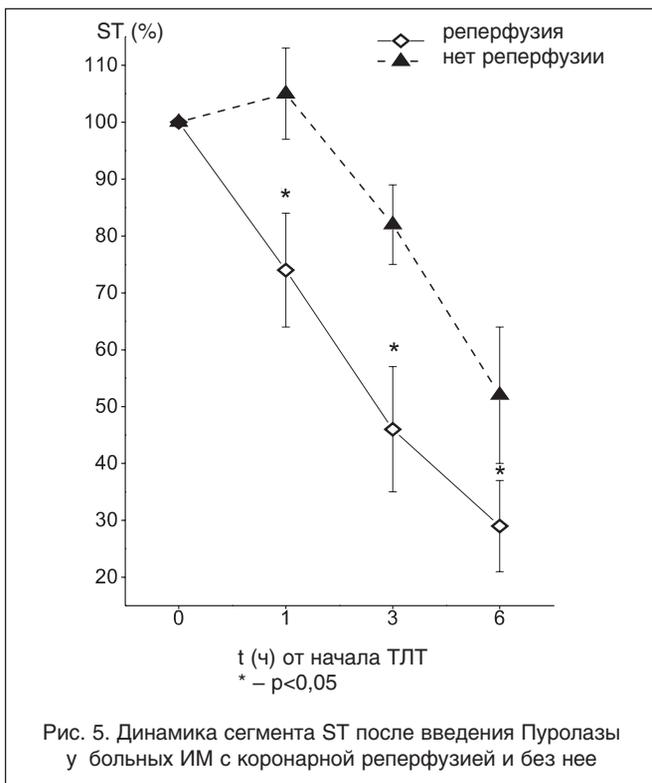
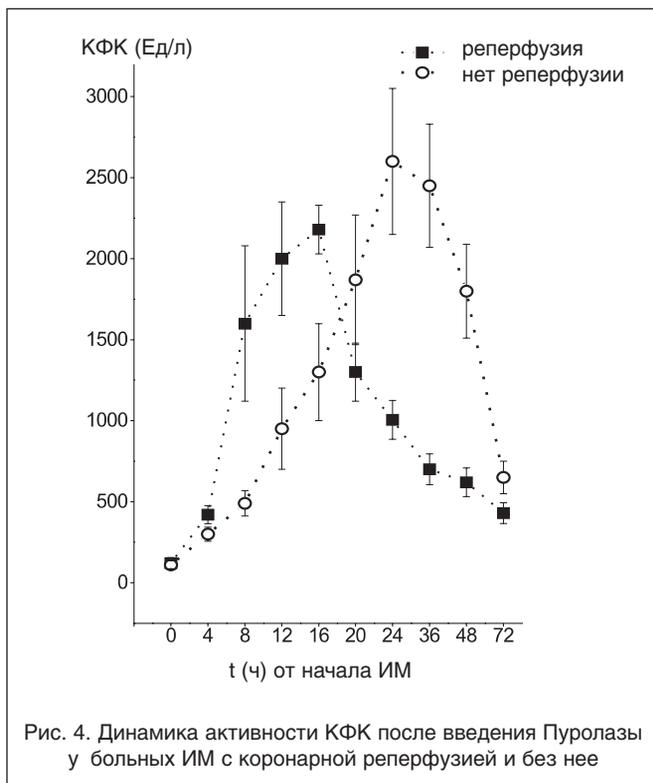


Рис. 3. Схема фибринолиза Пууролазой

**Таблица 1. Общая клиническая характеристика больных, включенных в исследование**

Показатель	n=237
Средний возраст (M±m)	56±1,5
Локализация ИМ:	
передняя	114 (48%)
нижняя	123 (52%)
Время от начала ангинозного приступа до поступления в БИТ	2,7±0,4
Время от начала ангинозного приступа до начала ТЛТ	3,3±0,6
Наличие в анамнезе:	
– ИМ	26 (11%)
– стенокардии	90 (38%)
– артериальной гипертонии	107 (45%)
– сахарного диабета	31 (13%)
– недостаточности кровообращения	17 (7%)



(74%) больных. Динамика КФК и сегмента ST у больных с КР и без представлены на рисунках 4 и 5.

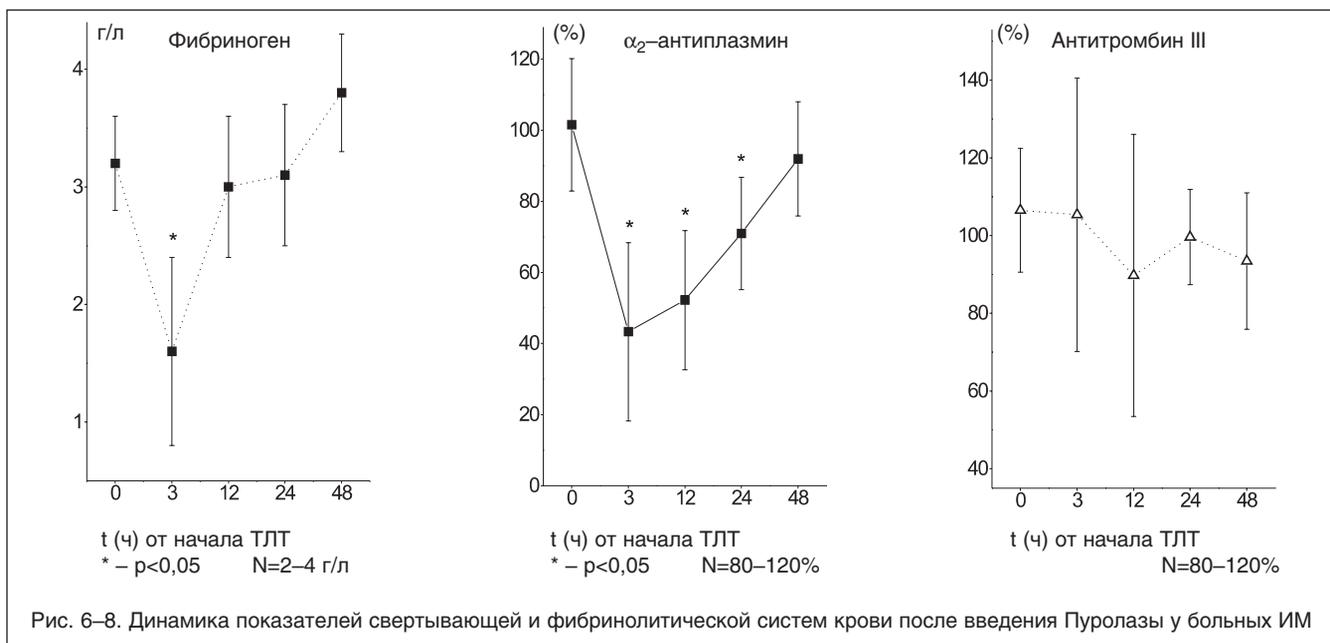
**Как изменялись показатели свертывающей и фибринолитической систем крови?**

Несмотря на то, что Пуролаза обладает фибринспецифичностью, при ее введении отмечаются признаки системного фибринолиза: достоверное снижение уровня фибриногена (у 28% больных <1,0 г/л) и  $\alpha_2$ -антиплазмина. По-видимому, эти явления связаны с образованием двухцепочечной формы молекулы, лишенной фибринспецифичности.

Динамика показателей свертывающей и фибриноли-

тической систем крови после введения Пуролазы у больных ИМ показана на рисунках 6–8.

Также у больных отмечалось достоверное увеличение АЧТВ, связанное, по-видимому, с введением всем больным гепарина в/в. «Малые» кровотечения (из мест пункций, кровоточивость десен, микрогематурия) отмечались у 26 (11%) больных; «большие» кровотечения в 0,4% случаев – у одного больного развился геморрагический инсульт, после которого больной выжил, но сохранилась тяжелая неврологическая симптоматика. Практика показывает, что кровотечения при лечении ИМ тромболитическими препаратами являются наиболее частыми и опасными осложнениями терапии. У леченных нами



больных частота геморрагических осложнений относительно невысока, что, возможно, подтверждает теоретические предположения о свойстве рекомбинантной проурокиназы – высокой тропности к фибрину тромба. И хотя преждевременно делать заключения об относительной безопасности в плане геморрагических осложнений Пуролазы, полученные нами факты обнадеживают.

### **Что мы нашли к 30-му дню ИМ?**

#### **Повторное введение Пуролазы**

Введение препарата хорошо переносилось всеми больными, не было зафиксировано аллергических реакций или других побочных эффектов. Клиническое течение заболевания к 30 дню представлено в таблице 2.

Практически единственным доступным и, соответственно, наиболее часто используемым тромболитиком в нашей стране является СК. Таким образом, остро встает вопрос лечения повторных ИМ у больных, которым ранее уже вводился этот препарат. Сегодня проведение экстренных внутрисосудистых вмешательств в нашей стране ограничено по множеству причин, препараты зару-

бежного производства малодоступны из-за высокой стоимости. В связи с этим появление отечественного эффективного тромболитического препарата, лишённого антигенных свойств, имеет крайне важное значение для практического здравоохранения. В нашем исследовании Пуролаза вводилась 18 больным (8%) с повторным ИМ, которым ранее проводилась ТЛТ СК. У 14 больных (77%) была достигнута КР. Следует отметить, что у 10 больных (56%) повторный ИМ развился в течение одной госпитализации (через 2–7 суток от развития ИМ), в связи с которой проводилась ТЛТ СК. Повторная ТЛТ у этих больных проводилась в среднем через 45 мин от развития болевого приступа. КР отмечена в 80% случаев. У 8 больных (46%) ТЛТ Пуролазой проводилась через 1,5–4 года после введения СК.

12 больным Пуролазу вводили повторно в связи с рецидивом ИМ. У 11 (92%) больных в течение часа после начала болей ТЛТ Пуролазой привела к восстановлению коронарного кровотока, при этом у 3 (27%) повторный инфаркт не развился. Одному больному Пуролаза вводилась трижды в течение 14 дней. Повторные введения хорошо переносились больными и не вызывали побочных эффектов. Сегодня ТЛТ – основной путь достижения коронарного кровотока при ИМ. Благодаря разработке российских ученых врачи получили современный высокоэффективный тромболитик 3-го поколения – рекомбинантную проурокиназу (Пуролазу).

**Таблица 2. Клиническое течение заболевания. 30-й день ИМ**

<b>Осложнения</b>	<b>(n=237)</b>
Постинфарктная стенокардия	52 (22%)
Недостаточность кровообращения	36 (15%)
Повторный ИМ	12 (5%)
Летальность	17 (7%)