



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77402** (13) **C2**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61K 38/17**  
**A61P 7/02 (2006.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) ЗАСТОСУВАННЯ САРАТИНУ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ АДГЕЗІЇ ТРОМБОЦИТІВ

1

(21) 2003032476  
(22) 23.08.2001  
(24) 15.12.2006  
(86) РСТ/EP01/09746, 23.08.2001  
(31) 00118542.0  
(32) 25.08.2000  
(33) EP  
(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.  
(72) Барнес Крістофер, DE, Фреч Маттіас, DE, Хофманн Ув, DE, Глейц Йоханнес, DE, Стріт-маттер Фольфганг, DE  
(73) МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ, DE  
(56) WO 0056885  
WO 9501375  
WO 9207005  
US 5 246 715  
(57) 1. Застосування поліпептиду Саратину для виробництва медичних препаратів, для інгібування акумулювання тромбоцитів після ушкодження судини або ендартеректомії.  
2. Застосування за п. 1, коли ушкодження судини пов'язане з атеросклерозом, васкулопатією серцевого трансплантата, коронарним рестенозом після коронарного втручання, балонною ангіопластикою,

2

уведенням стента, ротабляцією, ендартеректомією, включаючи ендартеректомію сонної артерії, шунтуванням за допомогою діалізного трансплантата та інших трансплантованих анастомозів, нестабільною ангіною, гострим інфарктом міокарда, інсультом, легкою формою гіпертрофії або легкою формою простатичної гіпертрофії.  
3. Спосіб інгібування адгезії тромбоцитів, при якому Саратин призначають місцево через катетер або при якому Саратин вводять у ендолумінальну оболонку катетера, повернувши місцево до тканини.  
4. Спосіб за п. 3, при якому Саратин вводять у полімер, який застосовують місцево і який забезпечує тривалий місцевий вихід Саратину.  
5. Спосіб за п. 4, при якому полімер, що містить Саратин, призначають місцево через катетер.  
6. Спосіб за п. 3, при якому Саратин вводять у стент або покриття стента, що поміщають місцево на/або усередину тканини.  
7. Спосіб за п. 3, при якому Саратин вводять у внутрішньосудинний трансплантат або у покриття внутрішньосудинного трансплантата, що поміщають місцево на/або усередину тканини.

Винахід відноситься до дії поліпептиду Саратину, що значно зменшує адгезію та акумулювання тромбоцитів після ушкодження судин, таких як ендартеректомія. Крім того, винахід відноситься до інгібування залежного від vWF зв'язування тромбоцитів з колагенами стінки судини в умовах підвищеного зрушення і, більш конкретно, до нового застосування Саратину в медицині як інгібітора тромбозу, при якому згаданий поліпептид можна застосовувати місцево, у вигляді топічної речовини, або у вигляді покриття на медичних пристроях.

Адгезія клітин крові, особливо тромбоцитів, до стінок ушкоджених судин - явище, широко відоме в ангіопластичній та хірургії. Такі ушкодження можуть виникати в ході різних варіантів хірургічного втручання та підшкірної терапії, що здійснюють для повторного відкриття заблокованих каналів, проток та інших порожнин, щоб видалити хворі тканини та

імплантувати замінні тканини або їхні компоненти.

Були розроблені різні типи методик втручання, що підсилюють або послаблюють, або усувають блокування кровоносних судин, забезпечуючи кровотік через судину. Один з методів лікування стенозу або закупорки кровоносних судин полягає в ангіопластичній шляхом підшкірного надування. Балонний катетер проводять через артеріальну систему пацієнта та вставляють у звужену або заблоковану зону, потім у нього накачують повітря, щоб розширити звужену зону. Підшкірна транслямінальна ангіопластика (РТСА) являє собою методику ангіопластики, яка найбільш широко використовується для розкриття закупорених атеросклеротичних артерій.

У загальному випадку, ангіопластичні методи дозволяють одержувати прекрасні результати, оскільки дозволяють обходитися без шунтвної

(13) **C2**

(11) **77402**

(19) **UA**

хірургії, але приблизно в 30-40% пацієнтів, у яких спостерігалися явні поліпшення при первинному розширенні артерії, згодом, через 3-9 місяців, виникає повторне звуження судини (рестеноз). Якщо рестеноз виявляється у важкій формі, пацієнту може знадобитися повторна ангіопластика, часто із імплантацією стента, котрий у судині виконує функцію розпірки.

В інших випадках може знадобитися реконструкція артерії за допомогою шунтвної хірургії, котра пов'язана із більш високим ризиком. Притім, що у світі щорічно проводиться більш 800 000 операцій РТСА, соціально-економічні наслідки цих 30-40% випадків рестенозу стали об'єктом серйозного занепокоєння хірургів-кардіологів.

Рестеноз часто є результатом розтягання та зминання балонном стінки артерії, та існує можливість, що направляючий провід катетерів, використовуваних у таких процедурах, у процесі розгортання заподіє ушкодження та може привести до проліферації клітин гладкої мускулатури артерії, що обумовлює повторне закриття артерії ("рестеноз") через декілька місяців.

Через можливі ускладнення, пов'язаних із рестенозом та погрозою переміщення ембола від виводного атеросклеротичного ушкодження тканини, що пов'язано з важкими наслідками, застосування повторної ангіопластики в сонній артерії суворо обмежено варіантами мінімального інвазивного втручання.

Раніше намагалися лікувати закупорку сонних артерій, які ведуть до мозку, шляхом втручання іншого типу.

Ендартеректомія сонної артерії - хірургічний метод усунення закупорки сонних артерій, і у судинній хірургії США він використовується найчастіше. Результати випробувань, проведених у багатьох центрах, продемонстрували ефективність цієї методики при лікуванні позачерепної сонної хвороби як у симптоматичних пацієнтів, так і пацієнтів, що не виявляють симптомів захворювання [JAMA 1995; 273:1421-28; N Engl. J. Med. 1991; 325:445-53], крім того, методи ендартеректомії використовуються для лікування захворювань закупорки судин, розташованих в інших місцях [Vase. Surg. 1999; 33:461-70].

При ендартеректомії сонну артерію розрізають та атеросклеротичне ушкодження тканини видаляють із судини через розріз. У хірургії здійснюють роздвоєння сонної артерії через розріз у шийі пацієнта та поміщають затиски по обидва боки місця закупорки, щоб ізолювати його, потім роблять розріз, щоб розкрити артерію. Видаляють закупорку, ізолювану область промивають та видаляють з порожнини рідину, потім артерію закривають за допомогою накладення шва. Затиски видаляють, щоб відновити кровотік через артерію. Інвагінація та можливі забруднення затисків можуть послужити причиною серйозних проблем, що виникають після відкриття сонної артерії та поновлення кровотоку в ізолюваній раніше області.

Хоча ендартеректомія є ефективним методом терапії, після неї часто залишається адвентіція, та значні області незахищеного тромбогенного субендотелію. Незважаючи на ефективність ендартеректомії сонної артерії, ця операція може при-

водити до ускладнень, включаючи тромбоз та розвиток гіперплазії інтими, які обумовлюють ускладнення, що зводять нанівець ефект від втручання, або створюють нові проблеми.

Клінічні дослідження свідчать, що після ендартеректомії сонної артерії, безпосередньо в післяопераційний період у 1-10% пацієнтів виникають інсульти, обумовлені, головним чином, утворенням тромбів у зоні ендартеректомії з наступною церебральною емболізацією [Stroke 1984; 15; 950-55]. Акумуляція тромбоцитів може також приводити до рестенозу, пов'язаного з розвитком гіперплазії інтими, який може виникати протягом двох років після операції. Були повідомлення, що через 2-5 років після ендартеректомії в 10-20% пацієнтів виникає рестеноз, обумовлений гіперплазією інтими, потовщенням інтими та зменшенням діаметра судин - про це свідчить дуплексне ультразвукове сканування сонної артерії [J. Vase. Surg. 1986; 3; 10-23].

На клітинному і молекулярному рівні, реакцією стінки судини на механічні травми, хірургічне втручання, введення стента, введення трансплантованої судини (артеріального або артеріально-венозного трансплантата, тобто діалізного трансплантата) є складна комбінація запалення, міграції клітин гладкої мускулатури, проліферації та трансформації міофібробластів; ці явища виникають безпосередньо після травми [Futura 1997; p.289-317]. Якщо в результаті захворювання артерія сильно ушкоджена, що може збільшуватися відкладенням кальцію, втручання може також, у деякій мірі, обумовлювати додаткове ушкодження з осередковою ендотеліалізацією та уразливістю основних компонентів позаклітинного матриксу, таких як колаген та еластин. У деяких пацієнтів поява надлишку тромбоцитів та фібриногену може приводити до гострої тромботичної закупорки.

Дослідження, проведені на моделях пацієнтів після ендартеректомії сонної артерії [Neurosurg 1985; 16: 773-79], а також на моделях емболектії балонних ушкоджень [Lab. Invest 1983; 49: 327-33] показали, що при ушкодженні судини обдираються клітини ендотелію та починається адгезія тромбоцитів до незахищеного субендотелію. Методом скануючої електронної мікроскопії Spallone та ін. [Neurosurg 1985; 16: 773-79] установили, що через п'ять хвилин після ендартеректомії сонної артерії в пацієнта, в ушкодженій зоні формується моношар тромбоцитів. Через п'ятнадцять хвилин після травми спостерігається агрегація тромбоцитів та формування тромбів. Через тридцять хвилин після ендартеректомії ця область виявляється покритою активованими тромбоцитами, фібрином та червоними кров'яними клітинами. Утворення тромбів досягає піка через три години після травми, та спостерігається товстий фібрино-тромбоцитний шар. Тромбоцити є найважливішими учасниками цього процесу утворення тромбів, а отже невід'ємними компонентами тромбозу, але, крім того, вони також відіграють важливу роль у розвитку гіперплазії інтими.

Дослідження з використанням тромбопенічних пацієнтів свідчать, крім того, що в них спостерігається значно менша товщина інтими після ушкодження сонної артерії в порівнянні з контрольними

пацюками [Proc. Natl Acad. SCI, USA 1989; 86: 8412-16]. Коли тромбоцити прилипають до незахищеного субендотелію ушкодженої судини, вони активуються та вивільняють свої гранули. Ці гранули містять вазоактивні та тромботичні фактори (серотонін, ADP, фібриноген, фактор Von Willebrands, тромбосан A2), а також фактори росту (породжений тромбоцитом фактор росту, трансформуючий ріст фактор-бета та фактор епідермального росту) [Circulation 1985; 72: 735-40]. Точні механізми, за якими тромбоцити прискорюють розвиток гіперплазії інтими, цілком поки неясні. Результати досліджень дозволяють припустити, що тромбоцити, у першу чергу, поставляють фактор, що викликає хемотаксис для міграції серединних клітин гладкої мускулатури в напрямку до інтими в другій фазі розвитку гіперплазії інтими [Vase. Surg. 1991; 13: 885-91]. Інші дослідження, з використанням антитіл анти-PDGF, продемонстрували найважливішу роль, яку PDGF грають в акумулюванні неоінтимальних клітин гладкої мускулатури після ушкодження судини [Science 1991; 253: 1129-32]. Інший механізм, за яким тромбоцити можуть підсилювати розвиток гіперплазії інтими, полягає в активації каскаду коагуляції та наступного акумулювання тромбіну в зоні ушкодження. Результати деяких досліджень свідчать про мітогенний вплив тромбіну на клітини гладкої мускулатури [J. Clin. Invest. 1993; 91: 94-98, J. Vase. Surg. 1990; 11: 307-13]. Крім того, встановлено, що тромбін є чинником, який стимулює активацію тромбоцитів. Безвідносно до точного механізму, адгезія та активація тромбоцитів у зоні ушкодження судини відіграють важливу роль у розвитку тромбозу та гіперплазії інтими, а отже, інгібування адгезії та активації тромбоцитів може сприяти запобіганню або зменшенню швидкості розвитку тромбозу та гіперплазії інтими.

Медіатором прилипання тромбоцитів до ушкодженої стінки артерії є, у першу чергу, фактор von Willebrand (vWF), мультимерний глікопротеїн, що вивільняється з клітин ендотелію та циркулює в плазмі, де функціонує як переносник протеїну для фактора VIII [Annu. Rev. Biochem. 1998; 67: 395-424]. Високомультимеризований vWF теж циркулює, замкнений усередині альфа-гранул тромбоцитів, з яких він вивільняється після активації тромбоциту [Annu. Rev. Biochem. 1998; 67: 395-424]. В умовах підвищеного зрушення, котрі зустрічаються в зоні атероматичного запалення або механічного ушкодження, vWF може, через свій домен A3, утворювати зв'язки з вихідними на поверхню волокнами колагену [Biochemistry 1986; 25 (26): 8357-8361, Blood 1987; 70(5): 1577-1583, J. Biol. Chem. 1987; 262(28): 13835-13841]. Потім зв'язаний з колагеном vWF, у свою чергу, зв'язує тромбоцити через антигенну детермінанту, що з'являється в залежності від зрушення в домені A1 vWF, що взаємодіє з тромбоцитом GPIIb/IIIa [Blood 1985; 65(1): 85-90, Blood 1985; 65(4): 823-831, Br. J. Haematol 1986; 63(4): 681-691]. Таким чином, vWF відіграє роль містка між колагеном та тромбоцитами, і це є необхідною умовою для здійснення адгезії тромбоцитів до колагену в потоці [J. Lab. Clin. Med. 1974; 83 (2): 296-300]. Проте, прокатування тромбоциту по vWF приводить до слабкої адгезії, та

для здійснення міцної адгезії, активації та агрегації тромбоцитів вимагаються, крім того, прямі взаємодії між колагеном та іншими рецепторами на поверхні тромбоциту [Thromb. Haemost 1997; 78(1): 434-438, Thromb. Haemost 1997; 78(1): 439-444]. У число прямих рецепторів колагену на тромбоцитах входять GP VI [Blood 1987; 69(6):1712-1720, Thromb. Haemost 1999; 81(5): 782-792, J. Clin. Invest 1989; 84(5): 1440-1445], GP Ia/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ ) [J. Clin. Invest. 1989; 84(5): 1440-1445, Nature 1985; 318(6045): 470-472], і, у меншому ступені, GP IV (CD36) [J. Biol. Chem. 1989; 264(13): 7576-7583] і, можливо, навіть p65 [J. Clin. Invest. 1997; 100 (3): 514-521]. Встановлено, що під час відсутності зв'язування тромбоцитів при участі vWF, ці рецептори є занадто слабкими медіаторами, щоб осаджувати тромбоцити на колагені з потоку [Br. J. Haematol 1986; 63(4): 681-691]. Нарешті, vWF у комбінації з фібриногеном сприяє структуруванню та подальшій активації тромбоцитів через зв'язування з GP IIb/IIIa тромбоциту [J. Clin. Invest. 2000; 105(6): 783-791], що забезпечує стабільність та міцність, необхідні для розвитку тромбу.

В останні роки, після відкриття GP IIb/IIIa тромбоциту та антагоністів рецептора ADP, у протиагрегаційній терапії з'явився великий прогрес [Coronary Art Dis 1999; 10(8): 553-560, J. Am. Coll. Surg. 2000; 191 ((1): 76-92]. Проте, розроблені методи не призначені для інгібування початкової адгезії тромбоцитів до схильних до цього волокон колагену, і, незважаючи на ефективність антагоністів GP IIb/IIIa в ослабленні взаємодій тромбоцит-тромбоцит, тромбоцити по колишньому налипають на ушкоджені ділянки стінки судини [Blood 1993; 81(5): 1263-1276, Circulation 1995; 91(5): 1354-1362]. Далі, активація тромбоцитів майже завжди спричиняє більш широкі наслідки, чим агрегація та гострий тромбоз, прогресування підгострої та хронічної гіперплазії інтими повинно бути, принаймні, частково, піддане впливу мітогенних медіаторів, таких як продукований тромбоцитом фактор росту (PDGF), який вивільняється активацією тромбоцитів. Справді, було встановлено, що інгібування PDGF зменшує гіперплазію інтими в різних видів тварин [Science 1991; 253(5024): 1129-1102, Circulation 1999; 99(25): 3292-3299].

Припустити, що vWF має велике патофізіологічне значення, можна виходячи з факту підвищення кількості циркулюючих vWF у пацієнтів з гострим інфарктом міокарда [Thromb Haemost 2000; 84: 204-209, Circulation 1998; 98(4): 294-299], причому рівні vWF позитивно корелюють з поганим прогнозом [Circulation 1998; 98(4): 294-299]. Крім того, дослідження in vivo свідчать, що нейтралізація антитіл анти-vWF приводить до інгібування експериментального тромбозу, що підтверджує важливу роль vWF у формуванні тромбів [Thromb. Haemost 1998; 79(1): 202-210]. Далі, у міру ще більшого поширення в лікуванні гострих коронарних синдромів методів ангіопластики, які неминуче приводять до ушкодження стінки судини та уразливості колагену, стає ще більш актуальною розробка способів як можна більш раннього фармакологічного втручання в каскад адгезія-активація-агрегація тромбоцитів.

Два основних напрямки в сучасній терапії, ко-

тра має метою обмеження адгезії та активації тромбоцитів, а також наступного тромбозу та гіперплазії інтими, полягають у використанні антитромбоцитних агентів та антитромботичних препаратів. Хоча такі лікарські препарати, як аспірин, ефективно блокують синтез Тромбоксану А<sub>2</sub> за рахунок інгібування містків циклооксигенази, вони не запобігають індукованій колагеном адгезії та активації тромбоцитів, які стимулюють розвиток гіперплазії інтими. Застосування гепарину як антитромботичного агента сполучено з ускладненнями та обмеженнями, включаючи непередбачену реакцію на дозу, необхідну для надійного лабораторного моніторингу, обмежену активність проти зв'язаного з тромбом тромбіну, множинні зони інгібування, залежність від антитромбіну III, ризик сильної кровотечі, так само, як і необхідність у безупинному уливанні. Очевидно, що ідеальний терапевтичний агент повинний робити специфічну до зони та локалізовану дію, без системного розподілу або загальної коагулопатії.

Виявилося, що найважливіші ефекти, які ініціюють каскад подій, що приводять до тромбозу та наступної гіперплазії інтими, виникають у результаті взаємодій між незахищеним колагеном субендотелію в зоні ушкодження судини та моношаром тромбоцитів, які налипли на незахищений колаген. Отже, специфічний інгібітор адгезії тромбоциту до колагену субендотелію може запобігати, або принаймні, гальмувати розвиток тромбозу та гіперплазії інтими.

У літературі описано, що деякі видобуті з п'явки речовини здатні інгібувати взаємодії колаген-тромбоцит [Blood 1995; 85(3): 705-711, Platelets 2000; 11(2): 83-86, J. Biol. Chem. 1992; 267(10): 6893-6898, J. Biol. Chem. 1992; 267(10): 6899-6904, Blood Coagul Fibrinolysis 1991, 2(1): 179-184]. Відомо, що дестабілаза, ізопептидаза, що виявляє активність у плані деполімеризації фібрину, виділена з *Hirudo medicinalis*, інгібує агрегацію тромбоцитів, викликану різними агоністами, включаючи колаген, але вважається, що вона утворює зв'язки безпосередньо з мембраною тромбоциту [Platelets 2000; 11(2): 83-86]. Антитромбоцитний протеїн п'явки (LAPP), протеїн з масою =13кДа зі слини *Haementeria officinalis*, інгібує адгезію тромбоцитів до колагену при статичних умовах [J. Biol. Chem. 1992; 267(10): 6899-6904, Thromb. Haemost 1999, 82(3):1160-1163] та при прискореній протоці [Arterioscler Thromb. Vase. Biol 1995, 15(9): 1424-1431], і робить вплив як на vWF, так і на зв'язування тромбоциту з колагеном, медіатором якого є GP Ia/IIa [Thromb. Haemost 1999, 82(3): 1160-1163]. Калін являє собою протеїн ~ 65кДа з *Hirudo medicinalis*, що має аналогічну дію. Калін теж інгібує взаємодії колаген-тромбоцит як у статичних, так і в динамічних умовах [Blood 1995; 85(3): 705-711, Blood Coagul Fibrinolysis 1991, 2(1): 179-184, Thromb. Haemost 1999, 82(3): 1160-1163]. Крім того, як LAPP, так і Калін є потенційними інгібіторами ініційованої колагеном агрегації тромбоцитів, які інгібують агрегацію при концентраціях, близьких до тих, що блокують утворення зв'язків vWF з колагеном [J. Biol. Chem. 1992; 267(10): 6893-6898, Blood Coagul Fibrinolysis 1991, 2(1): 179-184, Blood 1995, 85(8):712-719].

Оцінка ефективності як LAPP, так і Каліна при тестуванні в моделях тромбозу *in vivo*, мала перемінний успіх. Виявлено, що LAPP не може гальмувати формування тромбу на покритих колагеном трансплантатах артеріально-венозної розвилки в бабуїна, незважаючи на застосування доз, що інгібують ініційовану колагеном агрегацію [Arterioscler Thromb 1993, 13(11): 1593-1601], тоді як Калін чинив залежну від дози інгібуючу дію на формування тромбів у моделі венозного тромбозу хом'яка [Blood 1995, 85(3): 712-719].

У цій галузі знань відомі нетромбогенні та антитромбогенні покриття для стентів та катетерів. Нетромбогенні покриття та продукти засновані на модифікованих та вищих полімерах, приклади описані [в заявках WO9301221 та WO9830615].

Антитромботичні та антирестенозні покриття являють собою, у загальному випадку, біосумісні покриття, що можуть також служити джерелами місцевого постачання лікарських препаратів.

Покриття засновані, головним чином, на гідрогелях, їхні приклади описані в патентній літературі, присвяченій методикам виготовлення різних типів гідрогелів та покриттів для медичних пристроїв, у тому числі, такі приклади наведені [в заявках WO9211896, WO9811828, WO0147572, EP0887369 та WO0139811].

Профіль виходу терапевтичних речовин, що містяться в покритті, можна регулювати, наприклад, за допомогою варіювання товщини полімерних шарів, або шляхом вибору специфічних полімерних покриттів, що володіють підібраними фізико-хімічними властивостями (такими, як заряд, гідрофобність, гідрофільність) та/або шляхом готування покриттів у виді різних шарів. Фахівцям відомі критерії вибору полімеру та оптимізації швидкості виходу. Інші покриття [описані в роботі Fischell (Circulation, 1996, 94: 1494-95), Topol та ін. (Circulation, 1998, 98: 1802-20) та McNair та ін. у методичці Technology, 1996, 16-22].

Застосування стентів, проводів та катетерів у серцево-судинній системі є загальноприйнятою практикою, тому ушкодження судин, емболізація та наступний рестеноз є головним об'єктом занепокоєння кардіологів у процесі катетеризації або хірургічного втручання, а також у післяопераційний період. Альтернативні методи, такі як ендартеректомія, сполучені з виникненням порівнянних проблем. Кожна процедура, пов'язана з маніпулюванням артеріями, тобто - судинна хірургія та ангіопластика, допускає розвиток гіперплазії інтими. Користь, яку можуть принести способи запобігання або гальмування розвитку гіперплазії інтими неможливо переоцінити, а переваги способу, що дозволяє досягати цих ефектів без побіжного створення системних ефектів, є ще більш очевидними.

Таким чином, очевидна необхідність розробки поліпшених фармацевтичних препаратів та способів інгібування самих ранніх подій у патофізіології (тобто адгезії тромбоцитів) та очікується, що досягнення в цій сфері дозволять значно знизити рівні захворюваності та смертності, пов'язаних з такими процедурами, як ангіопластика та хірургічне втручання.

У загальному випадку, даний винахід включає

введення недавно описаного інгібітора адгезії тромбоцитів Саратину усередину або на обрану зону усередині або на порожнині тканин, тобто, у судинну систему або органи, за таких умов, щоб Саратин можна було застосовувати місцево, як топічний агент або єднальне покриття на поверхні, для запобігання та інгібування небажаної тромбоцитарної та/або рестенозної реакції на ушкодження стінки судини, включаючи ушкодження, обумовлені стентами, діалізними трансплантатами, іншими судинними трансплантатами, та для лікування рубців, що формуються при легких травмах, а також для лікування та пасивації нестабільних атеросклеротичних осередків.

Саратин являє собою недавно описаний [WO 0056885] рекомбінантний протеїн 12кД, спершу виділений з п'явки. Протеїн інгібує залежне від vWF утворення зв'язків тромбоцитів з колагенами стінки артерії при умовах підвищеного зрушення, та саме цей аспект винаходу робить Саратин придатним для інгібування артеріального тромбозу. Інший новий аспект полягає в тому, що Саратин можна застосовувати як топічний агент в зоні ушкодження, що приводить до гальмування тромбозу та/або гіперплазії інтими без яких би то ні було системних ефектів. Це представляє методику зі специфічними ефектами, що цілком підходить для застосування рівною мірою як хірургами, так і кардіологами.

Саратин можна комбінувати з безліччю різноманітних терапевтичних агентів для постачання на місці. Прикладами речовин, застосовуваних у коронарних артеріях, є антитромботичні агенти, такі як простагліні та саліцилати, тромболітичні агенти, такі як стрептокіназа, урокіназа, активатор плазміногену тканин (TPA) та анісоїльований комплекс, що активує, плазміноген-стрептокіназа (APSAC), судинорозширювальні агенти, такі як нітрати, ліки, що блокують кальцій у каналах, антипроліфераційні агенти, такі як колхіцин, та алкілувальні агенти, інтеркалярні агенти, фактори модулювання росту, такі як інтерлейкіни, трансформуючий ріст фактор-бета та аналоги виділеного з тромбоциту фактора росту, моноклонні антитіла, орієнтовані проти факторів росту, протизапальні агенти, як стероїдні, так і нестероїдні, та інші агенти, що можуть модулювати тони судин, їхні функції, артеріосклероз, і реакцію загоєння ушкодження судини або органа, що виникло у результаті втручання. У комбінації або покриття за даним винаходом можна також включати антибіотики. Більш того, покриття можна застосовувати для доставки фармацевтичних препаратів орієнтовно, усередину стінки судини. За допомогою введення діючої речовини в здатний розбухати полімер, цей активний агент можна вивільняти при розбуханні полімеру.

В одному з втілень даного винаходу, покриття виготовляють з гідрогелю, такого як оксид поліетилену, альбумін, гідрофільні поліметакрилати та гідрофільні поліуретани.

Даний винахід відноситься, крім того, до застосування Саратину та його похідних, наприклад, через пристрої для доставки ліків у потрібне місце/катетери або через стенти та покриття стентів, а також через судинні трансплантати та покриття

трансплантатів. Винахід відноситься також до способів призначення Саратину в композиціях, з яких із часом вимивається регульована кількість Саратину в локалізованій зоні.

Зокрема, одне з втілень даного винаходу відноситься до застосувань катетерних пристроїв для доставки Саратину до потрібної зони; за допомогою катетерів Саратин можна також застосовувати усередині тканин самостійно або разом з іншими терапевтичними агентами поза полімерною матрицею. Основні вимоги до застосовуваного полімерного матеріалу за даним способом полягають у його біосумісності та здатності вивільняти лікарські речовини, яку можна пристосувати для специфічного застосування.

Контрольованого місцевого вивільнення Саратину можна досягти шляхом одного тільки просочування, одного тільки іонтофорезу та однієї тільки електропорації, або для ефективного вивільнення та введення Саратину усередину порожнини судини можна використовувати комбінацію іонтофорезу та електропорації. Переважно, якщо катетер придатний для виконання процедури, спрямованої на підтримку високої концентрації лікарського препарату в обраній ділянці простору судини, так, що це приводить до поліпшеного покриття судини одним Саратином або його комбінацією з додатковими лікарськими речовинами.

Даний винахід особливо корисний для місцевого постачання Саратину протягом або після процедур кардіологічного втручання, таких як ангіопластика, імплантація стента та ендартеректомія.

Рекомбінантний Саратин, що підходить для застосування за даним винаходом, експресували та виділили. з *Hansenula polymorpha*; було виявлено, що він діє через блокування утворення зв'язків vWF з колагеном та ефективно запобігає адгезії тромбоцитів до колагену при підвищеному зрушенні. Саратин робив залежне від дози інгібування зв'язування очищеного людського vWF з людськими колагенами типу I та типу III ( $IC_{50}=0,23\pm0,004$  та  $0,81\pm0,04$ мкг мл<sup>-1</sup> відповідно) та з колагеном шкіри теляти ( $IC_{50}=0,44\pm0,008$ мкг мл<sup>-1</sup>). Крім того, Саратин виявив аналогічну інгібуючу здатність проти зв'язування з цими колагенами vWF плазми людини, гризунів та свиней. У проточній камері, при умовах підвищеного зрушення ( $2700$ сек<sup>-1</sup>), Саратин виявляв залежну від дози та сильну інгібуючу дію на формування агрегатів тромбоцитів на покритій колагеном поверхні ( $IC_{50}=0,96\pm0,25$ мкг мл<sup>-1</sup>), але при зниженому зрушенні ( $1300$ сек<sup>-1</sup>) на кривій залежності від дози спостерігалось зрушення вправо ( $IC_{50}=5,2\pm1,4$ мкг мл<sup>-1</sup>). Резонансним аналізом поверхневих плазмонів на людському колагені типу III виявлені єднальні Саратин сайти як з високою, так і з низькою спорідненістю ( $K_d=5\times10^{-8}$ М та  $2\times10^{-6}$ М відповідно), та хоча низькі концентрації Саратину, що інгібували адгезію тромбоцитів при підвищеному зрушенні (тобто насичення єднальних сайтів з високою спорідненістю), не чинили дії на залежну від vWF агрегацію тромбоцитів, індуковану колагеном, було виявлено, що високі концентрації (тобто, насичення єднальних сайтів з низькою спорідненістю) інгібують агрегацію тромбоцитів. Ці дані свідчать, що Саратин є сильним інгібітором залежної від vWF

адгезії тромбоцитів до колагену, що створює основу для його терапевтичного потенціалу як анти-тромботичного агента.

Крім того, дослідженнями встановлено, що Саратин виявляє сильну та залежну від дози інгібуючу дію на зв'язування VWF не тільки з колагеном шкіри теляти, але і з людським колагеном типів I та III, кожний з яких у достатку присутній в субендотеліальних шарах стінки артерії, і, як вважається, відіграє важливу роль у взаємодіях тромбоцитів зі стінкою судини [Thromb Haemost 1997, 78(1): 434-438]. Оскільки взаємодії колаген-vWFPb/IX/V відбуваються тільки при досить підвищеному зрушенні, важливим аспектом даного винаходу була демонстрація факту, що Саратин ефективний не тільки при статичних умовах, але також і в середовищі, яке найбільш наближене до ситуації, що зустрічається *in vivo*. У проточній камері, яка дозволяє змінювати сили, зрушення для моделювання такого середовища, Саратин чітко інгібував акумулювання тромбоцитів до колагену, особливо при більш високих зрушеннях. Зсув вправо кривої залежності від дози в результаті зменшення зрушення є істотним, тому з цього можна зробити висновок, що ефективність Саратину *in vivo* може бути локалізована в зонах високого зрушення, де в результаті змін зверненої до крові ендотеліальної поверхні, наприклад, у зв'язаних з атеросклеротичними осередками або механічним втручанням, відбувається порушення ламінарності кров'яного потоку.

Дослідженням резонансу поверхневих плазмонів із Саратином встановлено, що колаген може захоплювати Саратин двома незалежними еднальними сайтами, один з високою спорідненістю, а другий - з низькою спорідненістю. Здатність Саратину інгібувати зв'язування vWFP з колагеном пояснюється насиченням еднального сайту з високою спорідненістю, в якого значення  $IC_{50}$  складають близько  $5 \times 10^{-8} M$ , тобто, дорівнюють константі дисоціації для цього сайту. Оскільки незалежна від vWFP індукована колагеном агрегація тромбоцитів інгібувалася тільки великими дозами Саратину, (більше 100мкм), можна припустити, що насичення еднальних колаген сайтів з низькою спорідненістю асоційоване з інгібуванням прямих взаємодій колаген-рецептор колагену.

Іншим предметом даного винаходу є ефект, що складається у тому впливі, що Саратин чинить на локальне оточення ендартеректомізованої судини без необхідності системного розподілу та без зміни функції тромбоциту або зміни коагуляції, що робить його ідеальною методикою для топичного застосування під час процедур судинної хірургії та радіологічного втручання.

У цьому аспекті даного винаходу, дію терапевтичного Саратину досліджували на моделі ендартеректомії сонної артерії пацієнтів (CEA), описаної раніше [J. Vase. Surg. 1998, 28: 909-918]. Передбачається, що активація PLT є першим етапом розвитку тромбозу та рестенозу після CEA, обумовлених ІН. Було виявлено, що місцеве застосування Саратину на поверхні з боку порожнини зменшує кількість тромбоцитів, що налипають на ендартеректомізовану артерію і, таким чином, гальмує розвиток післяопераційного тромбозу

та ІН.

Результати експериментів по антиадгезійній дії Саратину на тромбоцити, які оцінювали після проходження двох різних післяопераційних періодів, свідчать, що кількість тромбоцитів, які налипилися на стінку судини через 3 години (Fig.4) та через 24 години (Fig.5) після ендартеректомії сонної артерії, у пацієнтів, оброблених Саратином, було значно меншим, чим у пацієнтів з контрольної групи.

Адгезія тромбоцитів через 3 години була зменшена на 59% ( $64 \pm 17,2$  у порівнянні з  $155 \pm 33,4$  PLT на решітку,  $P=0,05$ ) та на 77% через 24 години ( $35 \pm 11,3$  у порівнянні з  $149 \pm 36,6$  PLT на решітку,  $P=0,0110$ ). У контрольній групі адгезія тромбоцитів була аналогічною через 3 години та через 34 години, однак у групі, обробленій Саратином, адгезія зменшилася від 64 до 35 тромбоцитів на решітку.

На Fig.6 та 7 представлені типові картини ендартеректомізованої поверхні, обробленої та неопрацьованої топичним Саратином, отримані за допомогою скануючої електронної мікроскопії при 2000-кратному збільшенні. На Fig.6A показана контрольна поверхня через 3 години після ендартеректомії сонної артерії, яка свідчить про достаток клітинного матеріалу, фібринових ниток, численних червоних кров'яних клітин та численних тромбоцитів, помітних зовсім чітко. На Fig.6B показана оброблена Саратином поверхня через 3 години після ендартеректомії сонної артерії. Відзначено невеликі клітинні елементи та майже вільна поверхня колагену. На Fig.7A показана контрольна поверхня через 24 години після ендартеректомії сонної артерії, тромбоцити видні як маленькі білі точки. На Fig.7B показана оброблена Саратином поверхня через 24 години після ендартеректомії сонної артерії. У випадку обробки Саратином спостерігається виразне зменшення адгезії тромбоцитів.

Застосування топичного Саратину після ендартеректомії сонної артерії значно гальмує розвиток гіперплазії інтими в порівнянні з контрольною групою. Відсоток порожнинного стенозу, що використовується як міра ІН, був значно меншим у випадку застосування Саратину, чим у контрольній групі. Це зниження формування ІН корелювало з інгібуванням адгезії PLT. У вирахуванні порожнинного стенозу, у контрольних пацієнтів спостерігалось  $29,8 \pm 6,8\%$ ,  $p=0,0042$  порожнинного стенозу проти  $10,9 \pm 1,8\%$  порожнинного стенозу в обробленій Саратином групі (Fig.6). В обробленого Саратином пацієнта діаметр порожнини був на 18,9% більше, ніж у контрольних пацієнтів. Результати гістологічного аналізу свідчать, що через два тижні після ендартеректомії сонної артерії в 5 з 15 контрольних пацієнтів (15%) розвився повноцінний тромбоз сонної артерії при тім, що тромбоз сонної артерії спостерігався в 0 пацієнтів з 15 осіб, оброблених Саратином (0%). Вірогідний аналіз хі-квадрат дає імовірність успішного результату 16,238, це означає, що імовірність розвитку тромбозу з закупоркою в контрольній групі в 16 разів більше, ніж у пацієнтів, оброблених Саратином  $P=0,0156$ .

В обробленій Саратином групі не спостерігалось підвищеної кровотечі уздовж лінії накладено-

го на артерію шва. В оброблених Саратином пацієнтів не виявлено значних змін у тривалості кровотечі та числі системних тромбоцитів у порівнянні з контрольними пацієнтами через 3 та 24 години після ендартеректомії.

Модель СЕА знаходиться в близькій відповідності з операцією СЕА людини, й отже, на підставі отриманих результатів можна запропонувати спосіб зменшення шкідливого впливу адгезії та агрегації тромбоцитів у зоні ендартеректомії без системного впливу на функцію тромбоцитів або зниження гемостазу. Просте, теплічне застосування Саратину в процесі СЕА пацієнтів, зменшує адгезію та агрегацію тромбоцитів, а також - наступний ризик порожнини сонної артерії, обумовлений гіперплазією інтими.

У Таблиці 3 приведені результати по тривалості кровотечі та кількості тромбоцитів. Статистично значимого розходження між довгочасністю кровотечі до та після операції не спостерігалось. Крім того, не спостерігалось статистично значимого розходження між числом тромбоцитів в оброблених Саратином та контрольних пацієнтів.

Ми довели значне зменшення адгезії та акумулювання тромбоцитів після ушкодження судини, аналогічного ендартеректомії. Зменшення адгезії тромбоцитів спостерігалось як відразу після ендартеректомії (3 години), так і через 24 години. Через 24 години ефект був більш значним, чим ми очікували, та цей ефект обумовлений не прямим інгібуючим впливом Саратину на колаген (період напіврозпаду Саратину в сироватці складає 90 хвилин), а пов'язаний, скоріше, з вихідним інгібуванням агрегації тромбоцитів та наступним порушенням каскаду активації тромбоцитів. Якщо інгібується вихідне прилипання тромбоцитів до незахищеного колагену, то не може початися і каскад активації тромбоцитів. Дані, представлені на Фіг.4 та 5, демонструють, що місцеве застосування Саратину на свіжеушкодженій судині може в значній мірі інгібувати адгезію тромбоцитів. Саратин інгібував адгезію тромбоцитів на 60% та 75% через 3 та 24 години відповідно. Це інгібування визначається по видимих розходженнях в осадженні клітинних елементів, що спостерігаються між контрольними та обробленими Саратином артеріями через 3 години та 24 години (Фіг.7 та 8). Ми припускаємо, що це зменшення клітинної реакції обумовлено інгібуванням адгезії тромбоцитів. Це представляє унікальний варіант терапії для інгібування адгезії тромбоцитів до ушкодженої судини. Через два тижні після ендартеректомії сонної артерії у контрольних пацієнтів був значно менший діаметр порожнини, чим в особин, оброблених Саратином (Фіг.9). Кількість осередків розвитку гіперплазії інтими в оброблених Саратином пацієнтів був значно знижений, що корелює зі зменшеними адгезією та акумулюванням тромбоцитів. Виявлення зменшення числа осередків гіперплазії інтими та тромбозу, що пов'язане зі зниженням адгезії тромбоцитів, забезпечує клінічно важливі границі та наслідки зменшеної адгезії тромбоцитів. Це свідчить, що специфічне до осередків несистемне інгібування адгезії та агрегації тромбоцитів приводить до зменшення швидкості розвитку тромбозу та закупорки, а отже, зменшує відсоток післяопераційних черепномозкових подій та інсультів після ендартеректомії сонної артерії.

Поліпшення рівня гіперплазії інтими та порожнинний стеноз демонструється, крім того, важливим фактом зменшення відсотка тромбозу в пацієнтів, оброблених Саратином. У 33% контрольних пацієнтів виявлявся тромбоз, тоді як у жодній з оброблених Саратином сонних артерій тромбозу не спостерігалось. Особливо важливе клінічне значення має характерну для цього агента відсутність системних ефектів. Місцеве застосування Саратину не робить впливу на випадки системної кровотечі або кількості тромбоцитів. На цій підставі можна зробити висновок, що зменшення адгезії тромбоцитів та наступне зниження тромбозу та гіперплазії інтими є результатом місцевого впливу. Виявлення цих нових, пов'язаних із Саратином, фактів має важливе значення в тому відношенні, що спектр клінічних застосувань для методик, що можуть здійснювати місцеве інгібування шкідливих ефектів адгезії та активації тромбоцитів без порушення механізму системного гемостазу дуже широкий.

Раніше було зазначено, що різні терапевтичні втручання індукують локальні, ушкодження, які можна ідеально обробляти негайно й місцево. Залишені без обробки, ушкоджені клітини ініціюють серію процесів, втягнутих у згортання, додаткову активацію та клітинну реакцію вивільнення цитокінів, індукування проліферації та інші біологічно активні процеси. Ці складні, взаємозалежні процеси важко зупинити, якщо вони вже почалися.

Важливий аспект даного винаходу полягає в тому, що Саратин розташовано безпосередньо на оброблюваних тканинах. Іншим аспектом місцевого застосування є мінімізація потенційних проблем, пов'язаних із системними ефектами лікарських препаратів, застосовуваних для втручання.

В ідеалі, лікування Саратином можна призначати одночасно з придатним терапевтичним втручанням, яке можна здійснювати шляхом введення Саратину в покриття на хірургічних пристроях, таких як балонний катетер, або інші пристрої або їхні деталі. Інший аспект може також включати безпосереднє покриття Саратином ушкоджених судин.

Крім того, за даним винаходом можна застосовувати і звичайні способи постачання Саратину, такі як тип вільної рідини, що включає комбінації з іншими терапевтичними агентами. Проте, застосування матриці полімер/гідрогель має визначені переваги перед постачаннями вільною рідиною. Постачання агента, що був введений у полімерну матрицю, не вимагає додаткових порожнин у допоміжному катетері для транспортування вільної рідини з лікарським розчином до місця обробки та назад.

Крім того, полімерна матриця виключає ризик витоку лікарського розчину зі струмом крові, що може відбуватися при нецільному заповненні балоном сегментів судини, що обумовлює ризик піддання нецільових тканин впливу високих концентрацій лікарського препарату.

Загальним технічним рішенням щодо місцевого застосування Саратину або на медичному пристрої, або у вигляді покриття на ушкодженій судині, є, наприклад, введення Саратину в полімерне

або гідрогелеве покриття.

Щодо полімерних композицій, використовуваний тут термін "гідрогель" охоплює синтетичні полімери з порами або порожнинами різних розмірів та ємкостей, та змінними фізико-хімічними властивостями, особливо - зарядом або гідрофільною/гідрофобною природою гелевої матриці, які можна варіювати в процесі виготовлення покриття або пристрою з покриттям. Фахівцям відома безліч синтетичних еластомерів та полімерних матеріалів, що зустрічаються в природі. Саратин можна вводити в матрицю в процесі одержання полімеру, або додавати після покриття або формування полімеру в бажану форму. Крім того, для формування полімерних матриць, застосовуваних за даним винаходом, можна використовувати багато з відомих, численних, різних полімерних матеріалів та способів виготовлення. Приклади придатних полімерних матеріалів або комбінацій включають, але не обмежуються цим, біосумісні та/або полімери, що розкладаються мікроорганізмами.

Були вивчені деякі алкілалкіл- та ціаноакрилати в аспекті їхнього хірургічного застосування, та виявилось, що особливо придатними є деякі ізобутилціаноакрилати.

Типовий гідрогелевий полімер можна одержати із суміші мономерів, що містить 40-60 вагових часток очищеного моноєфіру гідроксіалкілалкілакрилату, що має єдиний олефіновий подвійний зв'язок, 40-60 вагових часток метакрилатного мономеру, що містить один олефіновий подвійний зв'язок та 0,001-5 вагових часток ініціатора полімеризації. Полімеризацію можна робити за стандартними методиками полімеризації в масі, полімеризації в розчині, полімеризації в суспензії або полімеризації в емульсії. Вибір методики полімеризації залежить від необхідного обсягу полімеру та природи кінцевого продукту, який потрібно одержати. Типовий гідрогелевий продукт може бути описаний молярним відношенням моноєфіру до метакрилатного мономеру в діапазоні від 1:1 до 2,3:1, переважно 1,5:1, в якому діаметр пір полімеру перевищує 90 ангстрем.

Оскільки моноєфір гідроксіалкілакрилату має єдиний олефіновий подвійний зв'язок, перелік придатних сполук включає, але не обмежується ними, 2-гідроксietилметакрилат, гліцерилметакрилат, 2-гідроксипропілметакрилат, гліцидилметакрилат, 2-гідроксietилакрилат; та 2-гідроксипропілакрилат. Придатними метакриловими мономерами є метакрилова кислота, метакриламид 5 та метакрилонітрил.

Вибір ініціатора полімеризації може залежати від методики полімеризації або кінцевого призначення полімеру. Наприклад, якщо полімер передбачається сформувати у вигляді твердого об'єкта, можна використовувати ініціатори типу вільних радикалів.

У число кращих ініціаторів цього типу входять біфункціональні полієфіри, такі як 2,5-диметил-2,5-біс(2-етилгексоїлперокси)гексан або третинного бутилу пероксипівалат. Альтернативно, якщо остаточним призначенням полімеру є його застосування у вигляді покриття, що наносять у вигляді суміші мономерів та полімеризують *in situ*, ініціатором можуть бути активовані опроміненням типу УФ

каталізатори 2,2-азобіс(2-метилпропілнітрил) або азобісбутіронітрил (AIBN). Застосування цих ініціаторів не обмежено конкретною методикою полімеризації або конкретним кінцевим продуктом. Наприклад, ініціатори типу вільних радикалів можна застосовувати в покриттях, та активовані опроміненням ініціатори можна використовувати при формуванні твердих об'єктів.

На додаток до у великій мірі схожим фракціям моноєфіру та метакрилатного мономеру, суміш мономерів можна зміцнити слідовими кількостями алкілакрилату з більш довгими ланцюгами або сомономеру метакрилатного ефіру, такого як циклогексилметакрилат, триметилпропантриметакрилат або етиленгліколю диметакрилат. Такі додаткові сомомери зміцнюють сітчасту структуру у випадках, коли бажано зміцнити доданий полімер. Слідові кількості цих сомономерів, у загальному випадку, складають менш 0,1ваг.% усієї суміші мономерів.

Гідрогелеві полімери, що застосовуються за даним винаходом, можна формувати таким чином, щоб одержувати об'єкти, що зшиті внутрішніми впливами в достатній мірі, щоб остаточний об'єкт не вимагав додаткових мономерів, що зшивають.

Додатковими прикладами полімерів, що розкладаються мікроорганізмами, є полі(лактиди), полігліколіди, поліангідриди, поліортоефіри, поліактали, полідигідропірани, поліціаноакрилати та їхні сополімери, а також поліетиленгліколь. Вони можуть приймати форму сополімерних гідрогелів або структурованих полімерних мереж, у які ліки, призначені для концентрованого постачання в потрібну зону, можна або вводити в процесі полімеризації, або, у випадку визначених гідрогелів, завантажувати згодом. Кращими матрицями можуть бути ті, котрі створені відповідно до молекулярних характеристик агента, щоб контролювати його дифузію назовні.

Найрізноманітніші типи катетерів та інших медичних пристроїв, покритих Саратином, можна сконструювати та застосовувати відповідно до індивідуальних терапевтичних потреб, для задоволення яких вони були сконструйовані, або для вирішення більш специфічної задачі доставки завантаженого Саратином полімеру в потрібне місце. Даний винахід пройшов тестування на балонному катетері, що продається за назвою Blue medical Devices BV GO, що поставляється компанією Blue medical, але сфера його застосування не обмежується даним типом катетера.

Інші приклади

Приклад 1

Зв'язування очищеного vWF та тромбоциту з колагеном у статичних умовах

Утворення зв'язків vWF з колагеном досліджували на мікротитрувальних пластинках, відповідно до відомих методик [Blood 1995, 85 (3): 705-711]. Різні колагени - людський колаген типів I та III та колаген шкіри теляти (Sigma) - покрили сполукою з 50мкл колагену, розчиненого в 50мл оцтової кислоти, що нанесли по 125мкг мл<sup>-1</sup> на 96-ямкові мікротитрувальні пластинки, та витримували протягом ночі в присутності 200мкл PBS, щоб підштовхнути ренатурацію. Після блокування непокритих ділянок за допомогою BSA, очищений



людський vWF ( $1,25\text{мкг мл}^{-1}$  для пластинок, покритих колагеном типу I та колагеном шкіри теляти;  $0,625\text{мкг мл}^{-1}$  для пластинок, покритих колагеном III) або розведену звичайну плазму (людська плазма: 1/80 на колаген I та III, 1/40 на колаген шкіри теляти; плазма хом'яка, миші та свині: 1/80 на колаген III; 1/20 на колаген I та колаген шкіри теляти) додали в ямки в присутності Саратину та інкубували протягом 2 годин (розведена плазма) або 1 години (очищений vWF). Зв'язування залишкового vWF з колагеном визначали після наступного етапу промивання за допомогою антисироватки кролика анти-vWF (Dako, Copenhagen, Denmark), транспонованої пероксидазою хрому, що проробили та вимірили поглинання світла при 492нм.

Якщо мікротитрувальні пластинки піддавали попередньому інкубуванню з людським колагеном I, людським колагеном III та колагеном шкіри теляти, наступне інкубування очищеного vWF у присутності Саратину було сполучено з залежним від дози інгібуванням утворення зв'язків vWF-колаген, та значення  $IC_{50}$  складали  $0,23\pm 0,004$ ,  $0,81\pm 0,04$  та  $0,44\pm 0,008\text{мкг мл}^{-1}$  відповідно (Фіг.1). Якщо очищений vWF був замінений розведеною звичайною людською плазмою, інгібуюча здатність Саратину зберігалася (Таблиця 1). Саратин інгібував також зв'язування vWF з різними колагенами, що тестували в розведеній плазмі свині, хом'яка та миші, та виявив відчутну найвищу ефективність проти колагену I (Таблиця 1).

#### Приклад 2

Адгезія тромбоцитів при підвищеному зрушенні

З урахуванням важливості сил зрушення для контролю залежної від vWF адгезії тромбоцитів до колагену [J. Lab. Clin. Med. 1974, 83(2): 296-300], у проточній камері були проведені перфузійні дослідження для вивчення інгібуючої дії Саратину в умовах потоку, аналогічних тим, що зустрічаються в ушкоджених або уражених хворобою артеріях. Колаген шкіри теляти нанесли на пластиківі покривні стекла за описаною раніше методикою [Blood 1995, 85(3): 705-711]. Перфузії здійснювали у перфузійній камері з рівнобіжними пластинками з двома тримачами покривних стекел, висота камери складала 0,4, 0,6 або 1,0мм, а ширина - 1,0см, у пульсуючому потоці (роликовий насос, Watson Mariow 603 S, VEL, Leuven, Belgium) при приблизних швидкостях зрушення 2700, 1300 та  $300\text{сек}^{-1}$  відповідно. Збережену від згортання здорову кров ( $0,2\text{ IU мл}^{-1}$  гепарину з низькою молекулярною вагою, Clexane) розприскали по покритим колагеном покривним стеклам на 5хв., після чого промиті покривні стекла підфарбували Grunwald-Giemsa та оцінили осадження тромбоцитів за допомогою оптичної мікроскопії та аналізу зображень за відомою методикою [Blood 1995, 85 (3): 705-711], з використанням покриття поверхні як кількісного параметру.

При швидкості зрушення  $2700\text{сек}^{-1}$ , спостерігалось залежне від дози Саратину інгібування адгезії тромбоцитів зі значеннями  $IC_{50}=0,96\pm 0,25\text{мкг мл}^{-1}$  (Фіг.2). Проте, при більш помірній швидкості зрушення  $1300\text{сек}^{-1}$ , спостерігалось виразне зрушення вправо на кривій залежності від дози, зі значеннями  $IC_{50}=5,2\pm 1,4\text{мкг мл}^{-1}$  (Фіг.2). При швид-

кості венозного зрушення  $300\text{сек}^{-1}$ , Саратин виявився нездатним інгібувати адгезію розбризканих тромбоцитів аж до  $10\text{мкг мл}^{-1}$  (дані не приводяться).

#### Приклад 3

Аналіз зв'язування за допомогою резонансу поверхневих плазмонів (SPR)

Взаємодії протеїнів ідентифікували та охарактеризували за допомогою SPR на установці BIAcore 3000 (BIAcore, Freiburg, Germany). Відповідно до інструкції постачальника апаратури, були використані паруючі агенти. Зв'язування із сенсором CM 5 було зроблено через активовані карбоксилатні групи, щоб вивільнити амінові групи людського колагену типу III (Sigma). Підганяння pH та хімічні реакції спарювання провели при стандартних умовах [Anal Biochem. 1991, 198(2): 268-277, JAI Press Ltd., 1992]. Для спарювання колаген розбавили до  $0,125\text{мкг мл}^{-1}$  у 10мМ ацетатного буфера (pH4,5), що привело до появи 331 резонансної одиниці (RU) іммобілізованого матеріалу. Цю матрицю використовували для вивчення зв'язування очищеного рекомбінантного Саратину, що був розчинений у 20мМ Hepes (pH7,4), 150мМ NaCl, 5мМ EDTA, 0,005% Tween 20. Всі експерименти по зв'язуванню проводили при  $25^{\circ}\text{C}$ . Титрування із Саратином робили при варіюванні концентрацій від 7,8нм до 10мкм. Одержані експериментальні значення плато RU були нанесені за рівнянням:

$$R_{eq}/\text{концентрація Саратину} = (-K_d \times R_{eq}) + (K_d \times R_{max}).$$

Титрування Саратину на іммобілізованому на поверхні колагені привело до залежного від концентрації зв'язування. Далі, максимальна кількість Саратину, зв'язаного з колагеном на поверхні датчика, обумовила появу більш високого сигналу, чим максимальний сигнал, розрахована для моделі зв'язування 1:1. Це вказує на існування більш, ніж одного єднального сайту для Саратину на колагені типу III, далі цей висновок був підтверджений фактом, що підганяння даних по Ленгмюру до моделі зв'язування 1:1 не дають позитивних результатів.

Аналіз Скетчарда даних SPR свідчить про існування двох різних єднальних сайтів, що мають значно відмінну спорідненість до Саратину (Фіг.3). Розрахунок констант рівноваги привів до одержання константи дисоціації  $5 \times 10^{-8}\text{M}$  для сайту з високою спорідненістю та  $2 \times 10^{-6}\text{M}$  для єднального сайту з низькою спорідненістю.

#### Приклад 4

##### Агрегація тромбоцитів

Специфічність Саратину до функції тромбоциту оцінили шляхом дослідження агрегації у збагаченій тромбоцитами плазмі з використанням як агоністів колагену, ADP, ристоцетину, арахідонової кислоти або аналогів тромбоксану U46619. Цитратовану кров (3,13%) здорових донорів, що не приймали ліків центрифугували (15хв., 100г), щоб одержати збагачену тромбоцитами плазму, до якої додали Саратин (кінцева концентрація  $0-200\text{мкг мл}^{-1}$ ) за 1хв. до індукування агрегації тромбоцитів колагеном ( $0,5\text{мкг мл}^{-1}$ ), ADP ( $2,5\text{мкм}$ ), ристоцетином ( $0,9\text{мг мл}^{-1}$ ), арахідоновою кислотою ( $1,0\text{мМ}$ ) або U46619 ( $1,3\text{мкм}$ ). Для кожного агоніста спостерігався максимум агрегації (амплітуда) після проходження 5-хвилинного періоду.

Саратин виявився нездатним інгібувати максимальну агрегацію по всім тестованим агоністам, включаючи колаген, при кінцевій концентрації аж до 40мкг мл<sup>-1</sup> (Таблиця 2). Проте, Саратин міг частково інгібувати індуковану колагеном агрегацію тромбоцитів при 100мкг мл<sup>-1</sup> (не показано), та цілком інгібувати при 200мкг мл<sup>-1</sup>, хоча на агрегацію до ADP Саратин не оказував впливу навіть при концентрації 200мкг мл<sup>-1</sup>.

#### Приклад 5

##### Модель СЕА пацюка

У моделі СЕА пацюка, в якій використовується відкрита методика з артеріотомією, використовували пряме видалення інтими, частин середовища та шва артерії. Одна група пацюків одержувала Саратин, у той час, як інша група використовувалася для контролю. Виміри кінцевої точки включали 1) адгезію PLT, 2) швидкість тромбозу, 3) розвиток гіперплазії інтими. Саратин застосовували безпосередньо до поверхні ендартеректомізованої поверхні сонної артерії перед закриттям артерії. Електронні мікрознімки (2000 X) препаратів сонних артерій використовували для кількісного аналізу агрегації PLT. Загальні кількості PLT розраховували з використанням стандартизованої палетки. ІН та тромбоз аналізували за допомогою комп'ютеризованого морфометричного аналізу підфарбованих еластином сегментів сонної артерії з прямим виміром площі ІН.

#### Приклад 6

##### Операція ендартеректомії сонної артерії.

Тварин присипляли ізофлюраном у скляному ковпачку, зважували, та потім анестезували комбінацією кетаміну (100мг/кг) та ацепромазину малеату (1мг/кг) внутрішньоочеревинно. Після того, як адекватність анестезії підтверджувалася відсутністю реакції на роздратування задньої лапи, підшкірно в області верхньої частини середини спини вводили 4см<sup>3</sup> звичайного саліну, що служив джерелом рідини (1см<sup>3</sup>/кг) для компенсації втрати крові в ході операції. Потім область шиї виголювали та обробляли 7%-м ізопропіловим спиртом. Із застосуванням стерильної методики та препаративного мікроскопу (×40, sz40 Olympus, Olympus America Inc., Melville, NY) робили цервікальний розріз. Відокремлювали зовнішні м'язи та робили розсічення до рівня правої сонної артерії. Потилічні нерви в області артерії довільним чином відтинали для збереження фарингеальної функції та запобігання післяопераційного респіраторного ризику.

Після адекватного впливу на сонну артерію, ближній та далекий контроль розвилки, приблизно на 1,5-см відстані, здійснили за допомогою накладення 3-0 турнікетів із шовного шовку. За допомогою корнеального леза зробили артеріотомію та розтягли до довжини 6мм за допомогою мікроножиць. За допомогою голки №27, інтиму процарапали поперечно по судині по двох рівнобіжних лініях, що відстоять одна від одної приблизно на 2мм. Інтиму та серединний шар видалили мікропіпетом. Саратинова група пацюків одержувала по 5мкл розчину Саратину, застосованого безпосередньо на ендартеректомізовану поверхню. Артеріотомію закрили бігучим 10-0 швом з моноволоконного нейлону (MS/9, Ethilon, Ethicon Inc.,

Somerville, NJ), починаючи від далекого кінця. Далекий турнікет видалили першим, щоб оцінити гемостаз лінії шва після видалення ближнього турнікета. Тривалість застосування Саратину склала 5 хвилин, що відповідає часу, що потрібно для закриття артерії. Будь-яку кровотечу лінії шва обережно тампонували стерильним кінчиком бавовняного аплікатора до досягнення гемостазу. Ендартеректомізовану сонну артерію оцінювали ручним Doppler, щоб підсилити наочність. Потім зовнішній шар м'язів та шкіру зашивали бігучим 3-0 швом, що розсмоктується.

#### Приклад 7

##### Адгезія тромбоцитів

У підгрупах адгезії тромбоцитів, пацюків повторно анестезували, збирали ендартеректомізовані сонні артерії та фіксували їх у 4% розчині глутальдегіду через 3 години або через 24 години після ендартеректомії сонної артерії. Протягом процедури збору, сегменти сонної артерії були тривалий час відкритими уздовж області шва, таким чином, залишаючи незахищеною ендартеректомізовану область. Потім артерії постфіксували тетроксидом осмію, дегідрували в серії градаційних спиртів, важливі точки висушували за допомогою CO<sub>2</sub> (1072 psi та 31,1°C), покривали золотом-паладієм та поміщали у скануючий електронний мікроскоп (JEOL JSM 5410, JEOL, USA Peabody, MA). Ендартеректомізовані області сканували при 2000-кратному збільшенні, та одержали фотографії зображень. Фотографічні зображення були погладжені та упорядковані в комбінацію, що дозволяє візуалізацію більшої зони, чим це можна було зробити за допомогою єдиного поля монітору скануючого електронного мікроскопа. Після монтажу комбінації фотографій, її накрили прозорою палеткою. Такі ж палетки були використані для фотографій усіх зразків. Для підрахунку загальної кількості тромбоцитів використовували 116 квадратів на кожній фотографії. Число 116 - це максимальне число квадратів, які можна було напевно знайти на всіх комбінаціях фотографій. Підрахунок тромбоцитів робили наосліп два спостерігачі.

#### Приклад 8

##### Гіперплазія інтими

Через два тижні після ендартеректомії сонної артерії, пацюків із групи гіперплазії інтими анестезували та оголювали ендартеректомізовану сонну артерію. Черевну порожнину розкрили по середній лінії, та розкрили периферичну аорту та внутрішню порожню вену. Зробили поперечний надріз порожньої вени, та периферичну аорту канюлювали катетером №20 для уливання нормального саліну при 100мм Hg доти, поки вихідний з порожньої вени потік не ставав чистим. Наступним етапом було уливання в рівному об'ємі 10% формаліну, що містить буферний розчин, при 100мм Hg, для завершення методу перфузії-фіксації. Односантиметровий сегмент оперованої сонної артерії відінули та помістили в 10% формалін до наступної обробки для гістології. Артерії блокували парафіном, секціонували та підфарбовували еластином за допомогою барвника Verhoeff та Van Gieson. Для стандартизації області секціонування, відбирали кратні сегменти через інтервали 3мм, кожний з яких розташовувався уздовж лінії безупинного 10-

О нейлонового шва, що закриває артеріотомію. Підфарбовані еластином стекла сфотографували за допомогою цифрового фотоапарата KODAK DC 120 Zoom (Eastman KODAK Company, Rochester, NY). На цей момент повинні вже бути помітні будь-які тромбозні сегменти. Нетромбозні зображення завантажили в комп'ютер, області порожнин сонних артерій проаналізували за допомогою програми National Institutes of Health (Bethesda, MD), Image Software, Version 0.99f. Цей пакет програм дозволив нам окреслити внутрішню область гіперплазії інтими і, таким чином, одержати точну оцінку площі поперечного перерізу порожнини судини. Крім того, була визначена зовнішня область гіперплазії інтими. Різницю між двома областями (зовнішня площа гіперплазії інтими мінус дана порожнина) визначили як абсолютну площу гіперплазії інтими. Оскільки артеріальний поперечний переріз мав індивідуальні варіації форми, значення були виражені як відношення абсолютної площі гіперплазії інтими до зовнішньої границі гіперплазії інтими, та про їх згадується як про відсоток порожнинного стенозу. Це відношення представляє частку площі порожнини, зайняту гіперплазією інтими, та дозволяє робити порівняння поперечних перерізів артерій різних розмірів (4). Між вимірами, що наосліп робили два спостерігачі, виявлялися мінімальні розбіжності.

#### Приклад 9

Тривалість кровотеч та кількість тромбоцитів

Щоб оцінити вплив Саратину на кількість системних тромбоцитів та тривалість кровотеч, була обмірювана кількість системних тромбоцитів та тривалість кровотеч у 12 пацієнтів. При необхідності одержати зразки доопераційної крові кожного пацієнта, у них приходилося відбирати по 1-1,5см<sup>3</sup> крові, що представляє значну частку загального обсягу крові тварини. З урахуванням цього факту, логічно було очікувати зменшення кількості тромбоцитів після операції як у контрольних, так і в оброблених Саратином пацієнтів. Тому, щоб оцінити вплив Саратину на кількість тромбоцитів, ми визначали різницю між кількостями тромбоцитів для кожного пацієнта шляхом вирахування доопераційної кількості тромбоцитів з післяопераційної кількості тромбоцитів, та визначали розходження. Розходження кількості тромбоцитів проаналізували з використанням 2х2 конфігурації точок плану факторного експерименту, оброблених по моделі ANOVA, та продемонстрували відсутність статистично значимих розходжень кількостей тромбоцитів між контрольними та обробленими Саратином пацієнтами. У всіх пацієнтів перед операцією були визначені кількості тромбоцитів та тривалості кровотеч. Шість пацієнтів піддали ендартеректомії сонної артерії, та через три години після операції приспали та вимірили тривалості кровотеч та кількість тромбоцитів, а інші 6 пацієнтів приспали через 24 години після операції та вимірили тривалості кровотеч та кількість тромбоцитів. Три пацієнти з кожної тимчасової групи одержували топічний Саратин, а інші три пацієнти використовувалися для контролю.

Тривалості кровотеч визначали за допомогою поперечного надрізу дистальних 2мм хвоста пацієнтів та занурення приблизно 4см хвоста в розчин

фосфатного буферного розчину при 37°C. Вимірювали час, що пройшов від моменту надрізу до зупинки кровотечі, та визначали його як тривалість кровотечі. Кількість тромбоцитів визначали шляхом добору 1-1,5см<sup>3</sup> зразків крові з яремної вени, аналізували зразки в аналізаторі крові Coulter STKS та виражали результати у вигляді даних  $\times 10^3$ .

#### Приклад 10

Статистичні методи

Представлено значення  $\pm$  стандартна похибка.

Для порівняння кількості налиплих тромбоцитів, відсотка порожнинного стенозу та тривалості кровотеч в оброблених Саратином та контрольних пацієнтів, зробили непарний аналіз t-тест із використанням програми Stat View [SAS Institute Inc. Cary, NC 27513] версія 5.0. Відношення правдоподібності в аналізі хі-квадратів використовували для оцінки імовірності успішного результату для розвитку тромбозу через два тижні після ендартеректомії сонної артерії. Для оцінки розходжень доопераційної та післяопераційної кількостей тромбоцитів використовували 2х2 конфігурацію точок плану факторного експерименту, оброблених по моделі ANOVA.

#### Приклад 11

Експериментальні тварини

Пацієнтів Sprague-Dawley (350-400г) об'єднали в групи для ендартеректомії сонної артерії, призначені для двох головних цілей. 1) Оцінка адгезії тромбоцитів та 2) Оцінка швидкості порожнинного стенозу, обумовленого гіперплазією інтими, та швидкості тромбозу. В плані досягнення цих двох головних цілей, пацієнтів розділили на контрольних та оброблених Саратином тварин. Усіх пацієнтів піддали ендартеректомії сонної артерії (див. нижче), оброблені Саратином пацієнти одержали місцеve призначення 5мкл розчину Саратину на поверхню порожнини сонної артерії відразу після видалення інтими/шару середовища. Група адгезії тромбоцитів складалася з електронномікроскопічної оцінки через 3 години після ендартеректомії сонної артерії (n=17) та через 24 години після ендартеректомії сонної артерії (n=19). Групу гіперплазії інтими (n=25) присипляли через два тижні після ендартеректомії сонної артерії.

#### Приклад 12

Готування покритих Саратином гідрогелевих катетерів

Поверхні матеріалів на основі PA-12 активували шляхом занурення пристроїв у розчин 2 мольних % макроініціатора полі(октадецен-алт-малеїнонтової кислоти ангідрид) з перефіром (11-18 мольних %) , розчиненим у ізопропанолі, та 0,5моля етиленгліколю або диметакрилату (EGDMA)/1моль макроініціатора. Потім висушували покриття макроініціатор/EGDMA. Покриття відпалювали ще 5 разів по 10хв. при 120°C, що сприяло поліпшенню фіксації макроініціатора на поверхні і, таким чином, поліпшувало структурування.

Для оптимізації умов нанесення покриття, застосовували вирощування гідрогелевих покриттів на пластинках носія PA-12. Перед нанесенням покриття, пластинки промивали ізопропанолом або ацетоном та висушували.

Для покриття гідрогелем використовували балонний катетер типу Blue Medical Devices GO (катетер RX PTC A), що складається з Vestamid (PA-12). Водяні розчини 5 мольних % акрилової кислоти 100мл та 0,2 біс 0,8 мольних % метилен-біс-акрилової змішали та використовували для покриття пластинок або катетерів. Після полімеризації, пристрій з покриттям промивали водою та ще 24 години в буфері PBS.

Після цього полімер відпалювали в печі при 60-80°C від 0,5 до 3 годин.

Товщина висушених гідрогелевих покриттів знаходилася в інтервалі від 1 до 4мкм, розбухання гідрогелю у водяному розчині варіювалося від 10 до 50г гідрогелю вологого/1г гідрогелю сухого.

При зануренні (30хв.) у буферований буфером PBS pH7,4 розчин Саратину, використовували концентрації 50мкг мл<sup>-1</sup>.

Для готування розчинів для покриттів використовували органічні розчинники, а при напілюванні на балонний катетер використовували стандартне маломасштабне устаткування для нанесення покриттів, що поставляє EFD.

Фіг.1. Вплив Саратину на зв'язування очищеного людського vWF з людським колагеном типу I (кружки), колагеном типу III (квадратики), колагеном шкіри теляти (трикутники). Для колагену типу I IC<sub>50</sub>=0,23±0,004мкг мл<sup>-1</sup>, для колагену типу III - 0,81±0,04мкг мл<sup>-1</sup> та для колагену шкіри теляти - 0,44±0,008мкг мл<sup>-1</sup>.

Фіг.2. Вплив зрушення на інгібування Саратином формування агрегатів тромбоцитів на людському колагені типу III у проточній камері in vitro. Кружки означають швидкість зрушення 2700сек<sup>-1</sup> (IC<sub>50</sub>=0,96±0,25мкг мл<sup>-1</sup>), квадратики означають швидкість зрушення 1300сек<sup>-1</sup> (IC<sub>50</sub>=5,2±1,4мкг мл<sup>-1</sup>).

Фіг.3. Аналіз Скетчарда даних по зв'язуванню Саратину з іммобілізованим людським колагеном, отриманих методом резонансу поверхневих плазмонів, свідчить про наявність на колагені III єдналих Саратин сайтів з високою спорідненістю (K<sub>d</sub>=5×10<sup>-8</sup>М, суцільна лінія) та низькою спорідненістю (10=2×10<sup>-6</sup>М, пунктирна лінія).

Фіг.4. Число тромбоцитів, що прилипли до незахищеної поверхні субендотелію через 3 години після ендартеректомії сонної артерії, зіставлення даних по групі із застосуванням Саратину (n=7) та контрольній групі (n=10). Дані означають ±SE. Тварини Саратинової групи одержували по 5мкл розчину Саратину місцево, на незахищену поверхню субендотелію. Зірочка вказує, що значення Р складає 0,05.

Фіг.5. Число тромбоцитів, що прилипли до незахищеної поверхні субендотелію через 24 години після ендартеректомії сонної артерії, зіставлення даних по групі із застосуванням Саратину (n=9) та контрольній групі (n=10). Дані означають ±SE. Тромбоцити підраховували за допомогою скануючого електронного мікроскопа. Тварини Саратинової групи одержували по 5мкл розчину Саратину місцево, на незахищену поверхню субендотелію. Зірочка вказує, що значення Р складає 0,01.

Фіг.6. Електронна мікрофотографія (2000×) ендартеректомізованої сонної артерії паціюка через 3 години після ендартеректомії сонної артерії. А, контрольна поверхня. В, поверхня, до якої місцево застосовували Саратин (5мкл). На контрольній поверхні видні численні елементи клітин, включаючи волокна фібрину, червоні кров'яні клітини та тромбоцити. На обробленій Саратином поверхні видне значне зменшення кількості клітинних елементів.

Фіг.7. Електронна мікрофотографія (2000×) ендартеректомізованої сонної артерії паціюка через 3 години після ендартеректомії сонної артерії. А, контрольна поверхня. В, поверхня, до якої місцево застосовували Саратин (5мкл). На контрольній поверхні видні численні червоні кров'яні клітини та тромбоцити. На обробленій Саратином поверхні видне значне зменшення адгезії тромбоцитів.

Фіг.8. Відсоток порожнинного стенозу, вторинного стосовно гіперплазії інтими, через 2 тижні після ендартеректомії сонної артерії. Показані оброблена Саратином (n=15), та контрольна групи (n=10). Тварини Саратинової групи одержували по 5мкл розчину Саратину місцево, на незахищену поверхню субендотелію. Зірочка вказує, що значення Р складає 0,004.

Фіг.9. Поперечний переріз сонної артерії свідчить про зменшення гіперплазії інтими в оброблених Саратином артеріях (В) у порівнянні з неопераційними артеріями (А) контрольних паціюків, ІН=гіперплазія інтими.

Таблиця 1. Концентрації IC<sub>50</sub> Саратину, необхідні для інгібування адгезії тромбоцитів у PRP з різних видів, що утворюють зв'язки з людським колагеном типів I та III, а також колагеном шкіри теляти.

Таблиця 2. Вплив Саратину на максимальну агрегацію тромбоцитів (%) у PRP, індуквану різними агоністами, кінцева концентрація реагентів відповідає зазначеній.

Таблиця 3. Доопераційні та післяопераційні тривалості кровотечі та кількості тромбоцитів.

Таблиця 1

| Джерело плазми | IC <sub>50</sub> Саратину (мкг мл <sup>-1</sup> ) |                  |                       |
|----------------|---|------------------|-----------------------|
|                | Колаген типу I                                    | Колаген типу III | Колаген. Шкіри теляти |
| Людина         | 0,2   | 0,9              | 0,3                   |
| Свиня          | 0,2   | 0,5              | 0,5                   |
| Хом'як         | 0,4   | n.t.             | 7,0                   |
| Миша           | 0,1   | 0,6              | 0,3                   |

Таблиця 2

| Агоніст                               | Агрегація (%) при вказаних концентраціях Саратину (мкг мл <sup>-1</sup> ) |    |    |    |      |
|---------------------------------------|---|----|----|----|------|
|                                       | 0   | 10 | 20 | 40 | 200  |
| Колаген (0,5мкг мл <sup>-1</sup> )    | 62  | 67 | 63 | 64 | 0    |
| ADP (2,5мкМ)                          | 60  | 64 | 69 | 82 | 88   |
| Рістоцетин (0,9мкг мл <sup>-1</sup> ) | 61  | 67 | 75 | 63 | n.t. |
| Арахідонова кислота (1,0мМ)           | 66  | 66 | 67 | 57 | n.t. |
| U46619 (1,0мкМ)                       | ee  | 65 | 57 | 56 | n.t. |

Таблиця 3

| Час       | Умови    | Кількість тромбоцитів     | Довгочасність кровотечі |
|-----------|----------|---------------------------|-------------------------|
| До оп.    | Контроль | 752±36,05×10 <sup>3</sup> | 11,9±0,91хв.            |
| Після оп. | саратін  | 839±33,85×10 <sup>3</sup> | 8,6±0,62хв.             |
| 3 години  | контроль | 604±34,2×10 <sup>3</sup>  | 10,8±0,9хв.             |
| 3 години  | саратін  | 590±76×10 <sup>3</sup>    | 9,1±0,5хв.              |
| 24 години | контроль | 694±117×10 <sup>3</sup>   | 12,9±1,1хв.             |
| 24 години | саратін  | 729±19×10 <sup>3</sup>    | 11,5±1,3хв.             |

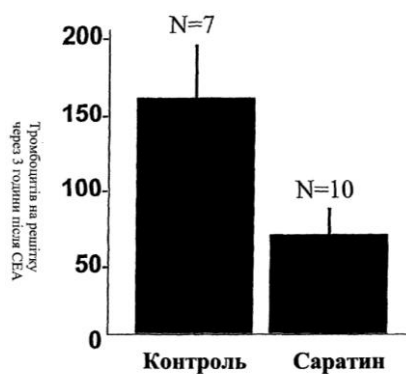
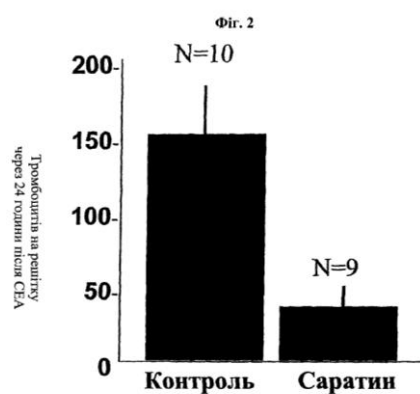
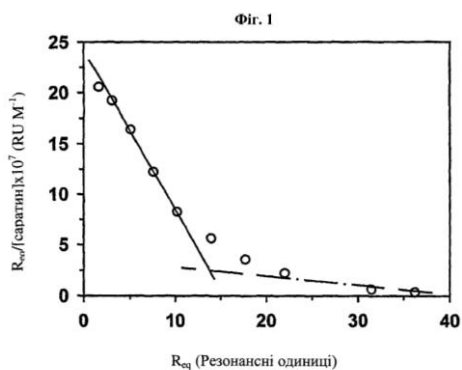
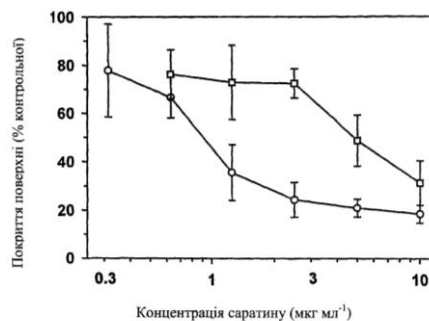
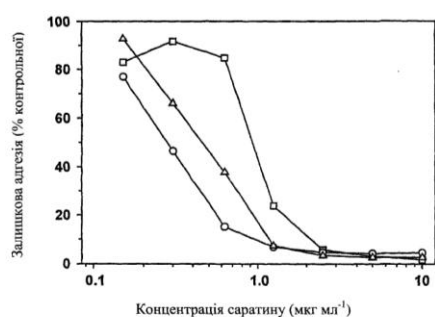


Fig. 4

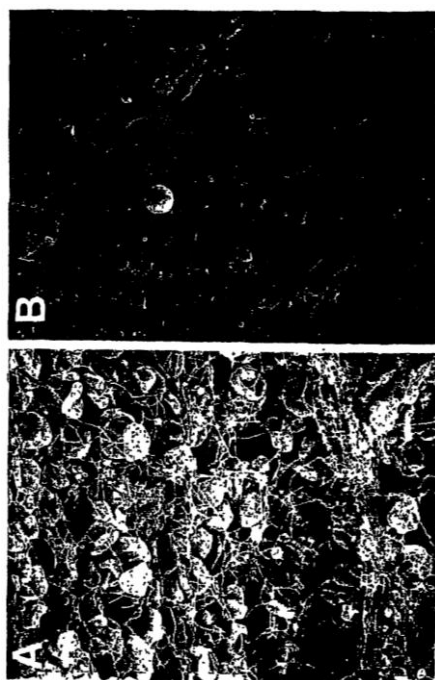


Fig. 6

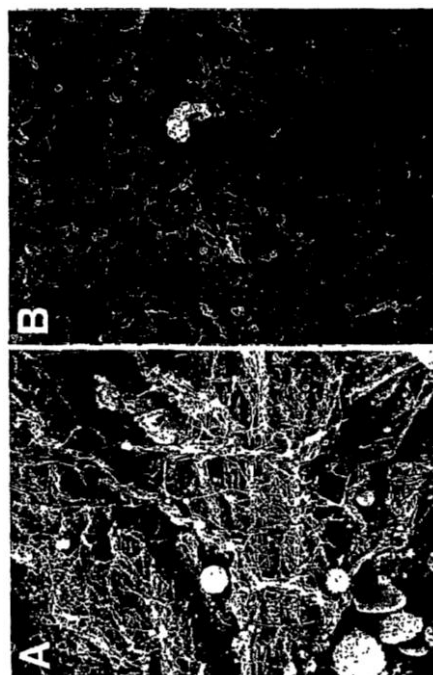


Fig. 7

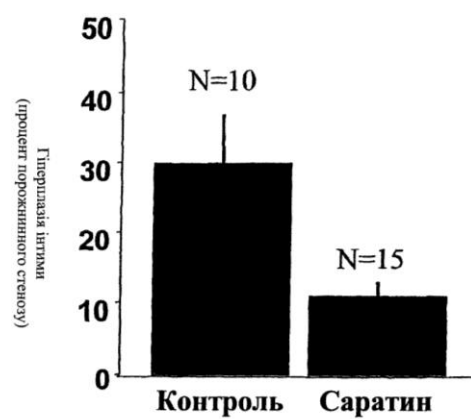


Fig. 8

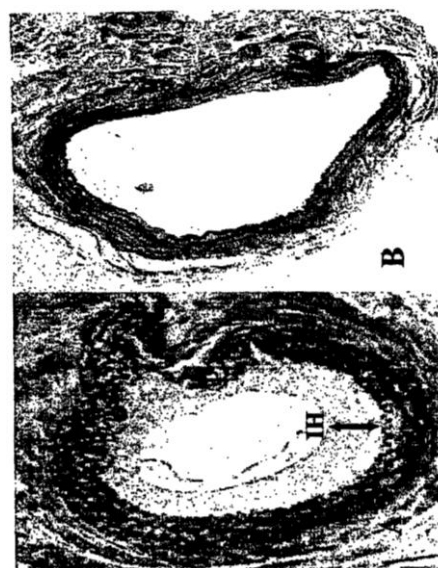


Fig. 9