



УКРАЇНА

(19) UA (11) 25201 (13) U
(51) МПК
A61P 7/02 (2007.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ТРОМБОЛІЗИСУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ФЛЕБОТРОМБОЗІ

1

2

(21) u200704041

(22) 12.04.2007

(24) 25.07.2007

(46) 25.07.2007, Бюл. № 11, 2007 р.

(72) Мішалов Володимир Григорович, Грабовий
Олександр Миколайович, Миргородський Денис
Сергійович(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб тромболізу при експериментальному флеботромбозі, що включає внутрішньовенне введення рекомбінантного активатора плазміногену альтеплазе, який **відрізняється** тим, що одночасно з введенням альтеплазе підвищують рівень фібринолітичної активності крові шляхом внутрішньовенного крапельного введення плазміногену в дозі 1 мг/кг маси тіла впродовж 2 годин.

Корисна модель, що заявляється, відноситься до області експериментальної медицини і може бути використана для дослідження тромболізу у магістральних судинах при експериментальному флеботромбозі.

В госпітальних клініках різного профілю питома вага тромбоемболії гілок легеневої артерії (ТЕГЛА) серед причин смерті становить до 20-40% [1-3]. Гостра ТЕГЛА - одна з найчастіших причин раптової смерті. Смертність при ТЕГЛА сягає 30%, та при застосуванні антикоагулянтів знижується до 1-15% [4-5]. В Україні ТЕГЛА ускладнює 0,1-0,3% всіх хірургічних операцій і спостерігається при аутопсії в 12% випадків, а у хворих похилого віку із серцево-судинними захворюваннями - більш ніж у 20%. В більшості випадків клінічне значення дрібних тромбів та емболів не є суттєвим. ТЕГЛА діагностують за життя приблизно в 25% випадків.

Смерть при ТЕГЛА виникає від перенавантаження правих відділів серця, шоку та синдрому недостатньої перфузії. В 1976 J. Alpert з'ясував, що дисфункція правого шлуночка (ПШ) діє на смертність більше, ніж об'єм емболії. З 144 пацієнтів з ангіографічно підтвердженою ТЕГЛА померло 20 (13,8%), з них у 12 (8%) ТЕГЛА була безпосередньою причиною смерті. У дев'яти з цих хворих (75%) були ознаки ПШ недостатності, але об'єм тромбоемболії був різним - від 25 до 75% загальної площі артеріального русла легень.

Для вивчення факторів ризику летального виходу при ТЕГЛА за 3-х місячний період було заплановано Міжнародний Реєстр Легеневої Емболії, в який увійшли дані про 2454 пацієнтів із 52 північ-

ноамериканських та європейських медичних центрів.

За даними виконаних у США досліджень, при комбінації тромболітичної терапії та низькомолекулярних гепаринів (НМГ), летальність при ТЕГЛА становить менше 10% [6, 10]. Доведено, що застосування у таких хворих НМГ має таку ж ефективність, як і внутрішньовенна інфузія нефракціонованого гепарину [7-8]. Останній затримує ріст тромбу, ініціює ендогенний фібриноліз, що приводить до розчинення згустку за дні або тижні [8]. Тромболітики - активатори плазміногену - перетворюють плазміноген в плазмін, який, в свою чергу, розчиняє фібрин, що знаходиться в згустку, приводячи до фібринолізу. Тромболізіс сприяє більш швидкому та повному фібринолізу, що покращує легеневий кровотік, серцеву діяльність, насичення крові киснем і, таким чином, знижує летальність [9].

Основні види тромболітиків - це альтеплазе (рекомбінантний активатор плазміногену), стрептокіназа та урокіназа. Порівнянню ефективності альтеплазе, стрептокінази, урокінази, а також різних методик їх застосування було присвячено 6 досліджень, в котрі увійшов 481 хворий. Відмічено, що через 2 години від початку тромболізу перфузія легень була достовірно вищою при застосуванні альтеплазе, порівняно з іншими препаратами, тоді як до кінця 24-годинного періоду перфузійні показники зрівнювались. Проведені порівняльні дослідження ефективності гепаринотерапії і тромболізу (із застосуванням НФГ чи без нього) показали переваги тромболізу у відношенні більш

(13) U

(11) 25201

(19) UA

швидкого покращення легеневої перфузії при лікуванні ТЕГЛА [13-15].

Відомі способи тромболізу [14-17] у якості тромболітичного агенту використовують стрептокіназу, яку отримують з культури бета-гемолітичного стрептококу групи С. Однак через виражену антигенність, високу частоту алергічних реакцій та неможливість повторного призначення препарату, в тому числі і при наявності в анамнезі (від 3 до 6 міс.) стрептокової інфекції, проводився активний пошук інших фібринолітиків [11].

Урокиназу, що є прямим активатором плазміногену, отримують з культури клітин нирок людини, завдяки чому вона не має антигенності. Урокиназа має високу фібринолітичну активність, активує плазміноген, перетворюючи його в плазмін, що викликає ферментативне руйнування фібрину [18].

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб [16, 17], який полягає у застосуванні внутрішньовенного введення альтеплазе - рекомбінантного активатора плазміногену, що є специфічним активатором фібринолітичної системи крові. Препарат має високоспецифічну фібринолітичну дію, ефективність якої перевищує таку стрептокінази та урокінази, на тлі відсутності антигенності. Висока фібриноспецифічність альтеплазе, теоретично, зменшує ризик геморагічних ускладнень. Ефективність застосування альтеплазе знаходиться у зворотній залежності від строків виникнення тромбу.

Задачею корисної моделі є проведення лізису тромбу при сформованому флеботромбозі магістральних вен у експериментальних тварин шляхом введення тромболітичних засобів (тканинний активатор плазміногену, плазміноген) та оцінка його ефективності з використанням різних методів дослідження, у тому числі гістологічних.

Технічний результат, що отримують в результаті вирішення задачі, полягає в більш ефективному лізисі сформованих тромбів у магістральних венах з можливістю різнобічної оцінки результату.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі тромболізу при експериментальному флеботромбозі, що включає внутрішньовенне введення рекомбінантного активатора плазміногену альтеплазе, згідно корисної моделі, одночасно з введенням альтеплазе підвищують рівень фібринолітичної активності крові шляхом внутрішньовенного крапельного введення плазміногену в дозі 1 мг/кг маси тіла впродовж 2 годин.

Відмінною особливістю запропонованого способу є одночасне застосування плазміногену в поєднанні з тканинним активатором плазміногену альтеплазе при проведенні тромболітичної терапії за умови експериментального флеботромбозу. Це забезпечує значне збільшення ефективності тромболізу у порівнянні із застосуванням окремо альтеплазе або гепарину. За відомими літературними даними такий спосіб тромболізу при експериментальному флеботромбозі невідомий.

Запропонований спосіб тромболізу при експериментальному флеботромбозі здійснюють наступним чином:

У експериментальних тварин моделюють флеботромбоз [12]. Через 1 або 2 доби після мо-

делювання флеботромбозу тваринам проводять внутрішньовенне крапельне, протягом 2 годин введення комбінації плазміногену та тканинного активатора плазміногену альтеплазе - кожний в дозі по 1 мг/кг маси тіла.

Результат: через 1 годину після інфузії вказаної тромболітичної суміші у тварин, яким попередньо, за 2 доби, було змодельовано флеботромбоз, відбувається зменшення площі тромбу на поперечному зрізі вени в 5 разів, а у тварин яким флеботромбоз було змодельовано 3 доби тому назад, відбувається зменшення площі тромбу на поперечному зрізі вени більш ніж у 2 рази.

Прикладом конкретного виконання способу, що пропонується, є дослідження тромболізу за умови змодельованого флеботромбозу у стегнових венах кролів.

У 24 кролів вагою 3,5 кг змодельовували флеботромбоз з двох сторін [12]. Тварини були поділені на чотири групи по 6 особин в кожній. Через 2 й 3 доби (по 3 кролі на кожний строк) від початку дослідження було проведено тромболізис наступним чином:

1 група - контрольна, тварини не зазнавали додаткових впливів;

2 група - тваринам провели внутрішньовенне крапельне, протягом 2 годин введення тканинного активатора плазміногену (альтеплазе - фірми Boehringer Ingelheim) в дозі 1 мг/кг маси тіла;

3 група - тваринам провели внутрішньовенне крапельне, протягом 2 годин введення комбінації плазміногену та тканинного активатора плазміногену альтеплазе - кожний в дозі 1 мг/кг маси. Плазміноген отримували методом афінної хроматографії на лізін-сефарозі (фірми Amersham Bioscience);

4 група - тварини отримали гепарин (ТОВ "Львівтехнофарм") в дозі 800 Од/кг підшкірно болюсом та далі внутрішньовенно крапельно протягом 6 годин під контролем часу згортання крові 9-12 хвилин в дозі 100 Од/кг.

Матеріал для дослідження, після евтаназії тварин передозуванням наркотичних засобів, забирався через 1 годину після закінчення інфузії тромболітиків. Фрагменти вен фіксували у формаліні та ущільнювали у парафіні. Гістологічні зрізи товщиною 7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, азурії-еозином, фосфорновольфрамним гематоксиліном за Маллорі, синім Еванса-пикриною кислотою та кислим фуксином за Новеллі. Гістологічні препарати вивчали візуально і морфометрично. Вимірювали площу тромбів на поперечних зрізах вен. Виміри проводили на 8 гістологічних зрізах, отриманих з кожного експериментального зразка. Морфометрію проводили за допомогою дослідницького комплексу з мікроскопом Olympus BX51, цифрової камери Olympus C4040 ZOOM, комп'ютера із програмним забезпеченням Olympus DP-Soft 3.2. Отримані цифрові дані оброблялися стандартними статистичними методами.

Проведені дослідження показали, що через 2 доби після введення нитки у вени у всіх випадках навколо нитки спостерігались масивні червоні тромби, які закривали більшу частину просвіту

вени, залишаючи по периферії тонку щілину від просвіту судини. Введення альтеплазе приводило до зменшення площі тромбу на поперечному зрізі вени у 3 рази, введення гепарину приводило до

зменшення площі тромбу більш ніж на 20%, інфузія альтеплазе разом з плазміногеном приводила до зменшення площі тромбу у 5 разів (Таблиця, креслення).

Таблиця

Площа тромбу через 2 й 3 доби після моделюванні флеботромбозу (контроль) та після проведення тромболізу за допомогою альтеплазе, комплексу альтеплазе плюс плазміноген та гепарину

	2 доби				3 доби			
	Контроль	Альтеплазе	Альтеплазе + плазміноген	Гепарин	Контроль	Альтеплазе	Альтеплазе ± плазміноген	Гепарин
Площа тромбу (мм ²)	0,065±0,0021	0,024±0,0065	0,013±0,0078	0,05±0,0016	0,057±0,002	0,037±0,0017	0,024±0,0005	0,049±0,002

Через 3 дні після початку дослід у всіх випадках навколо ниток виявляються масивні тромби, що закривають майже весь просвіт вени. У порівнянні з попереднім строком спостерігаються зміни якісного стану тромбів, а їх фрагменти з червоних переходять у білі. В них виявляється більш або менш щільна сітка волокон фібрину, серед яких зустрічаються дуже товсті. З боку інтими спостерігається продуктивна реакція, в ній збільшується кількість фібробластів. Іноді молода сполучна тканина починає проявляти тенденції до вrostання у тромб.

Через 3 дні після початку дослід у всіх випадках навколо ниток виявляються масивні тромби, що закривають майже весь просвіт вени. У порівнянні з попереднім строком спостерігаються зміни якісного стану тромбів, а їх фрагменти з червоних переходять у білі. В них виявляється більш або менш щільна сітка волокон фібрину, серед яких зустрічаються дуже товсті. З боку інтими спостерігається продуктивна реакція, в ній збільшується кількість фібробластів. Іноді молода сполучна тканина починає проявляти тенденції до вrostання у тромб.

Введення альтеплазе через 3 доби після моделювання флеботромбозу приводить до зменшення площі тромбу на поперечному зрізі на третину, введення гепарину призводить до зменшення тромбу понад 10%, інфузія альтеплазе разом з плазміногеном приводить до зменшення площі тромбу більш ніж у 2 рази (Таблиця, креслення).

Таким чином, проведені спостереження показали, що одночасне застосування альтеплазе та плазміногену забезпечує значне збільшення ефективності тромболізу у порівнянні із застосуванням окремо альтеплазе або гепарину.

Джерела інформації:

1. Oger E. Incidence of venous thromboembolism in a community-based study in western France // *Thromb Haemost.* - 2000. - v.83. - p.657-60.

2. Modam B, Sharon E, Jelin W. Factors contributing to the incorrect diagnosis of pulmonary embolism // *Chest.* - 1972. - v.62. - p.388-93.

3. Morpurgo M, Schmid C. Clinico-pathological correlations in pulmonary embolism. A prospective evaluation // *Prog Respir Res.* - 1980. - N.13. - p.8-15.

4. Dalen J.E. Pulmonary embolism - what have we learned since Virchow Natural history, pathophysiology and diagnosis // *Chest* - 2002. - N122. - p.1440-1456.

5. The Columbus Investigators. Low molecular weight heparin in the treatment of patients with venous thromboembolism // *N Engl J Med.* - 1997. - v.337. - p.657-62.

6. Simonneau G, Sors H, Charbonnier S for the THESEE study group. A comparison of low molecular weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism // *N Engl J Med.* - 1997. - v.337. - p.663-9.

7. Dalen J.E, Banas JS, Brook FOC, et al. Resolution rate of acute pulmonary embolism in mice // *N Engl J Med.* - 1969. - v.280. - p.1194-99.

8. Arcasoy S.M, Kreit JW. Thrombolytic therapy for pulmonary embolism-a comprehensive review of the current evidence // *Chest.* - 1999. - v.115. - p.1695-707.

9. Alpert J.S, Smith R, Carlson J, et al. Mortality in patients treated for pulmonary embolism // *JAMA.* - 1976. - v.236. - p.1477-80.

10. Perler B. Thrombolytic therapies: the current state of affairs // *J Endovasc Ther.* - 2005. - Vol.3, N12. - p.224-232.

11. Kasper W, Konstantinides S, Greibel A, et al. Prognostic significance of right ventricular afterload stress detected by echocardiography in patients with clinically suspected pulmonary embolism // *Heart.* - 1997. - v.77. - p.346-9.

12. Мішалов В.Г., Грабовий О.М., Миргородський Д.С., Тодуров Б.М. Спосіб моделювання флеботромбозу. №14749. МПК G09B23/28 (2006.01)

13. Bottiger BW, Bode C, Kem S. Efficacy and safety of thrombolytic therapy after initially unsuccessful cardiopulmonary resuscitation: a prospective clinical trial // *Lancet.* - 2001. - v.357. - p.1583-5.

14. Pineda LA, Hathwar VS, Grant BJ. Clinical suspicion of fatal pulmonary embolism // *Chest.* - 2001. - v.120. - p.791-5.

15. Konstantinides S, Geibel A, Heusel G, et al. Heparin plus alteplase compared with heparin alone in patients with sub massive pulmonary embolism // *NEJM.* - 2002. - v.347. - p.1143-50.

16. Meneveau N, Schiele F, Vuilleminot A, et al. Streptokinase versus alteplase in massive PE: a randomized trial assessing right heart haemodynamics

and pulmonary vascular obstruction // Eur Heart J. - 1997. -v.18. - p.1141-48.

17. Meneveau N, Schiele F, Metz D, et al. Comparative efficiency of a 2 hour regimen of Streptokinase versus alteplase in acute massive pulmonary embolism: immediate clinical and

haemodynamic outcomes and one year follow up // J Am Coll Cardiol. -1998.-v.31. - p.1057-63.

18. Goldhaber S, Heit S, Shama GVRK et al. Randomized controlled trial of recombinant tissue plasminogen activator versus urokinase in treatment of acute pulmonary embolism. Lancet 1988; 2:293-298.

