

## Обоснование применения иммобилизованных субтилизинов для таргетной терапии венозных тромбозов

Мишенина С.В., Байкалов Г.И., Байкалова Н.Е., Макаров В.К., Мадонов П.Г.

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

## A rationale for application of immobilized subtilisines for target therapy of venous thrombosis

Mishenina S.V., Baykalov G.I., Baikalova N.E., Makarov V.K., Madonov P.G.

Novosibirsk State Medical University

### АННОТАЦИЯ

Для определения эффективности и безопасности лекарственного препарата на основе иммобилизованного субтилизина (СУБТ) проведены экспериментальные (с использованием крыс-самцов линии Wistar и Balb/C) и клиническое (VETTER-1 — Venous Thrombosis Therapy) исследования. Экспериментальные исследования показали прямое тромболитическое действие СУБТ на 1-, 2- и 24-часовые тромбы (*in vitro*) и отсутствие локальных изменений у крыс с κ-карагинановым тромбозом (*in vivo*). В ходе клинического исследования у пациентов, получавших СУБТ, увеличение кровотока на 5 % от исходного либо реканализацию вены наблюдали в 1.5–1.6 раза чаще по сравнению с пациентами, получавшими плацебо.

Таким образом, лекарственный препарат на основе СУБТ может быть использован в терапии венозных тромбозов.

**Ключевые слова:** иммобилизованные субтилизины, венозные тромбозы, тромболитическая терапия.

### ABSTRACT

To determine the efficacy and safety of the drug based on immobilized subtilisin (SUBT), we conducted experimental (using Wistar and Balb/C male rats) and clinical (VETTER-1 — Venous Thrombosis Therapy) studies. Experimental studies have shown the direct thrombolytic effect of SUBT on 1-, 2- and 24-hour blood clots (*in vitro*) and the absence of local changes in rats with κ-carrageenan-induced thrombosis (*in vivo*). In a clinical study, patients receiving SUBT showed an increase in blood flow by 5% from the initial, or recanalization of a vein which was observed 1.5–1.6 times more often than in patients receiving placebo.

Thus, a drug based on SUBT can be used in the treatment of venous thrombosis.

**Keywords:** immobilized subtilisins, venous thrombosis, thrombolytic therapy.

### ВВЕДЕНИЕ

Тромбозы и антитромботическая терапия являются одним из актуальных и до конца не разрешенных вопросов в современной медицине. Патогенез развития тромбоза описан в классической триаде Вирхова: замедление тока крови, гиперкоагуляция и повреждение эндотелия, однако эта теория дает представление о тромбо-

### INTRODUCTION

Thrombosis and antithrombotic therapy are one of the urgent and unresolved issues in modern medicine. The classic Virchow's triad describes the pathogenesis of thrombosis as slowed blood flow, hypercoagulation and endothelial damage. However, to a greater extent this theory gives an idea of blood clot formation *in vitro*. Cell-based model

Поступила 17.12.2019  
Принята 17.01.2019

\*Автор, ответственный за переписку  
Мишенина Светлана Владимировна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.  
E-mail: m-svetlana@ngs.ru

Received 17.12.2019  
Accepted 17.01.2019

\*Corresponding author  
Mishenina Svetlana Vladimirovna: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.  
E-mail: m-svetlana@ngs.ru

образовании в большей степени *in vitro*. Клеточная теория гемостаза [1] дополняет теорию Вирхова и дает развернутое представление о взаимодействии всех звеньев гемостаза, а значит, характеризует гемостаз и *in vivo* [2, 3].

Антикоагулянтная терапия и фармакологический тромболитический являются основой для успешного лечения тромботических нозологий. Эти две фармакологические технологии должны основываться на соблюдении баланса между эффективным и быстрым разрешением тромбоза и риском кровотечений. Применение системных активаторов плазминогена (САП) неизбежно приводит к нескольким биохимическим процессам, которые являются негативными и формируют ограничения для применения метода тромболитического. САП вызывают истощение плазминогена плазмы, гидролитическое расщепление плазмином белковых факторов свертывания крови, а также тормозят фибринолиз продуктами деградации фибрина за счет конкурентного ингибирования плазмина по принципу отрицательной обратной связи [4, 5]. В силу многообразия клинических ситуаций бывает трудно стратифицировать риск как тромбоэмболических осложнений, так и кровотечений. Более того, некоторые факторы риска тромбоэмболических осложнений одновременно увеличивают риск кровотечений [6]. Вариабельность эффекта тромболитиков и антикоагулянтов обусловлена состоянием организма, сопутствующими заболеваниями, диетическими пристрастиями, принимаемыми препаратами и в очень большой степени генетическими особенностями больного [7–10]. Вопрос создания и внедрения в практику препарата для лечения тромбоза, который сохранял бы все преимущества традиционных тромболитиков и обладал бы большей предсказуемостью и безопасностью, стоит остро и перед разработчиками лекарственных средств, и перед практическими врачами.

В настоящее время сложились реальные предпосылки к решению этой проблемы. Возможность неплазминового фибринолиза открывает энзимотерапия, которая становится все более распространенной в медицине: многие ферменты оказывают фибринолитическое действие и могут быть перспективными для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, инсультов, тромбоза, эмболии и т. д.

Обнаружение мощного фибринолитического фермента наттокиназы (nattokinase) выявило новые возможности более безопасного лечения тромбоза. Этот фермент используется в традиционном японском ферментированном продукте

of hemostasis [1] complements Virchow's theory and gives a detailed picture of the interaction of all components of hemostasis, and thus characterizes hemostasis *in vivo* as well [2, 3].

Anticoagulant therapy and pharmacologic thrombolysis are the basis for the successful treatment of thrombotic diseases. These two pharmacologic technologies should be based on a balance between the effective and rapid resolution of thrombosis and the risk of bleeding. Use of systemic plasminogen activators (SPAs) inevitably results in several negative biochemical processes that restrict thrombolysis application. SPAs cause depletion of plasma plasminogen, hydrolytic cleavage of plasma protein coagulation factors by plasmin, and also inhibit fibrinolysis by fibrin degradation products due to competitive inhibition of plasmin by the principle of negative feedback [4, 5]. Due to the variety of clinical situations, it is difficult to stratify the risk of both thromboembolic complications and bleeding. Moreover, some risk factors for thromboembolic complications simultaneously increase the risk of bleeding [6]. The variability of the thrombolytics and anticoagulants effect is due to the state of the body, comorbidities, eating habits, drugs taken and, to a considerable extent, the patient's genetic characteristics [7–10]. The issue of creating and putting into practice a drug for the treatment of thrombosis, which would preserve all the advantages of traditional thrombolytics and have greater predictability and safety, is an acute issue for drug developers and practitioners.

Currently, there are real prerequisites for solving this problem. The enzyme therapy, which is becoming increasingly common in medicine, creates the possibility of non-plasmin fibrinolysis: many enzymes have a fibrinolytic effect and can be promising for the treatment of cardiovascular diseases, strokes, thrombosis and embolism.

The discovery of the potent fibrinolytic enzyme (nattokinase) has revealed new possibilities for safer treatment of thrombosis. This enzyme contained in the traditional Japanese fermented product Natto has been known to the Japanese for a hundred years as a nutritious and healing food. Indeed, food, especially fermented, is considered one of the many sources of fibrinolytic enzymes. This discovery motivated an active search for such microorganisms in traditional (Asian) fermented foods. Studies of microorganisms producing fibrinolytic enzymes from various Asian traditional fermented foods have also shown that these

Natto, известном японцам на протяжении столетий как питательная и целебная пища. Действительно, пища, особенно ферментированная, считается одним из многочисленных источников фибринолитических ферментов. Это открытие мотивировало активный поиск подобных микроорганизмов в традиционной (азиатской) ферментированной еде. Исследования микроорганизмов, продуцирующих фибринолитические ферменты из различных азиатских традиционных ферментированных пищевых продуктов, также показали, что эти микроорганизмы в основном принадлежали к виду *Bacillus subtilis* [11].

В российской и международной научной литературе можно найти достаточно публикаций о возможной терапевтической значимости применения субтилизинов и подобных им ферментов для лечения инсультов, инфарктов, тромбозов [12–14]. Признание всей мировой медицинской общественностью уникальных терапевтических свойств субтилизинов сейчас можно рассматривать как свершившийся факт.

Главная проблема создания препарата на основе субтилизинов заключалась в том, чтобы сохранялась ферментативная активность и устранялось аллергическое и иммунотоксическое действие. Метод иммобилизации фармакологически активных веществ на инертных носителях, низкомолекулярных полимерах, с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза позволяет значительно снизить опасность осложнений и повысить биодоступность и эффективность препаратов [15].

У иммобилизованных на полимерных носителях препаратов, например конъюгированных с полиэтиленоксидом молекул, изменяются фармакокинетические параметры, что может также улучшать вторичные фармакодинамические свойства. Химическая иммобилизация белковых веществ в ряде случаев с успехом может быть заменена технологией электронно-лучевой иммобилизации, значительно снижающей себестоимость лекарственных препаратов [16].

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести экспериментальное (*in vitro* и *in vivo*), а также клиническое исследование для определения эффективности и безопасности препарата на основе иммобилизованного субтилизина для лечения острых венозных тромбозов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения прямого тромболитического действия иммобилизованного субтилизи-

microorganisms mainly belong to species of *B. subtilis* [11].

There are enough research publications both in Russia, and worldwide on the possible therapeutic significance of subtilisins and similar enzymes for the treatment of strokes, infarctions, and thrombosis [12–14]. The worldwide medical community recognition of the unique therapeutic properties of subtilisins is a reality.

How to retain the enzymatic activity of the drug based on the subtilisin and eliminate its allergenic and immunotoxic effects is the main problem of drug development. Immobilization of pharmacologically active substances using inactive carriers, low molecular weight polymers by using nanotechnology of electron-beam synthesis can reduce the risk of complications significantly and increase the bioavailability and efficacy of the drug [15].

In drugs immobilized on polymer-carriers, for example, molecules conjugated with polyethylene oxide, the pharmacokinetic parameters change and this may improve the secondary pharmacodynamics. In some cases, chemical immobilization of protein substances can be successfully replaced by electron-beam immobilization, which significantly reduces the cost of drugs [16].

## AIM OF THE RESEARCH

To conduct experimental (*in vitro* and *in vivo*) and clinical studies to determine the efficacy and safety of immobilized subtilisin drug for the treatment of acute venous thromboses.

## MATERIALS AND METHODS

To study the direct thrombolytic effect of immobilized subtilisin (SUBT) *in vitro*, we used 20 Wistar male rats aged 5 months (10 animals both in the experimental and in the control groups). All animals were kept under natural light on a standard diet with free access to food and water. The research was carried out following the rules adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals (Strasbourg, 1986) and the Guidelines for the Preclinical Studies of Medicines, ed. by A.N. Mironov (Moscow, 2012). The same amount of blood was taken from experimental animals under ether anesthesia from the tail vein into Eppendorf tubes, in which blood clots were formed further for 1, 2, and 24 hours. The resulting thrombi weighting  $0.4 \pm 0.02$  g were put into a glass container included in a closed system. In order to study the thrombolytic activity of SUBT, we developed a test facility,

на (СУБТ) *in vitro* использовали 20 крыс-самцов линии Wistar в возрасте 5 мес (по 10 животных в экспериментальной и контрольной группах). Все животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе при свободном доступе к корму и воде. Исследование было выполнено в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н. Мирнова (М., 2012). У животных опытной группы под эфирным наркозом из хвостовой вены забирали одинаковое количество крови в пробирки Эппендорфа, в которых происходило дальнейшее формирование тромбов в течение 1, 2 и 24 ч. Образовавшиеся тромбы массой  $0.4 \pm 0.02$  г переносили в стеклянную емкость, входящую в замкнутую систему. Для исследования тромболитической активности СУБТ была создана экспериментальная установка, представляющая собой замкнутую систему силиконовых трубок со стеклянной емкостью (в нее помещали тромб), подключенную к перфузионному насосу (перфузомат) Gilson Minipuls 2. В ходе эксперимента перфузомат со скоростью 24 мл/мин прокачивал СУБТ, растворенный в 100 мл 0.9% раствора хлорида натрия с концентрацией 2.4 ЕД/мл через стеклянную емкость с тромбом. Создаваемый давлением перфузомата поток жидкости не приводил к механическому разрушению тромба, происходило его омывание со всех сторон. Раствор СУБТ в 0.9% растворе хлорида натрия подогревался до 37 °С, что моделировало температурное состояние крови в условиях физиологического кровообращения. В ходе исследования в период 0–135 мин определяли массу тромба каждые 15 мин. В контрольной группе животных проводился аналогичный эксперимент, только без растворения СУБТ в 0.9% р-ре хлорида натрия.

Статистическая обработка результатов включала подсчет среднеарифметических значений ( $M$ ) и их ошибки ( $m$ ). Для выявления достоверности полученных значений применяли тест множественных сравнений Дункана (Duncan's test, ANOVA). В работе использовали пакет компьютерных программ STATISTICA (версия 6.0).

*Экспериментальное исследование тромболитического действия СУБТ in vivo* проведено с использованием модели тромбоза, индуцированного κ-карагином. После инъекции κ-карагинана изменяются коагуляционные параметры крови — снижается протромбиновое и активированное частичное тромбопластиновое

which was a closed system of silicone tubes with a glass container (a thrombus was placed in it) connected to a Gilson Minipuls 2 perfusion pump. In the course of the experiment, at the rate of 24 ml/min, the perfusion pump ran the SUBT dissolved in 100 ml of a 0.9% solution of sodium chloride with a concentration of 2.4 U/ml through a glass container with a thrombus. The fluid flow created by the pump pressure did not lead to mechanical destruction of the thrombus but washed it on all sides. SUBT in a 0.9% sodium chloride solution was heated to 37°C — the simulated blood temperature state under normal physiological conditions of blood circulation. During the study period of 0–135 min we determined the thrombus weight every 15 min. In the control group of animals a similar experiment was carried out, only without dissolving the SUBT in 0.9% sodium chloride solution.

Statistical processing of the results included the calculation of mean values ( $M$ ) and their error ( $m$ ). Duncan's test of multiple comparisons (ANOVA) was used to determine the significance of the obtained values. We used the STATISTICA software package (version 6.0).

*Experimental study of SUBT thrombolytic action in vivo* was carried out using a model of thrombosis induced by κ-carrageenan. After the injection of κ-carrageenan, the coagulation parameters of blood change — prothrombin and activated partial thromboplastin time (APTT) decreases, and the amount of fibrinogen and prothrombin activity increases. All these changes contribute to the formation of a thrombus in the tail veins and arteries [17].

We used 30 male BALB/c mice with a body-weight of 19–21 g. All animals were kept under natural light on a standard diet with free access to food and water. The study was performed in accordance with the rules adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals (Strasbourg, 1986) and the Guidelines for the Pre-clinical Studies of Medicines, ed. by A.N. Mironov (Moscow, 2012). The mice were randomly assigned to groups; using body weight as a criterion, but provided that the individual value of the mass does not deviate from the average by more than ±10%. The data (weight and number) of the selected animals were ranked in descending order of weight, with the help of Excel program using an algorithm SORT.

Experiment design: the experimental group included 15 animals with κ-carrageenan-induced thrombosis model (they were intraperitoneally injected with 200 µl of SUBT at a rate of 390 U/kg),

время (АЧТВ), при этом возрастает количество фибриногена и протромбиновая активность. Все эти изменения способствуют формированию тромба в хвостовых венах и артериях [17].

В работе использовали 30 мышей-самцов линии Balb/C с массой тела 19–21 г. Все животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе при свободном доступе к корму и воде. Исследование было выполнено в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н. Миронова (М., 2012). Мыши распределены по группам рандомизированно, в качестве критерия была использована масса тела, но при условии, что индивидуальное значение массы не отклоняется от среднего более чем на  $\pm 10\%$ . Данные (масса и номер) отобранных животных ранжированы в порядке убывания массы, с помощью программы Excel с использованием алгоритма SORT.

Дизайн эксперимента: опытная группа — 15 животных с моделью к-каррагинанового тромбоза, которым внутрибрюшинно вводили 200 мкл СУБТ из расчета 390 ЕД/кг, контрольная группа — 15 животных с моделью к-каррагинанового тромбоза, которым внутрибрюшинно вводили 200 мкл физиологического раствора.

*Клиническое исследование эффективности и безопасности применения СУБТ у больных с острым венозным тромбозом.* Основываясь на экспериментальных данных по тромболитическому эффекту, отсутствию токсических и геморрагических осложнений, для определения эффективности СУБТ мы провели клиническое исследование, названное VETTER-1 (Venous Thrombosis Therapy). Дизайн исследования: многоцентровое, рандомизированное, плацебо-контролируемое, двойное слепое исследование лекарственного препарата на основе СУБТ. Оно проходило в двух клинических центрах — Городской клинической больнице № 1 им. Н.И. Пирогова (Москва) и в клинике Южно-Уральского государственного медицинского университета (Челябинск). В исследовании участвовали пациенты (мужчины и женщины) в возрасте 20–75 лет с острым венозным тромбозом (визуализированный тромб венозных сосудов по результатам ультразвукового исследования, поражение от 1 до 4 вен), проходившие курс лечения в указанных выше клинических центрах.

В соответствии с первой версией Протокола исследования (Протокол 1) применялся СУБТ в

the control group — 15 animals with к-carrageenan-induced thrombosis model (they were intraperitoneally injected with 200  $\mu$ l of normal saline).

*A clinical study of the efficacy and safety of the SUBT use in patients with acute venous thrombosis.* Based on the experimental data on the thrombolytic effect, absence of toxic and hemorrhagic complications, we conducted the clinical trial called VETTER-1 (Venous Thrombosis Therapy) in order to determine the SUBT efficacy. Study design: a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind study of a drug based on SUBT. It took place in two clinical centres — N.I. Pirogov City Clinical Hospital No. 1 (Moscow) and in the Clinic of South Ural State Medical University (Chelyabinsk). The study involved patients (men and women) aged 20–75 years with acute venous thrombosis (venous blood thrombus visualized by ultrasound, lesions of 1 to 4 veins), who underwent treatment in above mentioned clinical centers.

Following the first version of the Research Protocol (Protocol 1) the SUBT was used in the form of flat-round tablets with a bevel and breaking line, light yellow in color with possible marbling, with smooth surface, 12 mm in diameter. According to the second version of the Research Protocol (Protocol 2), we used hard gelatin capsules with white bodies and dark pink caps, the contents of the capsules were powder from white with a tan to light brown colour.

**Drug formulation:** the 0.6 g tablet contains SUBT — a highly purified enzyme preparation, obtained as a result of proteinase-subtilisin immobilization with polyethylene oxide — 200 IU (0.210 g); adjuvants — potato starch (0.348 g), microcrystalline cellulose (0.090 g), sodium chloride (0.009 g). One capsule contained 800 IU of the active substance.

In Protocol 1, patients were divided as follows: the experimental group consisted of 25 individuals, the control group — of 24 individuals. The experimental group received SUBT in tablets, 1600 IU a day (4 tablets, twice a day) for 15 days along with the conventional therapy for thrombosis and chronic venous insufficiency. The control group received a placebo (4 tablets, twice a day) for 15 days in addition to the conventional treatment for thrombosis and chronic venous insufficiency.

In Protocol 2, patients were divided into three groups: the control group (35 people) — patients with standard therapy of thrombosis, receiving placebo — 3 capsules, twice a day for 10 days; the

виде плоскоцилиндрических таблеток с фаской и одной риской, светло-желтого цвета, с возможной мраморностью, с гладкой поверхностью, диаметром 12 мм. Согласно второй версии Протокола исследования (Протокол 2) использовались твердые желатиновые капсулы с корпусом белого цвета и крышечкой темно-розового цвета, содержимое капсул — порошок от белого с желтовато-коричневым оттенком до светло-коричневого цвета.

Состав препарата: таблетка 0.6 г содержит СУБТ — высокоочищенный ферментный препарат, получаемый в результате иммобилизации на полиэтиленоксиде протеиназ-субтилизин — 200 ЕД (0.210 г); вспомогательные вещества: крахмал картофельный (0.348 г), целлюлоза микрокристаллическая МКЦ-П (0.090 г), натрий хлорид (0.009 г). Одна капсула содержала 800 ЕД активного вещества.

В Протоколе 1 пациенты распределились следующим образом: опытная группа — 25 чел., группа контроля — 24 чел. Опытная группа получала СУБТ в таблетках в дозе 1600 ЕД в сутки (по 4 табл. 2 раза в день) в течение 15 дней на фоне общепринятой терапии тромбоза и хронической венозной недостаточности. Группа контроля получала плацебо (4 табл. 2 раза в день) в течение 15 дней на фоне общепринятого лечения тромбозов и хронической венозной недостаточности.

В Протоколе 2 пациенты были разделены на три группы: 1) группа контроля (35 чел.) — пациенты на фоне стандартной терапии тромбоза, получавшие препарат плацебо — по 3 капс. 2 раза в день на протяжении 10 дней; 2) группа «СУБТ 3200 ЕД/сут» (32 чел.) — пациенты на фоне стандартной терапии тромбоза получали СУБТ в суточной дозе 3200 ЕД — по 3 капс. (2 капсулы СУБТ 800 ЕД + 1 капс. плацебо) 2 раза в день на протяжении 10 дней; 3) группа «СУБТ 4800 ЕД/сут» (34 чел.) — пациенты на фоне стандартной терапии тромбоза получали препарат в суточной дозе 4800 ЕД — по 3 капс. (все капсулы содержали СУБТ 800 ЕД) 2 раза в день на протяжении 10 дней.

Терапия пациентам обоих протоколов проводилась до достижения первичной точки исследования — увеличение кровотока более 5 % от исходного.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Экспериментальное исследование прямого тромболитического действия СУБТ in vitro.* После начала инкубации свежего, 1-часового тромба первые 15 мин скорость снижения его массы

SUBT 3200 IU/day — 32 patients treated with standard thrombosis therapy received a daily dose of 3200 IU — 3 capsules (2 capsules SUBT 800 IU + 1 capsule of placebo) twice a day for 10 days; the SUBT 4800 IU/day group — 34 patients receiving standard therapy for thrombosis in a daily dose of 4800 IU — 3 capsules (all capsules contained SUBT 800 IU) twice a day for 10 days.

Therapy for patients of both protocols was carried out until they reached the primary point of the research — an increase in blood flow by more than 5% of the initial.

## RESULTS AND DISCUSSION

*An experimental study of the direct thrombolytic effect of SUBT in vitro.* After the start of incubation of a fresh, 1-hour-old thrombus, during the first 15 min the rate of its mass decrease was practically the same both when perfused with saline solution and with a solution of SUBT (Fig. 1). Since this thrombus is a rather mild substance, at the beginning there is a loss of 25% of its mass due to blood cells washing off; therefore, the difference in the mass loss of the thrombus with the drug and saline solution is not so obvious.

After the 15<sup>th</sup> min of the experiment, the difference in the efficacy of two solutions became clearly visible: the mass of the thrombus perfused with SUBT solution began to fall actively. By the 45<sup>th</sup> min the blood clot's mass decreased by half, by the 75<sup>th</sup> min — by 4 times, by the 90<sup>th</sup> min — by 8 times, that is to the quantification limit. These changes occur due to layer-by-layer washing of blood cells from the thrombus surface, then a cord-like fibrin structure appears and the thrombus is lysed due to the destruction of its frame by proteolytic enzymes. It is worth noting that during the circulation of a thrombus in a solution of SUBT the destruction occurs on its surface exclusively, without formation of large fragments. This is important from a clinical point of view since in the body large fragments of a thrombus can lead to additional embolism of blood vessels.

A distinctive feature of subtilisin is its non-specific hydrolysis of denaturated or polymerized proteins that have lost their native structure. Therefore, subtilisin does not hydrolyze fibrinogen, but actively dissolves polymerized fibrin, both on the surface and inside the thrombus.

When incubated with saline solution, the decrease in thrombus mass gradually stops by 75<sup>th</sup>

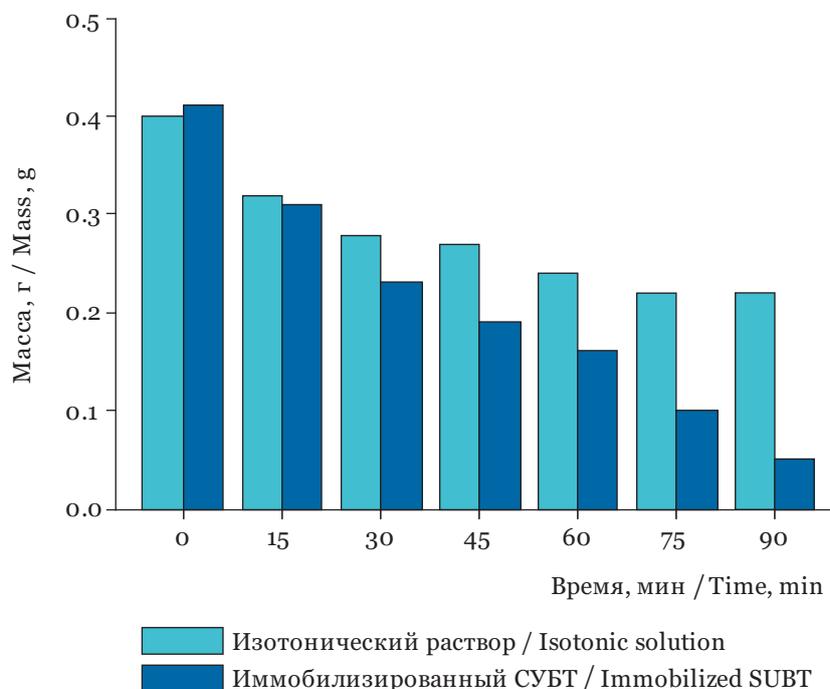
была практически одинаковой как при перфузии физиологическим раствором, так и раствора с СУБТ (рис. 1). Поскольку данный тромб представляет собой довольно мягкую субстанцию, то вначале идет потеря 25 % массы тромба за счет смывания клеток крови, поэтому разница по потере массы тромба с препаратом и контрольным раствором не столь очевидна. После 15-й минуты в эксперименте отчетливо видна разница по эффективности двух растворов: масса тромба в условиях перфузии раствора с СУБТ начинает активно снижаться, к 45-й минуте уменьшается в 2 раза, к 75-й — в 4 раза, к 90-й минуте — в 8 раз до предела определения минимальной массы. Данные изменения происходят за счет послойного отмывания с поверхности тромба клеток крови, проявляется тяжистая, фибриновая структура, тромб лизируется, за счет разрушения его каркаса протеолитическими ферментами. Стоит отметить, что в процессе циркуляции тромба в растворе с СУБТ происходит исключительно поверхностное его разрушение, без образования крупных фрагментов. Это очень важно с клинической точки зрения, так как в организме крупные фрагменты тромба могут приводить к дополнительной эмболии сосудов.

Отличительной чертой субтилизина является его неспецифичный гидролиз денатурированных или полимеризованных белков, утра-

min of the experiment. The ability of an isotonic solution to reduce mass by 50% in this experiment is explained by the friability of a thrombus solely.

A similar experiment was conducted to determine the effect of the thrombus formation time on the rate of its lysis by SUBT proteases (Fig. 2). It showed that the rate of mass loss of a 2-hour thrombus during its incubation with SUBT almost coincides with the lysis diagram of a fresh thrombus; while the thrombus mass perfused with saline solution over the entire experiment decreased by only 17%. This fact can be explained by the retraction of a 2-hour blood clot, a significant decrease in the proportion of cell-protein detritus in it, and, accordingly, the washable fibrin-free component. In the experimental group, the dynamics of thrombolysis did not significantly differ from the dynamics of a 1-hour thrombus: by 45<sup>th</sup> min, the thrombus size decreased by 55%, by 75<sup>th</sup> min — by 72%, by 90<sup>th</sup> min — by 85% (almost to the quantification limit).

It was interesting to evaluate the results of a similar experiment with a 24-hour thrombus which, under the influence of proteases, also began to dissolve rapidly. The circulating solution of SUBT was stained red by blood cells washed out of the thrombus. The thrombus rapidly decreased in size. After 135 min of being in the circulating solution of SUBT, the 24-hour thrombus mass



**Рис. 1.** Динамика изменения массы одночасового тромба  
**Fig. 1.** The dynamics of the 1-hour thrombus mass

тивших свою нативную структуру. Поэтому субтилизин не гидролизует фибриноген, но активно растворяет полимеризованный фибрин, как на поверхности, так и внутри тромба.

При инкубации с физиологическим раствором снижение массы тромба постепенно прекращается к 75-й минуте эксперимента. Способность изотонического раствора снижать массу на 50 % в данном эксперименте объясняется исключительно рыхлостью свежего тромба.

Для определения влияния времени образования тромба на скорость его лизиса протеазами СУБТ (рис. 2) был проведен аналогичный эксперимент. Он показал, что скорость потери массы 2-часового тромба при инкубации с СУБТ практически совпадает с графиком лизиса свежего тромба, при этом масса тромба при перфузии физиологического раствора за все время эксперимента снизилась лишь на 17 %. Это возможно объяснить произошедшей ретракцией двухчасового тромба, существенным уменьшением доли клеточно-белкового детрита в нем и, соответственно, вымываемой безфибриновой составляющей. В опытной группе динамика тромболитизиса существенно не отличалась от динамики одночасового тромба: величина тромба к 45-й минуте уменьшилась на 55 %, к 75-й минуте — на 72%, к 90-й минуте — на 85% (почти до предела детекции минимальной массы).

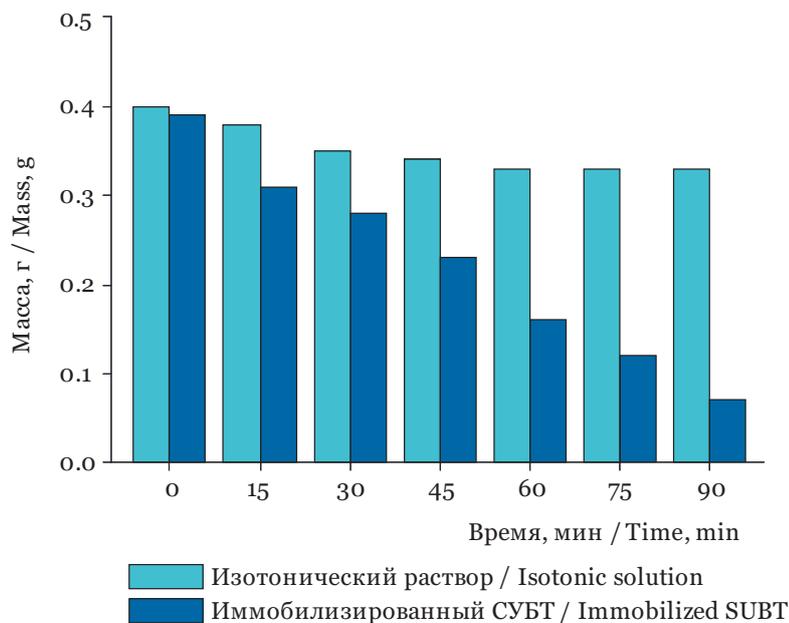
Интересно было оценить результаты аналогичного эксперимента с суточным тромбом, ко-

decreased by 8 times to the quantification limit ( $0.06 \pm 0.01$  g) (Fig. 3). During its lysis, large fragments also did not form. The only difference from more fresh thrombi was the prolonged dissolution time. Consequently, the SUBT dissolved both 1-, 2- and 24-hour thrombi efficiently.

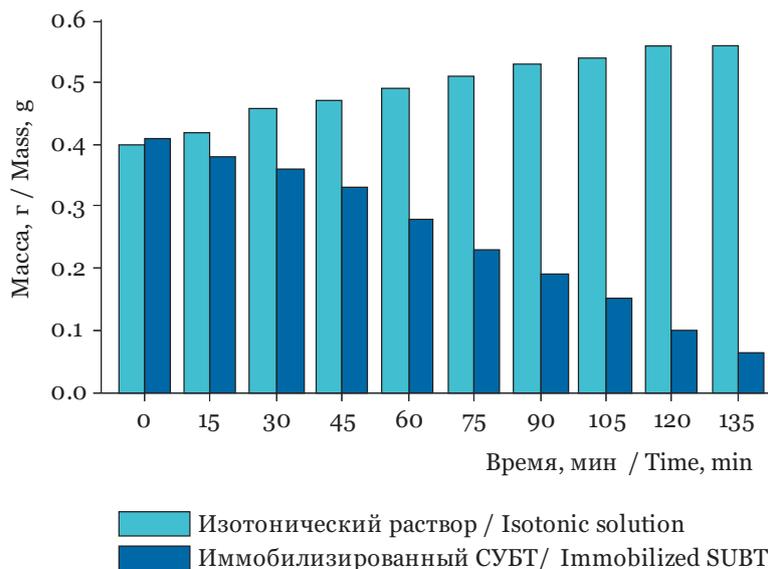
In the control study, when 24-hour thrombus was perfused with a saline solution, we did not observe its spontaneous dissolution throughout the experiment, on the contrary its mass merely increased. By the end of the experiment, its mass increased by 40%. After retraction, the thrombus was placed for 24 hours in storage, during which further induration of the fibrous clot occurred. When immersed into saline solution the thrombus increased in volume and mass.

Thus, as a result of the experiment we established that SUBT lyses layer-by-layer 1-, 2- and 24-hour thrombi efficiently without formation of large aggregates.

*An experimental study of the thrombolytic effect of SUBT in vivo.* It is known that thrombosis induced by  $\kappa$ -carrageenan develops within 24 hours, that is why the length of the thrombosis area was measured 24 hours after the injection. In the control group, the length of the area with induced thrombosis was  $6.9 \pm 0.2$  cm, i.e., the entire area on which the temporary ligature was applied (Fig. 4, B). At the same time, the area above the compression site, not subjected to thrombosis, was visible.



**Рис. 2.** Динамика изменения массы двухчасового тромба  
**Fig. 2.** The dynamics of the 2-hour thrombus mass



**Рис. 3.** Изменение массы суточного тромба  
**Fig. 3.** Change of the 24-hour thrombus mass

торый под влиянием протеаз также начал быстро поверхностно растворяться. Циркулирующий раствор СУБТ окрашивался вымываемыми из тромба эритроцитами. Тромб стремительно уменьшался в размерах. Через 135 мин нахождения в циркулирующем растворе СУБТ масса суточного тромба уменьшилась в 8 раз до нижней точки детекции ( $0.06 \pm 0.01$  г) (рис. 3). При его лизисе также не образовывалось крупных фрагментов. Единственное отличие его от более свежих тромбов — более продолжительное время растворения. Следовательно, СУБТ эффективно растворял как 1- и 2-часовые, так и суточные тромбы.

В контрольном исследовании при перфузии суточного тромба с физиологическим раствором самопроизвольного растворения тромба не наблюдалось, на протяжении всего эксперимента его масса, наоборот, только возрастала. К концу эксперимента его масса увеличилась на 40 %. После ретракции тромб помещался на 24 ч на хранение, в процессе которого происходило дальнейшее уплотнение фиброзного сгустка. При попадании в физиологический раствор тромб увеличивался в объеме и массе.

Таким образом, в результате эксперимента установлено, что СУБТ эффективно послойно лизирует 1-, 2- и 24-часовые тромбы без образования крупных агрегатов.

*Экспериментальное исследование тромболитического действия СУБТ in vivo.* Известно, что тромбоз, индуцированный введением κ-каррагинана, развивается в течение суток, поэтому длину участка с тромбозом измеряли через

Nevertheless, one day after an external difference was evident: the animals of the control group lost weight, on average,  $2.5 \pm 0.7$  g. Also in mice without SUBT treatment, cyanosis of the skin was noted. Microthrombi may have formed in blood vessels due to changes in the coagulation parameters in the control group mice [9]. In the group receiving SUBT, the mass of animals and the skin remained unchanged. In the group with SUBT treatment, 24 hours after the injection, thrombosis in the tail veins did not develop. At the site of injections, the κ-carrageenan caused only an inflammatory reaction, marked by redness of the skin of the tail (Fig. 4, C).

After 48 hours, in the off-treatment group, the thrombosis led to necrotization of tail tissues (Fig. 4, D). In the group with SUBT treatment, everything remained without changes (as after 24 hours), only at the κ-carrageenan injection site erythema was visible.

Thus, in mice with κ-carrageenan tail vein thrombosis, the administration of SUBT allowed to avoid local changes; the animals' condition was objectively better as compared to the group without SUBT treatment.

*A clinical study of the efficacy and safety of the SUBT in patients with acute venous thrombosis.* Findings of the research indicate that the SUBT daily dose of 1600 IU during the course is effective. This dose provides an increase in reserve capacity of anticoagulant hemostasis and a decrease in

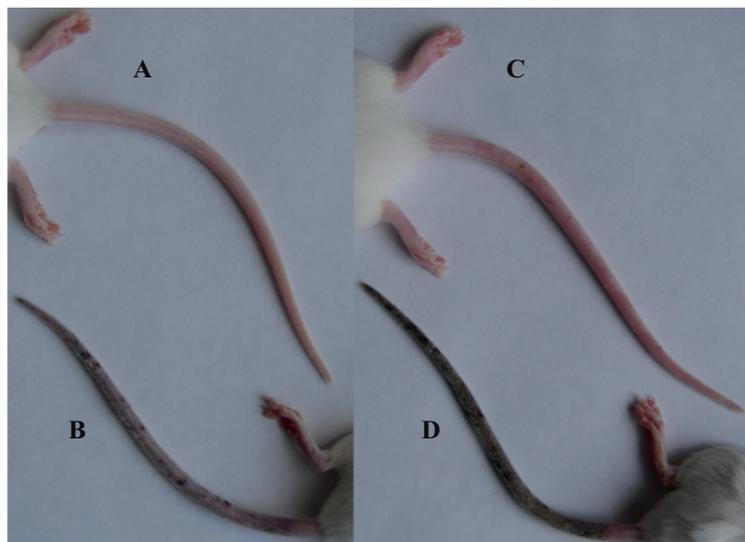
24 ч после инъекций. В контрольной группе длина участка с индуцированным тромбозом составила  $6.9 \pm 0.2$  см, т. е. весь участок, на который была наложена временная лигатура (рис. 4, В), при этом отчетливо видна область выше места сдавливания, не подвергшаяся тромбозу. Уже через сутки была видна внешняя разница: животные контрольной группы потеряли в массе, в среднем  $2.5 \pm 0.7$  г. Также у мышей без лечения препаратом СУБТ отмечался цианоз кожных покровов. Возможно, в связи с изменениями коагуляционных параметров крови в сосудах мышцей контрольной группы образовывались микротромбы [9]. В группе с введением СУБТ масса животных и внешние покровы кожи остались без изменений. В группе с лечением СУБТ через 24 ч после инъекции тромбоз в хвостовых венах не развивался. На участке хвоста, где делали инъекции, к-каррагинан вызвал лишь воспалительную реакцию, отмечающуюся покраснением кожных покровов хвоста (рис. 4, С).

Через 48 ч в группе без лечения тромбоз привел к некротизации тканей хвоста (рис. 4, D). В группе с введением СУБТ все осталось без изменений (как и через 24 ч), лишь в месте введения к-каррагинана видна эритема.

Таким образом, у мышей с к-каррагинановым тромбозом хвостовой вены введение СУБТ позволяло избежать локальных изменений, состояние животных было объективно лучше по сравнению с группой без применения СУБТ.

platelet aggregation activity with a background of optimized ratio of some cytokines responsible for the implementation of pro- and anti-inflammatory activity.

In the study of hemostasis, we revealed the following dynamics of parameters on treatment: the APTT and platelet count did not change in the groups, the fibrinogen level decreased, and the international normalized ratio increased in all groups of patients. The D-dimer level decreased in the control group and the SUBT 3200 IU/day group, however, in patients who received SUBT in a daily dose of 4800 IU/day, by the end of the therapy course, the D-dimer level did not decrease, that is, lysis of thrombotic masses continued at the same rate. It should be noted that during the study in the Protocol 1 and Protocol 2 samplings there were no clinical and paraclinical signs of thromboembolism, as well as cases with negative dynamics. On the contrary, an increase in blood flow by more than 5% from the initial one or recanalization of the vein (restoration of blood flow by at least 5% with its complete absence at the beginning of therapy) was recorded. When assessing with ultrasound imaging the degree of normalization of blood flow in the area of compromised blood circulation after therapy, statistically significant differences were found between the groups of patients who received SUBT and the placebo-treated patients with conventional therapy for thrombosis in both groups.



**Рис. 4.** Изменение хвостов мышей в процессе эксперимента:

A — интактное животное; B — контрольная группа через 24 ч после подкожного введения к-каррагинана; C — группа с лечением СУБТ через сутки после инъекции; D — группа контроля через 48 ч

**Fig. 4.** Change in the mice's tails during the experiment:

A — intact animal; B — the control group 24 hours after subcutaneous administration of  $\kappa$ -carrageenan; C — the group with SUBT treatment one day after the injection; D — the control group after 48 hours

Клиническое исследование эффективности и безопасности применения СУБТ у больных с острым венозным тромбозом. По результатам исследования установлено, что курсовой прием СУБТ в суточной дозе 1600 ЕД обеспечивает достаточную эффективность, что выражается в повышении резервных возможностей антикоагулянтного звена гемостаза и снижении агрегационной активности тромбоцитов на фоне оптимизации соотношения ряда цитокинов, ответственных за реализацию про- и противовоспалительной активности.

При исследовании гемостаза была выявлена следующая динамика показателей на фоне проводимой терапии: показатели АЧТВ и количества тромбоцитов не изменялись в группах, уровень фибриногена снижался, а международное нормализованное отношение увеличивалось во всех группах пациентов; уровень D-димера снижался в контрольной группе и группе «СУБТ 3200 ЕД/сут», а у пациентов, получавших СУБТ в суточной дозе 4800 ЕД/сут, ко времени окончания терапии уровень D-димера не уменьшался, т. е. лизис тромботических масс продолжался с прежней скоростью. Нужно отметить, что при проведении исследования в выборках «Протокол 1» и «Протокол 2» не зарегистрировано клинических и параклинических признаков тромбоэмболии, а также случаев с отрицательной динамикой. Напротив, зафиксировано увеличение кровотока более чем на 5 % от исходного либо реканализация вены (восстановление кровотока как минимум на 5 % при полном его отсутствии к началу терапии). При оценке степени нормализации кровотока в зоне скомпрометированного кровообращения после проведения терапии с помощью УЗ-визуализации обнаружены статистически значимые различия между группами пациентов, получавших на фоне общепринятой терапии тромбоза СУБТ, и пациентов, получавших плацебо.

У пациентов, получавших СУБТ в дозе 1600 и 3200 ЕД/сут, увеличение кровотока более чем на 5 % от исходного либо реканализация вены наблюдается в 1.6 раза чаще (на 60 %), чем у пациентов контрольной группы. У пациентов, получавших СУБТ в дозе 4800 ЕД/сут, увеличение кровотока более чем на 5 % от исходного либо реканализация вены наблюдается в 1.5 раза чаще (на 50 %), чем у пациентов контрольной группы.

Таким образом, проведенный анализ показывает безопасность и эффективность СУБТ при

In patients who received SUBT in 1600 and 3200 IU/day, an increase in blood flow by more than 5% from the initial or vein recanalization is observed 1.6 times more often (by 60%) than in patients of the control group. In patients who received 4800 IU/day of SUBT, an increase in blood flow by more than 5% from the initial or recanalization of the vein is observed 1.5 times more often (by 50%) than in patients of the control group.

Thus, the analysis shows the safety and the efficacy of SUBT in the treatment of venous thrombosis of the lower extremities.

The results of *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that SUBT has a direct thrombolytic effect. Besides, a thrombus, when exposed to SUBT, dissolves layer-by-layer without fragmentation. This fact seems to be extremely important for the clinical use of SUBT since it excludes the embologeneity of the thrombolysis performed.

## CONCLUSION

The drug based on immobilized subtilisins, studied in preclinical and clinical researches, can be introduced into clinical practice as an oral thrombolytic medication.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

комплексной терапии венозных тромбозов нижних конечностей.

Результаты экспериментов *in vitro* и *in vivo* показали, что СУБТ обладает прямым тромболитическим действием. Кроме того, тромб при воздействии СУБТ растворяется послойно, без фрагментации. Это обстоятельство представляется чрезвычайно важным для клинического применения СУБТ, поскольку исключает эмбологенность проводимого тромболитического действия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лекарственный препарат на основе иммобилизованных субтилизинов, изученный в доклинических и клинических исследованиях, может быть внедрен в клиническую практику в качестве перорального средства тромболитической терапии.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hoffman M., Monroe D.M. 3rd. A cell-based model of hemostasis // *Thromb. Haemost.* 2001. Vol. 85 (6). P. 958–965. doi: 10.1055/s-0037-1615947.
- Лобастов К.В., Деметьева Г.И., Лаберко Л.А. Современные представления об этиологии и патогенезе венозного тромбоза: переосмысление триады Вирхова // *Флебология*. 2019. Т. 13, № 3. С. 227–235.
- Счастливец И.В., Лобастов К.В., Цаплин С.Н., Мкртычев Д.С. Современный взгляд на систему гемостаза: клеточная теория // *Мед. совет*. 2019. № 16. С. 72–77.
- Житкова Ю.В., Айсина Р.Б., Варфоломеев С.Д. Кинетика лизиса фибрина плазмином: ингибирование продуктами деградации фибрина // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22, № 12. С. 911–915.
- Baldwin J.F., Sood V., Megan A. et al. The role of urokinase plasminogen activator and plasmin activator inhibitor-1 on vein wall remodeling in experimental deep vein thrombosis // *Vasc. Surg.* 2012 Oct. Vol. 56 (4). P. 1089–1097. doi: 10.1016/j.jvs.2012.02.054.
- Wahlgren N., Ahmed N., Dávalos A. et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study // *Lancet*. 2007. Vol. 369 (9558). P. 275–282.
- Donkel S.J., Benaddi B., Dippel D.W.J., Ten Cate H., de Maat M.P.M. Prognostic hemostasis biomarkers in acute ischemic stroke // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019. Vol. 39. P. 360–372.
- Szegedi I., Nagy A., Szekely E.G. et al. PAI-1 5G/5G genotype is an independent risk of intracranial hemorrhage in post-lysis stroke patients // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2019 Nov. Vol. 6 (11). P. 2240–2250. doi: 10.1002/acn3.50923.
- Liu S.Q., Guo J.Y., Du J. et al. Anticoagulant effect of Huisheng Oral Solution in a rat model of thrombosis // *Indian J. Pharmacol.* 2013 Jul-Aug. Vol. 45 (4). P. 359–364. doi: 10.4103/0253-7613.115018.
- Scheer F.A., Shea S.A. Human circadian system causes a morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of the sleep/wake cycle // *Blood*. 2014. Vol. 123. P. 590–593.
- Kim W., Choi K., Kim Y. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jang // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. Vol. 62 (7). P. 2482–2488.
- Baskova I.P., Kalabushev S.N., Akhaev D.N. et al. Role of isopeptidolysis in the process of thrombolysis // *Thromb. Res.* 2018 May. Vol. 165. P. 18–23.
- Avhad D.N., Vanjari S.S., Virendra K. A novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sphaericus* MTCC3672: optimization and purification studies // *Am. J. Cur. Microbiol.* 2013. Vol. 1. P. 1–13.
- Peng Y., Huang Q., Zhang R.H., Zhang Y.Z. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food // *Comp. Biochem. Physiol. Pt. B: Biochem. Mol. Biol.* 2003. Vol. 134 (1). P. 45–52.

## REFERENCES

- Hoffman M., Monroe D.M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.*, 85 (6), 958–965. doi: 10.1055/s-0037-1615947.
- Lobastov K.V., Dementieva G.I., Laberko L.A. (2019). Current insights on the etiology and pathogenesis of venous thrombosis: Virchow's triad revision. *Journal of Venous Disorders*, 13 (3), 227–235.
- Schastlivtsev I.V., Lobastov K.V., Tsaplin S.N., Mkrtychev D.S. (2019). Modern view on hemostasis system: cell theory. *Medical Council*, 16, 72–77.
- Zhitkova Yu.V., Aisina R.B., Varfolomeev S.D. (1996). Kinetics of fibrinolysis by plasmin: inhibition by the products of fibrin degradation. *Bioorganic Chemistry*, 22 (12), 911–915. In Russ.
- Baldwin J.F., Sood V., Megan A. et al. (2012, Oct). The role of urokinase plasminogen activator and plasmin activator inhibitor-1 on vein wall remodeling in experimental deep vein thrombosis. *Vasc. Surg.*, 56 (4), 1089–1097. doi: 10.1016/j.jvs.2012.02.054.
- Wahlgren N., Ahmed N., Dávalos A. et al. (2007). Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet*, 369 (9558), 275–282.
- Donkel S.J., Benaddi B., Dippel D.W.J., Ten Cate H., de Maat M.P.M. (2019). Prognostic hemostasis biomarkers in acute ischemic stroke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 39, 360–372.
- Szegedi I., Nagy A., Szekely E.G. et al. (2019). PAI-1 5G/5G genotype is an independent risk of intracranial hemorrhage in post-lysis stroke patients. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, 6 (11), 2240–2250. doi: 10.1002/acn3.50923.
- Liu S.Q., Guo J.Y., Du J. et al. (2013, Jul-Aug). Anticoagulant effect of Huisheng Oral Solution in a rat model of thrombosis. *Indian J. Pharmacol.*, 45 (4), 359–364. doi: 10.4103/0253-7613.115018.
- Scheer F.A., Shea S.A. (2014). Human circadian system causes a morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of the sleep/wake cycle. *Blood*, 123, 590–593.
- Kim W., Choi K., Kim Y. et al. (1996). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (7), 2482–2488.
- Baskova I.P., Kalabushev S.N., Akhaev D.N. et al. (2018, May). Role of isopeptidolysis in the process of thrombolysis. *Thromb. Res.*, 165, 18–23.
- Avhad D.N., Vanjari S.S., Virendra K. (2013). A novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sphaericus* MTCC3672: optimization and purification studies. *Am. J. Cur. Microbiol.*, 1, 1–13.
- Peng Y., Huang Q., Zhang R.H., Zhang Y.Z. (2003). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp. Biochem. Physiol. Pt. B: Biochem. Mol. Biol.*, 134 (1), 45–52.
- Dygay A.M., Zyuz'kov G.N., Zhdanov V.V. et al. (2012). Hypoglycemic effects of hyaluronate-endo-β-NAcetylhexosaminidase immobilized by electron

15. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Гипогликемические свойства иммобилизированной с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 2012. Т. 153, № 1. С. 106–109.
16. Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Ластовецкий А.Г., Китанина К.Ю., Удут В.В. Технология электронно-лучевого синтеза как перспективное направление в разработке иммобилизованных интерферонов для перорального применения (обзор литературы) // Вестн. новых мед. технологий. 2017. № 3. С. 211–225.
17. Bekemeier H., Giessler A.J. Thrombosis induction by different carrageenans in rats and mice // *Naturwissenschaften*. 1987. Vol. 74. P. 345–346.
- beam synthesis nanotechnology. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 153 (1), 106–109.
16. Kinsht D.N., Madonov P.G., Lastovetskiy A.G., Kitaniina K.Yu., Udut V.V. (2017). Technology of electron-beam synthesis as a perspective direction in development of immobilized interferons for oral use (literature report). *Journal of New Medical Technologies*, 3, 211–225.
17. Bekemeier H., Giessler A.J. (1987). Thrombosis induction by different carrageenans in rats and mice. *Naturwissenschaften*, 74, 345–346.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Мишенина Светлана Владимировна** — доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Байкалов Герман Игоревич** — аспирант кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Байкалова Наталья Евгеньевна** — ординатор кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Макаров Вячеслав Константинович** — студент стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Мадонов Павел Геннадьевич** — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Образец цитирования:** Мишенина С.В., Байкалов Г.И., Байкалова Н.Е., Макаров В.К., Мадонов П.Г. Обоснование применения иммобилизованных субтилизинов для таргетной терапии венозных тромбозов // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020. № 1. С. 76–88.

### ABOUT THE AUTHORS

**Mishenina Svetlana Vladimirovna** — Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University.

**Baikalov German Igorevich** — Graduate Student, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine Novosibirsk State Medical University.

**Baikalova Natalya Evgenyevna** — Resident, Department of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk State Medical University.

**Makarov Vyacheslav Konstantinovich** — Student, Faculty of Dentistry, Novosibirsk State Medical University.

**Madonov Pavel Gennadyevich** — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University.

**Citation example:** Mishenina S.V., Baykalov G.I., Baikalova N.E., Makarov V.K., Madonov P.G. (2020). A rationale for application of immobilized subtilisines for target therapy of venous thrombosis. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 76–88.