**Wydział Farmaceutyczny**

**z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Emilia Sokołowska

***Farmakologiczne badania zmodyfikowanych kationowo***

***polimerów dekstranowych przywracających prawidłową***

***krzepliwość krwi po podaniu heparyny niefrakcjonowanej***

***szczurom i myszom***

Rozprawa doktorska

w dziedzinie nauk farmaceutycznych

Białystok 2016 r.

***Streszczenie***

Podstawowym środkiem hamującym krzepnięcie krwi w terapii szpitalnej jest

heparyna niefrakcjonowana. W przypadku ryzyka nadmiernego krwawienia, gdy potrzebne

jest szybkie odwrócenie działania antykoagulacyjnego heparyny, antidotum jest protamina,

pozyskiwana z nasienia łososia. Prawdopodobnie jej znaczna toksyczność, która

manifestuje się jako spadek ciśnienia tętniczego krwi, nadciśnienie płucne czy zagrażające

życiu reakcje anafilaktyczne, związana jest z odzwierzęcym pochodzeniem. Od lat toczą

się badania nad alternatywnym środkiem, który mógłby zastąpić protaminę, jednak wiele

z nich skończyło się niepowodzeniem z powodu nieakceptowalnego profilu

bezpieczeństwa. W 2011 roku zostały opublikowane wyniki badań zmodyfikowanych

kationowo dekstranów, które skutecznie wiązały heparynę niefrakcjonowaną w warunkach

*in vitro*.

Celem mojej pracy było wykazanie zdolności zmodyfikowanych kationowo

dekstranów do neutralizacji heparyny niefrakcjonowanej w modelach zakrzepicy

indukowanej u myszy i szczurów oraz ocena eliminacji, dystrybucji i toksyczności

badanych polimerów.

W swoich badaniach wykazałam, że badane związki neutralizowały działanie

przeciwkrzepliwe heparyny niefrakcjonowanej w modelu zakrzepicy tętniczej

indukowanej prądem elektrycznym u szczurów oraz w modelu zakrzepicy żylnej

indukowanej chlorkiem żelaza (III) u myszy. Krwawienie po heparynie z ogona szczura

zostało całkowicie zatrzymane po podaniu zmodyfikowanego dekstranu. Dodatkowo

wykazałam, że badany polimer skutecznie przywracał wydłużony po heparynie czas

częściowej tromboplastyny po aktywacji do wartości kontrolnych. Okazało się, że Dex40-

GTMAC3, dekstran o masie 40 kDa, podstawiony grupami kationowymi GTMAC

w stosunku 0.65 na jednostkę glukozową, ma korzystniejszy profil bezpieczeństwa niż

protamina. Badany polimer był szybko (około 12 minut) eliminowany z ustroju,

66

rozmieszczał się głównie w nerkach i wątrobie, bez cech znaczącej kumulacji

w pozostałych narządach, był dobrze tolerowany przez myszy i szczury od 1 godziny do

28 dni: nie zmieniał parametrów biochemicznych i morfologicznych krwi oraz nie

powodował długotrwałych zmian histopatologicznych w nerkach, płucach i wątrobie.

Biorąc pod uwagę, iż Dex40-GTMAC3 cechuje się wysoką skutecznością działania

przy niskiej toksyczności, moje badania przedstawiają nowego kandydata na lek

przywracający prawidłową krzepliwość krwi po podaniu heparyny niefrakcjonowanej.

Mam nadzieję, że wyniki mojej rozprawy doktorskiej pozwolą w przyszłości poprawić stan

zdrowia pacjentów, którzy muszą być poddani zabiegom kardiochirurgicznym

wymagającym zastosowania heparyny wraz z odwracającą jej działanie protaminą.

67

***Abstract***

Unfractionated heparin is used in medicine to prevent blood clotting. When the fast

reversal of the anticoagulant action of heparin is required due to excessive bleeding,

protamine – an antidote isolated from salmon sperm is available. Because of the natural

origin, adverse effects of protamine manifest as hypotension, pulmonary hypertension, or

life-threatening anaphylactic reactions. Researchers keep searching for a safer alternative

over the last years, but many of them failed because of unacceptable safety profile. In 2011

cationically modified dextrans able to efficiently bind heparin *in vitro* were presented.

The aim of my work was to demonstrate the ability of cationically modified

dextrans to neutralize heparin in models of venous and arterial thrombosis induced in mice

and rats and to evaluate elimination, distribution and toxicity profile of tested polymers.

Modified dextrans neutralized the antithrombotic activity of heparin in a model of

arterial thrombosis induced by electrical stimulation in rats and a model of venous

thrombosis induced by ferric chloride (III) in mice. Furthermore, they successfully stopped

bleeding and restored coagulation parameters to control values. Dex40-GTMAC3 – a 40

kDa dextran substituted with cationic groups of GTMAC in a ratio of 0.65 per glucose

unit, was rapidly (after 12 minutes) eliminated from the circulation. It was mainly

distributed to kidneys and liver, without signs of significant organ accumulation measured

intravitally in mice injected with fluorescein-labeled polymer. Mice and rats well tolerated

Dex40-GTMAC3 from 1 hour up to 28 days. I did not observe changes in blood count and

blood chemistry and in contrast to protamine, it did not cause long-term histopathological

changes in kidneys, lungs and liver.

In conclusion, my research presents Dex40-GTMAC3 as a new, efficient and safe

candidate to restore normal blood clotting after unfractionated heparin. I hope that Dex40-

GTMAC3 will improve health and reduce mortality of patients undergoing cardiovascular

operations requiring heparin reversal.