



Экспериментальные модели тромбоземболии легочной артерии

Муллова И. С.^{1,2}, Чаулин А. М.^{1,2}, Свечков Н. А.^{1,2}, Павлова Т. В.^{1,2}, Лимарева Л. В.¹, Дупляков Д. В.^{1,2}

Тромбоземболия легочной артерии (ТЭЛА) в структуре острых сердечно-сосудистых заболеваний занимает третье место. С каждым годом наблюдается стремительный рост заболеваемости и смертности от ТЭЛА. Лабораторные биомаркеры для диагностики ТЭЛА не обладают необходимой специфичностью, вследствие чего малоэффективны. ТЭЛА требует своевременного активного лечения, в частности — для профилактики серьезных осложнений. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования по изучению и поиску новых перспективных биомаркеров для раннего выявления ТЭЛА, патофизиологических механизмов и мишеней для терапевтического воздействия. В значительной степени новую информацию о патофизиологии сердечно-сосудистых заболеваний, в т.ч. и ТЭЛА, ученые получают из экспериментальных исследований с использованием моделей на животных. В настоящем обзоре нами суммированы основные существующие экспериментальные модели ТЭЛА, описаны принципы и методы моделирования данного заболевания. Основными моделями ТЭЛА являются: внутривенная инфузия тромбина, аденозиндифосфат-индуцированная ТЭЛА, индукция ТЭЛА при помощи тромбoplastина, человеческого рекомбинантного тканевого фактора или высокомолекулярных полифосфатов, моделирование ТЭЛА посредством коллаген-адреналиновой смеси, внутривенное введение готовых тромбов, приготовленных *ex vivo*, хирургическая модель. В данной публикации также представлен собственный опыт создания искусственной модели ТЭЛА на животных с использованием внутривенного введения тромба. В нашей модели получено подтверждение ТЭЛА при патологоанатомическом обследовании и повышение уровня биомаркеров: тропонина, N-концевого фрагмента промозгового натрийуретического пептида, D-димера. В данном пилотном исследовании была создана модель ТЭЛА для изучения патогенеза и новых возможностей лечения данного заболевания. Для подтверждения эффективности модели потребуется увеличение объема эксперимента в будущих исследованиях.

Ключевые слова: тромбоземболия легочной артерии, экспериментальные модели, патофизиология, экспериментальная кардиология, клиническая лабораторная диагностика.

Отношения и деятельность: нет.

Благодарности. Авторы выражают признательность заведующей лабораторией экспериментальной морфологии Института экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета Нефёдовой И. Ф., заведующей лабораторией Самарского област-

ного клинического кардиологического диспансера им. В.П. Полякова, к.м.н. Ушаковой Е. В., врачу-кардиологу Грабовому Д. А., клиническому ординатору Гришину С. А. за оказанную помощь при проведении данного исследования и написании настоящей статьи.

¹ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, Самара; ²ГБУЗ Самарский областной клинический кардиологический диспансер им. В.П. Полякова, Самара, Россия.

Муллова И. С.* — к.м.н., врач-кардиолог, ассистент кафедры кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии ИПО, ORCID: 0000-0002-9321-6251, Чаулин А. М. — врач клинической лабораторной диагностики клинко-диагностической лаборатории, ассистент кафедры гистологии и эмбриологии, ORCID: 0000-0002-2712-0227, Свечков Н. А. — врач, сердечно-сосудистый хирург, старший лаборант кафедры кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии ИПО, ORCID: 0000-0001-6568-6136, Павлова Т. В. — д.м.н., профессор кафедры кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии ИПО, врач-кардиолог, ORCID: 0000-0003-3301-1577, Лимарева Л. В. — д.б.н., доцент, директор Института экспериментальной медицины и биотехнологий, ORCID: 0000-0003-4529-5896, Дупляков Д. В. — д.м.н., профессор, зам. главного врача по медицинской части, директор НИИ кардиологии, профессор кафедры кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии ИПО, ORCID: 0000-0002-6453-2976.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
irinamullova@gmail.com

АДФ — аденозиндифосфат, ВМП — высокомолекулярные полифосфаты, НПВ — нижняя полая вена, ПФУ — перфторуглеродные наноземлюли, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ТГВ — тромбоз глубоких вен, ТЭЛА — тромбоземболия легочной артерии.

Рукопись получена 30.01.2022

Рецензия получена 11.02.2022

Принята к публикации 14.02.2022



Для цитирования: Муллова И. С., Чаулин А. М., Свечков Н. А., Павлова Т. В., Лимарева Л. В., Дупляков Д. В. Экспериментальные модели тромбоземболии легочной артерии. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(1S):4887. doi:10.15829/1560-4071-2022-4887

Experimental models of pulmonary embolism

Mullova I. S.^{1,2}, Chaulin A. M.^{1,2}, Svechikov N. A.^{1,2}, Pavlova T. V.^{1,2}, Limareva L. V.¹, Duplyakov D. V.^{1,2}

Pulmonary embolism (PE) ranks third in the structure of acute cardiovascular diseases. Every year there is a rapid increase in morbidity and mortality from PE. Laboratory biomarkers for PE diagnosis do not have the necessary specificity, and therefore are ineffective. PE requires timely active treatment, in particular for the prevention of serious complications. In this regard, further research is needed to study and search for novel promising biomarkers for the early detection of PE, pathophysiological mechanisms and targets for therapeutic effects. To a large extent, novel data on the pathophysiology of cardiovascular diseases, including PE, scientists receive from experimental studies using animal models. In this review, we summarize the main existing experimental models of PE, describe the principles and methods for modeling this disease. There are following models of PE: intravenous thrombin infusion, adenosine diphosphate-induced PE, PE induction by thromboplastin, recombinant human tissue factor or high molecular weight polyphosphates, collagen/adrenaline-induced PE, *ex vivo* thrombus intravenous

administration, surgical model. This publication also presents our own experience in creating an artificial model of PE in animals using an intravenous thrombus. In our model, confirmation of PE was obtained during pathological examination and an increase in the level of following biomarkers: troponin, N-terminal pro-brain natriuretic peptide, and D-dimer. In this pilot study, a PE model was created to study the pathogenesis and novel treatment options for this disease. To confirm the effectiveness of the model, future studies are required.

Keywords: pulmonary embolism, experimental models, pathophysiology, experimental cardiology, clinical laboratory diagnostics.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the head of the laboratory of experimental morphology of the Institute of Experimental Medicine and Biotechnology of the V.P. Polyakov Samara State Medical University, Candidate

of Medical Science. Ushakova E.V., cardiologist Grabovoi D.A., resident physician Grishin S.A. for their assistance in conducting this study and writing this article.

Relationships and Activities: none.

¹Samara State Medical University, Samara; ²V. P. Polyakov Samara Regional Clinical Cardiology Dispensary, Samara, Russia.

Mullova I. S.* ORCID: 0000-0002-9321-6251, Chaulin A. M. ORCID: 0000-0002-2712-0227, Svechkov N. A. ORCID: 0000-0001-6568-6136, Pavlova T. V. ORCID:

0000-0003-3301-1577, Limareva L. V. ORCID: 0000-0003-4529-5896, Duplyakov D. V. ORCID: 0000-0002-6453-2976.

*Corresponding author: irinamullova@gmail.com

Received: 30.01.2022 **Revision Received:** 11.02.2022 **Accepted:** 14.02.2022

For citation: Mullova I. S., Chaulin A. M., Svechkov N. A., Pavlova T. V., Limareva L. V., Duplyakov D. V. Experimental models of pulmonary embolism. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(1S):4887. doi:10.15829/1560-4071-2022-4887

Тромбоз играет решающую роль в различных сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ), таких как острый инфаркт миокарда, тромбоз глубоких вен (ТГВ) и тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА), которые являются основными причинами заболеваемости и смертности населения всего земного шара [1, 2]. Венозная тромбоэмболия, которая включает в себя тромбоз вен и ТЭЛА, занимает третье место в структуре сердечно-сосудистой смертности после острого инфаркта миокарда и инсульта. Ежегодная заболеваемость венозной тромбоэмболией составляет порядка 300-600 тыс. случаев в мире [3]. Диагностика ТЭЛА осложняется тем, что отсутствуют специфические клинические проявления, а также функциональные и лабораторные показатели для раннего выявления легочной эмболии. Своевременная диагностика ТЭЛА остается важнейшей нерешенной проблемой современного здравоохранения [4-6], в т.ч. и потому, что при жизни диагноз ТЭЛА устанавливается менее чем в 70% наблюдений [6, 7].

Подавляющее большинство случаев острой ТЭЛА (~95%) развивается в результате отрыва и перемещения тромбов из сосудов нижних конечностей при ТГВ, и в более редких случаях — из других сосудов, таких как подключичная, плечевая и почечные вены [6] или правых отделов сердца.

В связи с недостаточной эффективностью существующих методов выявления и лечения пациентов с ТЭЛА и ТГВ [8, 9] необходимы дальнейшие исследования по поиску новых диагностических и лечебно-профилактических подходов. Огромную роль в изучении патофизиологии и доклинической оценке методов диагностики и лечения ТЭЛА сыграли экспериментальные исследования на лабораторных животных.

Для экспериментального моделирования ТЭЛА используются следующие методы: внутривенная инфузия тромбина, аденозиндифосфат-индуцированная ТЭЛА, индукция ТЭЛА при помощи тромбопластина, человеческого рекомбинантного тканевого фактора или высокомолекулярных полифосфатов (ВМП); моделирование ТЭЛА посредством коллаген-адреналиновой смеси, внутривенное введение готовых тромбов, приготовленных *ex vivo*, хирургические модели (временная окклюзия нижней полой вены (НПВ), окклюзия бедренной вены).

Идеальная модель ТЭЛА должна иметь хорошую воспроизводимость венозного тромбоза и позволять в реальном времени наблюдать и изучать клеточные механизмы роста тромба. К сожалению, подобной модели ТЭЛА на данный момент не существует, в связи с чем при исследовании определенных аспектов ТЭЛА следует использовать конкретную модель, с учетом характерных для нее особенностей и ограничений.

Ниже мы приведем описание нескольких, наиболее часто используемых моделей ТЭЛА и обозначим основные преимущества и недостатки каждой конкретной модели.

Внутривенная инфузия (инъекция) тромбина

Тромбин является активированным фактором II (IIa) свертывания крови и образуется под действием протромбиназного комплекса (Ха, Va, тромбоцитарный тромбопластин, ионы Ca^{2+}) из II неактивированного фактора (протромбина). По механизму действия тромбин относится к ферментам подкласса сериновых протеаз класса гидролаз. Тромбин катализирует жизненно-необходимую реакцию превращения фибриногена (I неактивного фактора) в фибрин (I активный фактор), который является основной составляющей тромба для остановки кровотечения и восстановления целостности сосуда при его повреждении [10, 11]. Тромбин широко используется в практической медицине (в качестве гемостатического препарата для наружного и местного применения), клинической лабораторной диагностике (тромбин является основным составляющим реагента для определения таких показателей коагулограммы, как фибриноген и тромбиновое время, а также для оценки агрегации тромбоцитов) [12, 13]. В дополнение к этим сферам применения внутривенное введение тромбина лабораторным животным используется в экспериментальной кардиологии для индукции ТЭЛА [14, 15].

Temme S, et al. (2015) индуцировали ТЭЛА у лабораторных мышей при помощи внутривенной инъекции тромбина в сочетании с перфторуглеродными наноземulsionами (ПФУ). Для индуцирования ТЭЛА мышам вводили смесь человеческого тромбина (Sigma-Aldrich, Seelze, Германия; 10 Ед/25 г массы

тела) и ПФУ. В данном случае ПФУ — эмульгированные биологически инертные перфторуглероды — используются в качестве контрастного вещества для отслеживания клеток *ex vivo* или *in vivo*, меченных ПФУ. Выживаемость мышей после инъекции составила 80%. На данной модели исследователи разработали новый метод неинвазивной молекулярной визуализации раннего венозного тромбоза с помощью магнитно-резонансной томографии 19F с ПФУ [14].

В другом исследовании Brandt M, et al. (2018) изучали патогенез хронической тромбоэмболической легочной гипертензии, возникающей чаще всего в результате ТГВ и ТЭЛА. Моделирование ТЭЛА осуществлялось посредством внутривенного введения тромбина. Обезболивание мышей проводилось 2-4% изофлураном в сочетании с подачей кислорода (0,2 л/мин 100% O₂). Острые экспериментальные легочные эмболии индуцировали ретроорбитальной инъекцией 166 Ед/кг массы тела α -тромбина (бычий, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), растворенного в 100 мл физиологического раствора. После каждой инъекции проводили эхокардиографию и оценку клинической картины у животных. Сразу после инъекции тромбина ТЭЛА была подтверждена на основании комплекса клинических и функциональных данных: внезапной брадикардии или асистолии, апноэ или брадипноэ, а также повышением давления в легочной артерии, оцениваемой при помощи эхокардиографии. Следующую инъекцию выполняли через 15 мин. Всего на одно животное было проведено до трех инъекций. При помощи данного протокола исследования удалось вызвать гемодинамически значимую, но нелетальную ТЭЛА. Ученые установили, что дозы тромбина, превышающие 166 Ед/кг массы тела, были смертельными для значительного числа лабораторных животных, в то время как более низкие дозы и интервальное выполнение инъекций повышали выживаемость животных, делая возможным изучение патогенеза ТЭЛА и оценку лечебных и диагностических возможностей в долгосрочной перспективе [15]. Также в исследовании было обнаружено, что инъекция тромбина лабораторным животным не только вызывала ТЭЛА, но и приводила к деформации и дилатации правого желудочка, уплощению внутрижелудочковой перегородки, а также сдавлению левого желудочка [15].

Для того, чтобы вызвать ТЭЛА, человеческий тромбин можно вводить внутривенно с использованием катетера для хвостовой вены. Более медленное введение обеспечивает выживание приблизительно 80% исследуемых животных. В зависимости от дозы и концентрации тромбина исследователи вызывали развитие разных форм ТЭЛА. Так, на основании размера сосуда и степени его обструкции легочная тромбоэмболия была разделена на четыре группы по массивности поражения (с I по IV степень), при этом чаще

всего у животных развивалась ТЭЛА I-III степени, а IV встречалась гораздо реже. В качестве группы сравнения использовались животные, которым в легочные сосуды вводился физиологический раствор, при этом тромбоз не развивался.

Инъекция человеческого тромбина приводила к формированию легочных тромбов различных размеров, что подтверждается иммуногистохимическими методами с использованием антител против маркера тромбоцитов — CD41. Уровень смертности среди лабораторных животных после инъекции человеческого тромбина составил ~20%, что соответствовало результатам ряда предшествующих исследований с использованием данной модели [15, 16].

Аденозиндифосфат-индуцированная ТЭЛА

Аденозиндифосфат (АДФ) является низкомолекулярным соединением, относится к нуклеотидам и состоит из аденина, рибозы и двух остатков фосфорной кислоты. АДФ выполняет в организме человека ряд функций, к числу которых относится и участие в гемостазе. АДФ в значительных количествах локализуется в составе гранул тромбоцитов, высвобождаясь при их активации и способствуя адгезии и агрегации [17]. В клинической лабораторной диагностике данный реагент используется для исследования тромбоцитарного звена системы гемостаза — АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов [18]. АДФ также нашел применение в экспериментальной кардиологии для индуцирования тромбозов различных сосудов, в частности — легочной артерии [19, 20].

В экспериментальном исследовании на самцах мышей C57BL/6J обнаружено, что внутривенное введение АДФ приводит к зависимому от дозы обратимому прекращению кровотока, которое можно обнаружить в брыжеечных сосудах с помощью лазерной доплеровской флуометрии. Животных анестезировали с помощью внутримышечной инъекции кетамина и седазина и помещали на хирургический стол, обеспечивая контроль температуры тела. Брюшную полую вену канюлировали с использованием пластикового катетера 22G. АДФ, растворенный в концентрации 2,5 мг/мл в физиологическом растворе, вводили в брюшную полую вену с помощью инфузионного насоса (BBraun, Германия) в течение 10 сек с поддержанием скорости потока, что приводило к конечным дозам от 0,5 до 10 мг/кг массы тела [19]. При этом было обнаружено снижение количества циркулирующих тромбоцитов и накопление тромбоцитарных агрегатов в сосудах легких. Такой эффект может быть объяснен тем фактом, что легкие являются первой капиллярной системой на пути венозной крови, подвергающейся действию АДФ, и, поскольку этот агонист имеет относительно короткое действие, весь процесс агрегации и дезагрегации тромбоцитов происходит преимущественно в легких [20].

В зависимости от дозы АДФ возможно развитие разных форм ТЭЛА. В одном из исследований сообщалось, что для того, чтобы индуцировать измеримое накопление тромбоцитарных агрегатов в сосудах легких, минимальная доза АДФ должна составлять 0,4 мкг/кг массы тела [20]. Эффективными дозами для моделирования разных степеней тяжести ТЭЛА были признаны от 15 до 400 мкг/кг веса животного. Примечательно, что для тромбоза и угнетения кровотока в брыжеечных сосудах минимальная доза АДФ составляет 500 мкг/кг массы тела, т.е. несколько выше, чем для моделирования ТЭЛА.

Модели ТЭЛА, индуцированные введением тканевого фактора (тромбопластин-индуцированная ТЭЛА)

Тромбопластин является III фактором свертывания крови, который по химической природе относится к сложным белкам и состоит из апопротеина III и фосфолипидов. В условиях здорового организма тканевый фактор высвобождается только при повреждении сосуда, после чего активирует фактор свертывания VII, инициируя каскад гемостатических реакций и обеспечивая образование тромбина [21]. Тромбопластин широко используется в практической медицине, клинической лабораторной диагностике (в качестве реагента для определения показателей коагулограммы — протромбинового индекса, международного нормализованного отношения) и экспериментальной кардиологии [22-25].

В ряде исследований моделирование тромбопластин-индуцированной ТЭЛА использовалось для изучения патофизиологии данного заболевания и доклинической оценки эффективности лекарственных препаратов. Так, Léon C изучал роль пуриnergических рецепторов тромбоцитов в развитии ТЭЛА и потенциальные возможности данных рецепторов в качестве мишеней для антитромботических препаратов [22]. Принцип модели тромбопластин-индуцированной ТЭЛА заключается во введении тромбопластина в яремную вену лабораторных животных. Для обезболивания/анестезирования лабораторных животных использовалась смесь 0,2% ксилазина и 1% кетамина в физиологическом растворе [23].

Инъекция тромбопластина приводила к значимому повышению комплекса тромбин-анти тромбин в плазме крови мышей, что непосредственно отражало образование тромбина. Мыши с дефицитом пуриnergических рецепторов (P2Y) оказались более чувствительны к тромбопластин-индуцированной ТЭЛА, чем мыши дикого типа, что свидетельствует о важной роли P2Y в патогенезе ТЭЛА и терапевтических возможностях антагонистов P2Y [24].

Smyth S, et al. с коллегами изучали вклад тромбоцитарного интегрина $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) в развитии

тромбоза на модели тромбопластин-индуцированной ТЭЛА [23].

Weiss E, et al. доказали роль рецепторов, активируемых протеазами (PAR3) в патогенезе ТЭЛА на экспериментальной модели. Моделирование ТЭЛА осуществлялось при помощи тромбопластина (Sigma-Aldrich), полученного из мозга кроликов. Каждый флакон с тромбопластином (3-4 мг лиофилизированного порошка) растворяли в 4 мл физиологического раствора и 100 мл этого раствора вводили лабораторным мышам в хвостовую вену. В таких дозах выживаемость мышей составила 100%. Было установлено, что в тромбоцитах мышей PAR3 функционирует как кофактор, который связывает тромбин, а ингибирование PAR3 может быть использовано для профилактики или лечения тромбозов у людей [24].

Моделирование ТЭЛА также используется для изучения диагностических возможностей ряда методов. Так, Page M, используя мышиную модель тромбопластин-индуцированной ТЭЛА, разработал неинвазивный способ визуализации ТЭЛА с помощью инфракрасной флуоресценции и позитронно-эмиссионной томографии [25].

Модели легочной эмболии, индуцированные инфузией рекомбинантного человеческого тканевого фактора или ВМП

Banno F, et al. [26] моделировали ТЭЛА при помощи рекомбинантного человеческого тканевого фактора (Dade Innovin) и ВМП. ВМП получены по методу, разработанному Smith SA, et al. [27]. Метафосфат натрия (Sigma-Aldrich Japan, Токио, Япония) дважды промывали очищенной водой и растворяли в 250 мл хлорида лития. ВМП (длиной 40-1200 фосфатных единиц) осаждали, добавляя 2,5 объема ацетона, и растворяли в дистиллированной воде.

В эксперименте мышей анестезировали 2,5% 2,2,2-трибромэтанолом, и вводили 15 мкл/г массы тела реагента рекомбинантного тканевого фактора (разведение 1/30) или ВМП (1,67 г/л). Дозу тканевого фактора и ВМП подбирали таким образом, чтобы после инфузии выживало ~20% мышей дикого типа. Средняя продолжительность жизни от момента инъекции составляла ~20 мин, при этом смерть определялась как остановка дыхания, которая сохранялась в течение не менее 2 мин. Через две минуты после остановки дыхания или по завершении 20-мин периода наблюдения лабораторным животным вводили 0,5 мл 1% синего Эванса в правый желудочек. Легкие были вырезаны, сфотографированы и оценены на наличие дефектов синей перфузии Эванса с использованием шкалы баллов (от 0 для отсутствия окклюзии до 4 для полной окклюзии) [26]. Используя эту модель, исследователи пришли к выводу, что мутация *K196E* в белке S является специфичным генетическим фактором риска развития ТЭЛА [28].

Таблица 1

Основные экспериментальные модели ТЭЛА

Модель	Объекты исследования	Принцип модели	Преимущества/недостатки	Задачи
Внутривенная инфузия тромбина	Самцы мышей C57BL/6	Наркоз — 1,5%-ный изофлуран. Для индуцирования ТЭЛА внутривенно вводили смесь человеческого тромбина и ПФУ или только тромбин	Простота выполнения (нет необходимости привлечения квалифицированного хирурга). Возможны изучение патогенеза ТЭЛА и визуализирующая оценка признаков дисфункции ПЖ	Неинвазивная визуализация раннего венозного тромбоза с помощью магнитно-резонансной томографии и эхокардиографии; развитие различных форм ТЭЛА по степени поражения легочного русла
АДФ-индуцированная ТЭЛА	Самцы мышей C57BL/6J	Наркоз — кетамин и седазин. АДФ, растворенный в концентрации 2,5 мг/мл в физиологическом растворе, вводили в брюшную полую вену	В зависимости от дозы АДФ возможно развитие разных форм ТЭЛА	Моделирование развития разных форм ТЭЛА
Модели ТЭЛА, индуцированные введением тканевого фактора (Тромбопластин-индуцированная ТЭЛА)	Самцы мышей C57BL/6J	Наркоз — смесь 0,2% ксилазина и 1% кетамина в физиологическом растворе. Введение тромбопластина в яремную вену лабораторных животных	Разработан неинвазивный способ визуализации ТЭЛА с помощью инфракрасной флуоресценции и позитронно-эмиссионной томографии	Изучение патофизиологии ТЭЛА и доклинической оценки эффективности лекарственных препаратов
Модели легочной эмболии, индуцированные инфузией рекомбинантного человеческого тканевого фактора или ВМП	Мыши	Наркоз — 2,5% 2,2,2-трибромэтанол. Вводили 15 мкл/г массы тела реагента рекомбинантного тканевого фактора (разведение 1/30) или ВМП (1,67 г/л)	Используя эту модель, исследователи пришли к выводу, что мутация K196E в белке S является специфичным генетическим фактором риска развития ТЭЛА	Изучение генетических факторов риска развития ТЭЛА
Внутривенное введение готовых тромбов, приготовленных ex vivo	Мыши	Введение готовых тромбов, приготовленных ex vivo, в бедренную вену лабораторных животных	Проста в исполнении, недостаток — не позволяет оценить ключевые аспекты тромбообразования, в связи с чем эта модель не соответствует физиологическим условиям и, как следствие, не подойдет для доклинической оценки антитромботических препаратов	Оценка эффективности новых методов диагностики ТЭЛА
Хирургические модели ТЭЛА	Крысы	Наркоз — внутрибрюшинное введение тиопентала натрия (50мг/кг веса животного). Проводилась временная окклюзия нижней кавальной вены	Недостаток — инвазивность и необходимость участия квалифицированного хирургического персонала, преимущества — высокая эффективность модели, соответствие частым клиническим ситуациям и возможность моделирования конкретной формы ТЭЛА	Моделирование конкретной формы ТЭЛА

Сокращения: АДФ — аденозиндифосфат, ВМП — высокомолекулярные полифосфаты, ПЖ — правый желудочек, ПФУ — перфторуглеродные наноэмульсии, ТЭЛА — тромбоз эмболия легочной артерии.

Внутривенное введение готовых тромбов, приготовленных ex vivo

Данная модель была разработана отечественными исследователями Амосовым В. И. и Золотницкой В. П. Принцип метода заключается во введении готовых тромбов, приготовленных ex vivo, в бедренную вену лабораторных животных. Данный способ прост в исполнении, однако его важным недостатком является то, что он не позволяет оценить ключевые аспекты тромбообразования, в связи с чем эта модель не соответствует физиологическим условиям

формирования тромба и, как следствие, не подойдет для доклинической оценки антитромботических препаратов [29]. В то же время эта модель является весьма удобной для оценки эффективности новых методов диагностики ТЭЛА [30].

Хирургические модели ТЭЛА

Данный способ моделирования разработан отечественным ученым Самородовым А. В., и его принцип основан на временной окклюзии НПВ [Самородов А. В., Халиуллин Ф. А., Камилов Ф. Х., Хали-

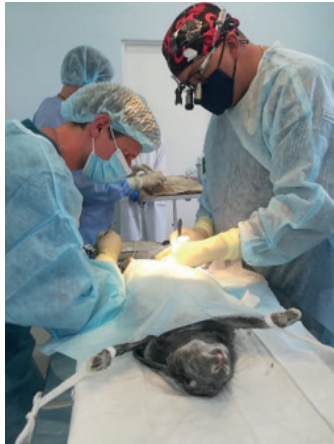


Рис. 1. Выделение бедренной вены.

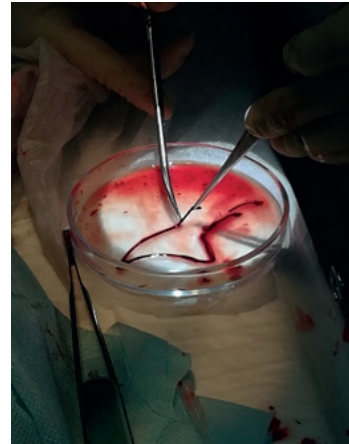


Рис. 2. Формирование сгустка.

мов А. Р. Способ моделирования тромбоэмболии легочной артерии у крыс (патент на изобретение). 2017]. В качестве объекта исследования были использованы крысы. Стандартная предоперационная подготовка включала бритье, обработку операционного поля и наркоз (внутрибрюшинное введение тиопентала натрия (50 мг/кг веса животного)). Оперативный доступ осуществлялся путем срединной лапаротомии. После чего на НПВ временно накладывалась клипса. Исследователи экспериментальным путем установили, что в зависимости от длительности наложения клипсы на НПВ возможно возникновение разных форм ТЭЛА: 1) если клипса накладывается на 0-1,4 ч, то ТЭЛА маловероятна, либо она незначительна и развивается только на уровне мелких артерий; 2) если клипса на НПВ накладывается на 1,5-3,0 ч, то случается ТЭЛА на уровне сегментарных артерий; 3) при наложении клипсы на НПВ на срок 3,1-6,0 ч тромбоз развивается на уровне долевых артерий; 4) наложение клипсы на НПВ >6 ч приводит к организации и фиксации тромба к стенке вены и формированию формы ТЭЛА будет иметь непредсказуемый характер — от тромбоза мелких ветвей до массивной ТЭЛА [Самородов А. В., Халиуллин Ф. А., Камиллов Ф. Х., Халимов А. Р. Способ моделирования тромбоэмболии легочной артерии у крыс (патент на изобретение). 2017]. Недостаток данного хирургического способа — инвазивность и необходимость участия квалифицированного хирургического персонала, а ключевыми преимуществами являются высокая эффективность модели, соответствие частым клиническим ситуациям и возможность моделирования конкретной формы ТЭЛА в зависимости от поставленных целей и задач исследования.

Еще одна часто используемая хирургическая модель ТЭЛА была разработана Ji Y, et al. [31]. Ее принцип основан на наложении зажима на бедренную вену лабораторных животных для индуцирования формирования тромба, последующей его экстракции и введении в противоположную интактную

бедренную вену. Данная модель обладает рядом недостатков: инвазивность и необходимость участия квалифицированного хирурга, двухэтапное оперативное вмешательство, несоответствие основным физиологическим условиям, отсутствие возможности моделирования конкретной формы ТЭЛА в отличие от вышеописанной модели [Самородов А. В., Халиуллин Ф. А., Камиллов Ф. Х., Халимов А. Р. Способ моделирования тромбоэмболии легочной артерии у крыс (патент на изобретение). 2017].

В таблице представлены вышеописанные экспериментальные модели ТЭЛА с основными их принципами, преимуществами и недостатками (табл. 1).

Собственные результаты

Также нам хотелось бы привести собственный опыт создания искусственной модели ТЭЛА на животных. Целью нашего исследования являлось изучение маркеров ТЭЛА в условиях искусственной модели ТЭЛА на животных. Задачами исследования были: создать искусственную модель ТЭЛА на животных; изучить концентрацию сердечного тропонина I, мозгового натрийуретического пептида, показатели общего и биохимического анализа крови у кроликов с острой ТЭЛА.

Эксперимент выполнен на лабораторных животных — 6 кроликов породы Шиншилла весом от 2,0 до 3,0 кг в возрасте 3-6 мес. Исследование проводилось на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Самарского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кроликам внутримышечно вводился золетил и рометар для общей анестезии. Затем кроликов иммобилизовали на операционном столе в положении лежа на спине, по срединной линии бедра с медиальной стороны выполняли разрез 10 см, выделяли бедренную вену (рис. 1). Из бедренной вены была взята кровь, сформирован сгусток на водяной бане (рис. 2). Сгусток вводился через иглу в систему НПВ. Производилась



Рис. 3. Ствол и бифуркация легочной артерии с тромбом.



Рис. 4. Легкое с тромбами.



Рис. 5. Тромб в левой легочной артерии.

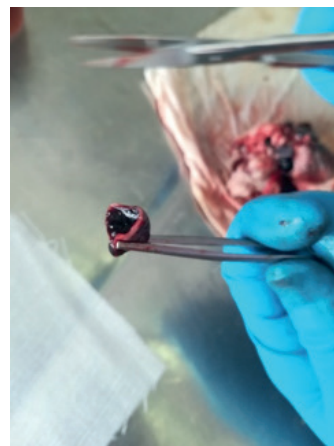


Рис. 6. Тромб в правом предсердии.

Таблица 2

Динамика N-концевого фрагмента промозгового натрийуретического пептида

	До эксперимента, пг/мл	Через 1 ч, пг/мл	Перед вскрытием, пг/мл
Кролик 1	1,62	2,50	3,10
Кролик 2	<0	7,4	9,50
Кролик 3	<0	<0	7,35
Кролик 4	1,11	1,02	17,2
Кролик 5	0,85	0,30	1,11
Кролик 6	0,61	0,78	0,90
M±SD	1,04±0,43	2,4±2,91	6,53±6,26

эвтаназия и осуществлялся забор комплекса сердце-легкие для дальнейшего исследования. Взятие крови для анализа осуществлялось трёхкратно: до эксперимента, через 1 ч, перед выведением животного из эксперимента. В ходе патологоанатомического исследования были обнаружены тромбы в стволе, бифуркации и ветвях легочной артерии, а также в правом предсердии (рис. 3-6).

Важными критериями, подтверждающими успешность моделирования ТЭЛА в нашем случае, явля-

лись: подтверждение ТЭЛА патологоанатомически, повышение уровня биомаркеров: тропонина, N-концевого фрагмента промозгового натрийуретического пептида, D-димера после введения тромба (табл. 2-4). Мы наблюдали повышение показателей: количества тромбоцитов, уровня креатинина, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, снижение показателей гемоглобина. В пилотном исследовании была создана модель ТЭЛА для изучения патогенеза и новых возможностей лечения данного

Таблица 3

Динамика D-димера

	До эксперимента, мг/л	Через 1 ч, мг/л	Перед вскрытием, мг/л
Кролик 1	0,17	0,69	0,75
Кролик 2	0,13	0,15	0,15
Кролик 3	0,11	0,16	0,17
Кролик 4	0,15	0,17	0,49
Кролик 5	0,79	0,89	0,90
Кролик 6	0,45	0,60	0,78
M±SD	0,30±0,27	0,44±0,32	0,54±0,32

Таблица 4

Динамика тропонина

	До эксперимента, нг/мл	Через 1 ч, нг/мл	Перед вскрытием, нг/мл
Кролик 1	0	0,001	0,002
Кролик 2	0,002	0,001	0,256
Кролик 3	0,001	0	0,041
Кролик 4	0,003	0,005	0,545
Кролик 5	0,005	0,007	0,257
Кролик 6	0,296	0,324	0,456
M±SD	0,05±0,12	0,06±0,13	0,26±0,22

заболевания, однако требуется дальнейшее продолжение экспериментальных исследований на большей группе животных для подтверждения её эффективности.

Заключение

ТЭЛА является одним из самых распространенных острых ССЗ с высоким уровнем смертности. Для изучения патофизиологии, оценки эффективности новых методов диагностики и доклинической оценки эффективности лекарственных препаратов широко используются различные способы экспериментального моделирования ТЭЛА, каждый из которых обладает рядом преимуществ и недостатков. Однако до настоящего времени единого оптимального способа моделирования ТЭЛА не разработано.

Необходимо проведение дальнейших исследований по изучению и поиску новых перспективных

биомаркеров для раннего выявления ТЭЛА, патофизиологических механизмов и новых мишеней для терапевтического воздействия.

Благодарности. Авторы выражают признательность заведующей лабораторией экспериментальной морфологии Института экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета Нефёдовой И. Ф., заведующей лабораторией Самарского областного клинического кардиологического диспансера им. В. П. Полякова, к.м.н. Ушаковой Е. В., врачу-кардиологу Грабовому Д. А., клиническому ординатору Гришину С. А. за оказанную помощь при проведении данного исследования и написании настоящей статьи.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Bokarev IN, Popova LV. Venous thromboembolism and pulmonary embolism. M: MIA, 2013; 512 p. (In Russ.) Бокарев И.Н., Попова Л.В. Венозный тромбоземболизм и тромбоземболии легочной артерии. М: МИА, 2013. 512 с.
2. Chaullin AM, Karslyan LS, Bazyuk EV, et al. Clinical and Diagnostic Value of Cardiac Markers in Human Biological Fluids. *Kardiologija*. 2019;59(11):66-75. (In Russ.) Чаулин А.М., Карслян Л.С., Григорьева Е.В. и др. Клинико-диагностическая ценность кардиомаркеров в биологических жидкостях человека. *Кардиология*. 2019;59(11):66-75. doi:10.18087/cardio.2019.11.n414.
3. Beckman MG, Hooper WC, Critchley SE, Ortel TL. Venous thromboembolism: a public health concern. *Am J Prev Med*. 2010;38(4 Suppl):S495-S501. doi:10.1016/j.amepre.2009.12.017.
4. Schiff GD, Hasan O, Kim S, et al. Diagnostic error in medicine: analysis of 583 physician-reported errors. *Arch Intern Med*. 2009;169(20):1881-7. doi:10.1001/archinternmed.2009.333.
5. Weinberg AW, Jaff MR, Tapson VF. Pulmonary embolism: an international crisis. *Endovascular Today*. 2019;3-4.
6. Ishaaya E, Tapson VF. Advances in the diagnosis of acute pulmonary embolism. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-44. doi:10.12688/f1000research.21347.1.
7. Sweet PH, Armstrong T, Chen J, et al. Fatal pulmonary embolism update: 10 years of autopsy experience at an academic medical center. *JRSM Short Rep*. 2013;4(9):2042533313489824. doi:10.1177/2042533313489824.
8. Bartholomew JR. Pulmonary Embolism in the Intensive Care Unit: Therapy in Subpopulations. *Crit Care Clin*. 2020;36(3):547-60. doi:10.1016/j.ccc.2020.03.001.
9. Kaplovitch E, Shaw JR, Douketis J. Thrombolysis in Pulmonary Embolism: An Evidence-Based Approach to Treating Life-Threatening Pulmonary Emboli. *Crit Care Clin*. 2020;36(3):465-80. doi:10.1016/j.ccc.2020.02.004.
10. Dobrovolskiy AB, Titaeva EV. Thrombin formation and its functions in the hemostasis system. *Atherothrombosis*. 2013;(1):66-72. (In Russ.) Добровольский А.Б., Титаева Е.В.

- Образование тромбина и его функции в системе гемостаза. Атеротромбоз. 2013;(1):66-72.
11. Napalkova OS, Emanuel LV, Lapin SV, et al. Thrombin as a key enzyme of hemostasis and its role in atherosclerosis and inflammation. *Medical alphabet*. 2015;11(3):42-5. (In Russ.) Напалкова О.С., Эмануэль Л.В., Лапин С.В. и др. Тромбин как ключевой фермент гемостаза и его роль в атеросклерозе и воспалении. *Медицинский алфавит*. 2015;11(3):42-5.
 12. Zolovkina AG, Mamaev AN, Momot AP. Determination of fibrinogen concentration in clinical practice. *Polyclinic*. 2012;(4-3):16-7. (In Russ.) Золовкина А.Г., Мамаев А.Н., Момот А.П. Определение концентрации фибриногена в клинической практике. *Поликлиника*. 2012;(4-3):16-7.
 13. Kozlovskii VI, Kovtun OM, Serouhova OP, et al. Research methods and clinical significance of platelet aggregation. Focus on spontaneous aggregation. *Bulletin of the Vitebsk State Medical University*. 2013;4(12):79-91. (In Russ.) Козловский В.И., Ковтун О.М., Сероухова О.П. и др. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2013;4(12):79-91.
 14. Temme S, Grapentin C, Quast C, et al. Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by 19F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions. *Circulation*. 2015;131(16):1405-14. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010962.
 15. Brandt M, Giokoglu E, Garlapati V, et al. Pulmonary Arterial Hypertension and Endothelial Dysfunction Is Linked to NADPH Oxidase-Derived Superoxide Formation in Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism in Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1860513. doi:10.1155/2018/1860513.
 16. Heidt T, Ehrismann S, Hövener JB, et al. Molecular Imaging of Activated Platelets Allows the Detection of Pulmonary Embolism with Magnetic Resonance Imaging. *Sci Rep*. 2016;6:25044. doi:10.1038/srep25044.
 17. Kutafina NV, Zavalishina SY. Mechanisms of functioning of vascular-platelet hemostasis. *Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Series: ecology and life safety*. 2012;1:30-7. Кутафина Н.В., Завалишина С.Ю. Механизмы функционирования сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. *Вестник российского университета дружбы народов. Серия: экология и безопасность жизнедеятельности*. 2012;1:30-7.
 18. Kozlova SN, Golubev AV, Krylova US, et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in patients with coronary artery disease and concomitant anxiety and depression. "Arterial'naya Gipertenziya" ("Arterial Hypertension"). 2009;15(2):181-4. (In Russ.) Козлова С.Н., Голубев А.В., Крылова Ю.С. и др. Аденозиндифосфат-индуцированная агрегация тромбоцитов у больных ишемической болезнью сердца с коморбидными тревожно-депрессивными расстройствами. *Артериальная гипертензия*. 2009;15(2):181-4.
 19. Przygodzki T, Talar M, Blazejczyk A, et al. Quantification of the Blood Platelet Reactivity in the ADP-Induced Model of Non-Lethal Pulmonary Thromboembolism in Mice with the Use of Laser Doppler Flowmetry [published correction appears in *PLoS One*. 2016;11(2):e0149829]. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146346. doi:10.1371/journal.pone.0146346.
 20. Tymvios C, Jones S, Moore C, et al. Real-time measurement of non-lethal platelet thromboembolic responses in the anaesthetized mouse. *Thromb Haemost*. 2008;99(2):435-40. doi:10.1160/TH07-07-0479.
 21. Béguin S, Lindhout T, Hemker HC. The effect of trace amounts of tissue factor on thrombin generation in platelet rich plasma, its inhibition by heparin. *Thromb Haemost*. 1989;61(1):25-9.
 22. Léon C, Freund M, Ravanat C, et al. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation*. 2001;103(5):718-23. doi:10.1161/01.cir.103.5.718.
 23. Smyth SS, Reis ED, Väänänen H, et al. Variable protection of beta 3-integrin--deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood*. 2001;98(4):1055-62. doi:10.1182/blood.v98.4.1055.
 24. Weiss EJ, Hamilton JR, Lease KE, Coughlin SR. Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood*. 2002;100(9):3240-4. doi:10.1182/blood-2002-05-1470.
 25. Page MJ, Lourenço AL, David T, et al. Non-invasive imaging and cellular tracking of pulmonary emboli by near-infrared fluorescence and positron-emission tomography. *Nat Commun*. 2015;6:8448. doi:10.1038/ncomms9448.
 26. Banno F, Kita T, Fernández JA, et al. Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying a protein S K196E mutation. *Blood*. 2015;126(19):2247-53. doi:10.1182/blood-2015-06-653162.
 27. Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood*. 2010;116(20):4353-9.
 28. Lockyer S, Okuyama K, Begum S, et al. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb Res*. 2006;118(3):371-80. doi:10.1016/j.thromres.2005.08.001.
 29. Zolotnickaya VP. Modeling of pulmonary embolism. SPb. 1995;310. p. 22. (In Russ.) Золотницкая В.П. Моделирование тромбоза легочной артерии (обзор литературы и собственный опыт). СПб., 1995. 22 с.
 30. Amosov VI, Zolotnickaya VP, Vlasov TD, Litvinov AP. Experimental modeling of pulmonary embolism. Regional blood circulation and microcirculation. 2003;3(9):54-7. (In Russ.) Амосов В.И., Золотницкая В.П., Власов Т.Д., Литвинов А.П. Экспериментальное моделирование тромбоза легочной артерии. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2003;3(9):54-7.
 31. Ji YQ, Zhang ZH, Lu WX, et al. Establishment of rat model of venous thromboembolism. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009;89(4):271-5.