

УДК [616.24-008.331.1-005.7-02:612.392.61]-092.4

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-1-86-95

А. А. КАРПОВ¹, Н. А. АНИКИН², Д. Е. ЧЕРЕПАНОВ¹,
А. М. МИХАЙЛОВА², М. В. КРАСНОВА³,
С. С. СМЕРНОВ², Н. С. БУНЕНКОВ², С. Г. ЧЕФУ²,
Д. Ю. ИВКИН³, О. М. МОИСЕЕВА¹, М. М. ГАЛАГУДЗА^{1,2}

Модель хронической тромбоэмболической легочной гипертензии у крыс, вызванная повторным внутривенным введением биodeградируемых микросфер из альгината натрия

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А
e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Статья поступила в редакцию 31.01.19; принята к печати 08.02.19

Резюме

Введение. Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ) – одно из наиболее тяжелых осложнений тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА), характеризующееся неблагоприятным прогнозом и недостаточной эффективностью стандартных подходов к лечению. Небольшое количество репрезентативных моделей ХТЭЛГ затрудняет проведение доклинических исследований перспективных фармакологических субстанций.

Цель – разработка и валидация экспериментальной модели ХТЭЛГ у крыс путем эмболизации дистальных ветвей легочной артерии биodeградируемыми микросферами.

Материал и методы. Исследование проводилось на самцах крыс стока Wistar. В качестве эмболизирующих частиц использовали биodeградируемые микросферы (МС) на основе альгината натрия и аутологичные тромбы (АТ). Животные были разделены на группы: контроль – в хвостовую вену 4 раза с интервалом в 8 дней вводился физиологический раствор; АТ – по вышеописанному протоколу вводилось 50 мкл АТ; МС вводились внутривенно в объеме 50 мкл МС по двум протоколам: МС4 – 4 раза с интервалом 8 дней; МС8 – 8 раз с интервалом 4 дня. Через 2 и 6 недель после последнего введения проводилось гистологическое исследование легких; через 6 недель – эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ), катетеризация правого желудочка (ПЖ) с измерением систолического давления в ПЖ (СДПЖ), тредмил тест, оценка уровня эндотелина-1 в плазме крови иммуноферментным методом.

Результаты. В ходе моделирования выживаемость в группе МС8 составила 50 %. В остальных группах потерь животных в ходе эксперимента не было. По данным тредмил-теста через 6 недель после моделирования ТЭЛА, толерантность к физической нагрузке была значимо снижена в группах МС4 и МС8 по сравнению с контрольной группой. Данные ЭХО-КГ свидетельствуют о значимом увеличении диаметра легочного ствола и выносящего тракта ПЖ в группе МС8 по сравнению с контролем и АТ. Значимое повышение СДПЖ и уровня эндотелина-1 по сравнению с контролем отмечалось только в группе МС8. Через 6 недель индекс гипертрофии стенки ветвей легочной артерии в группах МС4 и МС8 был значимо выше по сравнению с группами контроля и АТ.

Выводы. На основе применения МС, вводимых по протоколу МС8, создана новая репрезентативная модель ХТЭЛГ, которая может быть использована для тестирования перспективных фармакологических субстанций.

Ключевые слова: тромбоэмболия легочной артерии, хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия, альгинат натрия, микросферы, экспериментальная модель, крыса

Для цитирования: Карпов А. А., Аникин Н. А., Черепанов Д. Е., Михайлова А. М., Краснова М. В., Смирнов С. С., Буненков Н. С., Чефу С. Г., Ивкин Д. Ю., Моисеева О. М., Галагудза М. М. Модель хронической тромбоэмболической легочной гипертензии у крыс, вызванная повторным внутривенным введением биodeградируемых микросфер из альгината натрия. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018;18(1):86–95.
Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-1-86-95

A. A. KARPOV¹, N. A. ANIKIN², D. E. CHEREPANOV¹,
A. M. MIHAILOVA², M. V. KRASNOVA³,
S. S. SMIRNOV², N. S. BUNENKOV², S. G. CHEFU²,
D. Y. IVKIN³, O. M. MOISEEVA¹, M. M. GALAGUDZA^{1,2}

Model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in rats, caused by repeated intravenous administration of biodegradable microspheres from sodium alginate

¹ Almazov National Medical Research Centre, Russia, Saint-Petersburg
Russia, 197341, Russia, Saint-Petersburg, Akkuratova street, 2

² Academician I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Russia, Saint-Petersburg
197022, Russia, Saint-Petersburg, L'va Tolstogo street, 6-8

³ Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Russia, Saint-Petersburg
197376, Russia, Saint-Petersburg, Professor Popov street, 14
e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Received 31.01.19; accepted 08.02.19

Summary

Introduction. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is one of the most severe complications of pulmonary embolism (PE), characterized by poor prognosis and insufficient effectiveness of standard treatment approaches. A small number of representative models of CTEPH make it difficult to conduct preclinical studies of promising pharmacological substances.

Objective – development and validation of the experimental model of CTEPH in rats by embolization of the distal branches of the pulmonary artery with biodegradable microspheres.

Material and methods. Male Wistar rats were used for the experiments. Biodegradable microspheres (MS) based on sodium alginate and autologous blood clots (AT) were used as embolizing particles. The animals were divided into groups: control: saline solution was injected 4 times with an interval of 8 days into the tail vein; AT: according to the above protocol, 50 µL of AT was injected; MS was administered intravenously in a volume of 50 µL of MS according to two protocols: MS4: 4 times with an interval of 8 days; MS8: 8 times with an interval of 4 days. After 2 and 6 weeks after the last injection, a histological examination of the lungs was performed; after 6 weeks: echocardiographic study (TTE), right ventricular catheterization (RV) with measurement of right ventricular systolic pressure (RVSP), treadmill test, assessment of serum endothelin-1 levels by the immunoassay method.

Results. During the experiments, the survival rate in the MS8 group was 50 %. In the other groups, there were no animal losses. According to the treadmill test 6 weeks after the modeling of PE, exercise tolerance was significantly reduced in the MC4 and MC8 groups compared with the control group. TTE data indicate a significant increase in the diameter of the pulmonary trunk and the right ventricular outflow tract in the MC8 compared with the control and AT. There were significant increase in RVSP and the level of endothelin-1 compared with the control only in the MS8. After 6 weeks, the index of hypertrophy of vessel wall of the pulmonary artery in the MC4 and MC8 was significantly higher compared with the control and AT groups.

Conclusion. Based on the use of MS, administered under the MS 8 protocol, a new representative model of CTEPH has been created, which can be used to test promising pharmacological substances.

Keywords: pulmonary embolism, chronic thromboembolic pulmonary hypertension, sodium alginate, microspheres, experimental model, rat

For citation: Karpov A. A., Anikin N. A., Cherepanov D. E., Mihailova A. M., Krasnova M. V., Smirnov S. S., Bunenkov N. S., Chefu S. G., Ivkin D. Y., Moiseeva O. M., Galagudza M. M. Model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in rats, caused by repeated intravenous administration of biodegradable microspheres from sodium alginate. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2019;18(1):86–95. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-1-86-95

Введение

Тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) по распространенности занимает 3-е место среди всех сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Если учесть, что риск венозных тромбоэмболий у пациентов моложе 45 лет варьирует в диапазоне 1,0–1,5 на 1000 человек в год и после 40 лет с увеличением возраста на каждые 10 лет возрастает практически в 2 раза, то лечение этой категории больных ложится тяжелым бременем на систему здравоохранения [2]. У 4–9 %

пациентов с острой ТЭЛА течение заболевания осложняется развитием хронической тромбоэмболической легочной гипертензии (ХТЭЛГ), ассоциированной с крайне высокой летальностью [3]. Продemonстрировано, что 10-летняя выживаемость больных, перенесших ТЭЛА, при среднем давлении в легочной артерии, равном 31–40 мм рт. ст., составляет 50 %; а при уровне 41–50 мм рт. ст. и более 50 мм рт. ст. – 20 и 5 % соответственно [4]. В последние годы активно обсуждается такая новая нозологическая форма

посттромбоэмболическая синдрома, как хроническая тромбоэмболическая болезнь, при которой имеются симптомы и морфологические изменения, характерные для ХТЭЛГ, но цифры среднего давления в легочной артерии не превышают 25 мм рт. ст. Однако распространенность и прогностическая значимость выявления этого варианта посттромбоэмболического синдрома нуждаются в дальнейшем изучении [5].

Несмотря на высокую эффективность тромбэндартерэктомии легочной артерии при проксимальном типе ХТЭЛГ, большинство современных терапевтических подходов нуждаются в совершенствовании [6]. Вместе с тем доклиническое исследование новых фармакологических субстанций затруднено в связи с отсутствием экспериментальной модели, в достаточной степени воспроизводящей патофизиологические механизмы развития ХТЭЛГ и возникающие при ХТЭЛГ структурные изменения сосудистого русла легких.

В настоящее время для моделирования ТЭЛА и ХТЭЛГ у грызунов наиболее часто в качестве эмболизирующих частиц используются нативные тромбы, вводимые в сочетании с ингибиторами системы фибринолиза, например, транексамовой кислотой [7–9], а также полистироловые микросферы [10–12]. Однако применение моделей с нативными тромбами затруднено как технологическими сложностями, а именно – необходимостью формирования аутологичных тромбоэмболов для каждого животного, так и нестабильностью повышения давления в легочной артерии [9]. Введение полистироловых микросфер не в полной мере отражает патогенез ХТЭЛГ из-за абсолютной нерастворимости эмболов.

Цель работы – разработка и валидация экспериментальной модели ХТЭЛГ у крыс путем эмболизации дистальных ветвей легочной артерии биodeградируемыми микросферами.

Материал и методы исследования

Все эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального Института Здоровья, 8-е изд., 2011 г.). Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО «СПХФУ» Минздрава России.

Животные

В работе использованы крысы-самцы стока Wistar конвенциональной категории массой (225±28) г. Все животные содержались в стандартизированных условиях, имели доступ к полнорационному гранулированному корму и воде *ad libitum*.

Эмболизирующие частицы

В качестве эмболизирующих частиц в исследовании были использованы аутологичные тромбы и биodeградируемые микросферы из альгината натрия.

Для изготовления аутологичных тромбов у всех животных из бедренной вены забирали 1 мл крови. Образовавшийся кровяной сгусток подвергали лиофильной сушке с помощью установки FreeZone

2.5 Liter-50C (Labconco, США). Полученная сухая тромботическая масса измельчалась и с помощью просеивания через систему сит различного диаметра (74 и 220 мкм) отбиралась фракция тромбов размером (135±64) мкм. Все манипуляции выполнялись в асептических условиях.

Биodeградируемые микросферы (МС) получали из ультрачистого альгината натрия (*Sigma-Aldrich*, США) с помощью электростатической инкапсуляции И-390 (*Buchi*, Швейцария). В качестве стабилизирующего агента использовался 2 %-й раствор хлорида бария. Размер получаемых микросфер составил (180±28) мкм. Все микросферы производились в стерильных условиях. Скорость биodeградации оценивали по методике, описанной ранее [13]: стабильность полученных микросфер оценивали в динамике при инкубации их в фосфатном буфере на 1-й, 14-й, 28-й и 42-й день. Для оценки использовались 20 микросфер из каждой временной точки. Размер, четкость края и визуальная плотность определяли с помощью светового микроскопа Axiostar plus (*Carl Zeiss*, Германия) при увеличении ×40 и ×100.

Протокол эксперимента

Для воспроизведения ТЭЛА все животные были распределены на 4 группы:

- 1) контроль (n=8): в хвостовую вену 4 раза с интервалом в 8 дней вводился 1 мл 0,9 %-го раствора NaCl;
- 2) аутологичные тромбы (АТ) (n=8): по вышеописанному протоколу вводилось 50 мкл АТ, суспензированных в 1 мл 0,9 %-го раствора NaCl;
- 3) МС4 (n=12): 50 мкл МС, суспензированных в 1 мл физиологического раствора, вводились внутривенно 4 раза с интервалом 8 дней;
- 4) МС8 (n=14): 50 мкл МС, суспензированных в 1 мл физиологического раствора, вводились внутривенно 8 раз с интервалом 4 дня.

Через 6 недель после последнего внутривенного введения частиц выполнялся тредмил-тест для определения толерантности к физической нагрузке.

Для оценки морфофункциональных изменений в малом круге кровообращения в этой же точке производили эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ), катетеризацию сердца с измерением систолического давления в правом желудочке (ПЖ), оценку уровня эндотелина в плазме крови. Гистологическое исследование легких выполняли в двух временных точках: 2 и 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц.

Тредмил-тест

Для выполнения пробы с физической нагрузкой использовалась установка Treadmill LE8710 (*Harvard Apparatus*, США). За сутки до теста все крысы проходили обучение условиям тестирования. Тренировочного эффекта в рамках обучения не происходило. В ходе тестирования использовался протокол с постепенным наращиванием скорости вращения ленты тредмила, каждые 30 с на 5 м/мин, до достижения скорости 40 м/мин. [14]. Стимуляция в виде электроимпульса постоянного тока проводилась с силой тока 1,2 А, автоматически при касании животным края

беговой ленты. В ходе тестирования оценивалась дистанция, которую пробежало животное за время тестирования (м). Точкой окончания теста для каждого животного была невозможность продолжать бег.

Эхокардиографическое исследование

Для выполнения исследования использовалась ультразвуковая установка высокого разрешения MyLab One Touch SL 3116 (Esaote; Италия) с со- судистым линейным датчиком (частота – 13 МГц, глубина сканирования – 2 см). Перед проведением ЭХО-КГ животных наркотизировали внутривенным введением тиопентала натрия в дозе 4 мг/кг и размещали на подогреваемом столике в положении на спине. Основными параметрами, оцениваемыми при исследовании, были: 1) размер легочного ствола (ЛС, мм); 2) размер выносящего тракта правого желудочка (ПЖ) (ВТПЖ, мм); 3) пиковая скорость потока в легочном стволе (V_{\max} ЛС, м/с); 4) пиковая скорость потока в выносящем тракте ПЖ (V_{\max} ВТПЖ, м/с); 5) систолическая экскурсия плоскости трикуспидального кольца (ТАРСЕ, мм); 6) фракция укорочения левого желудочка (ФУ, %).

Катетеризация сердца с манометрией ПЖ

Перед проведением катетеризации сердца животных наркотизировали путем внутривенного введения тиопентала натрия в дозе 4 мг/кг, искусственная вентиляция легких осуществлялась через интубацию трахеи с помощью аппарата искусственной вентиляции легких SAR – 830/AP (CWE Inc., США). Использовали следующие параметры искусственной вентиляции легких: частота дыхания – 60/мин, дыхательный объем – 3 мл/100 г массы тела. Выполнялась торакотомия. Манометрия правого желудочка производилась через пункцию верхушки сердца с последующей регистрацией систолического давления в ПЖ (СДПЖ, мм рт. ст.) с помощью программно-аппаратного комплекса PhysExp Mini Invasive (ООО «Кардиопротект», Россия).

Наливка сосудистого русла легких с последующим гистологическим исследованием

Учитывая трудность дифференцировки микрососудов из русла артерий малого круга кровообращения и бронхиальных артерий большого круга кровообращения, при гистологическом исследовании перед забором органов производилась наливка сосудистого русла легких желатин-акриловой смесью с красителем.

Остановка кровообращения у наркотизированной крысы производилась 10 %-м раствором хлорида калия, введенным внутривенно. Сразу после остановки сердца в фазу диастолы разогретая до 40 °С смесь 5 %-го раствора желатина и акрилового красителя в соотношении 5:2 двух разных цветов одновременно вводилась в сонную артерию и правый желудочек под давлением 40–50 мм рт. ст. Фиксация красителя в сосудистом русле производилась с помощью 10 %-го забуференного формалина.

Для гистологической оценки использовалась нижняя доля правого легкого. Доля разделялась на

4 поперечных уровня анализа. Срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, Pico Sirius Red (abcam, США) для морфологического исследования. Исследование препаратов проводилось с помощью микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при увеличении от $\times 5$ до $\times 40$. Результаты микроскопии оценивали с помощью программного обеспечения «ВидеоТест-Морфология» («ВидеоТест», СПб.). В качестве критерия оценки ремоделирования сегментарных и субсегментарных ветвей легочной артерии использовался индекс гипертрофии, представляющий собой отношение толщины сосудистой стенки к внешнему диаметру сосуда в процентах.

Иммуноферментный анализ содержания эндотелина-1 в крови

Анализ уровня эндотелина-1 в плазме крови производился через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц. Для оценки использовался набор для ИФА Endothelin 1 ELISA Kit (Biomedica, Австрия). Анализ полученных результатов производился с помощью спектрофотометра Model 680 (Bio-Rad, США).

Статистический анализ

Анализ данных производился с помощью статистического пакета «Statistica 7.0» (StatSoft, США). Первичный анализ различий данных в опытных группах производился с помощью многомерного непараметрического критерия Краскела – Уоллиса (Nonparametric One-way ANOVA), значения $p < 0,05$ рассматривали в качестве значимых. Последующий анализ различий в парах выполнялся с помощью метода множественных сравнений по критерию Краскела – Уоллиса для показателей со статистически значимой разницей по данным многомерного анализа. Значения $p < 0,05$ рассматривали в качестве значимых. Данные представлены в виде «среднее \pm стандартное отклонение».

Результаты исследования

Оценка стабильности микросфер.

Анализ стабильности микросфер в фосфатном буфере показал, что легкое набухание происходило к 14-у дню наблюдения, полное разрушения большинства МС – к 24-му дню. К 42-му дню фиксировались только следовые аморфные структуры измененной геометрии.

Выживаемость животных

В ходе моделирования выживаемость в группе МС8 составила 50 % (7 крыс). Во всех случаях гибели животных причиной смерти была острая правожелудочковая недостаточность, наступающая в пределах 1 ч после введения микросфер. В остальных группах потерь животных в ходе эксперимента не было.

Тредмил-тест

Через 6 недель, по данным тредмил-теста, дистанция, пробегаемая животными, была значительно меньше в группах МС4 и МС8 по сравнению с

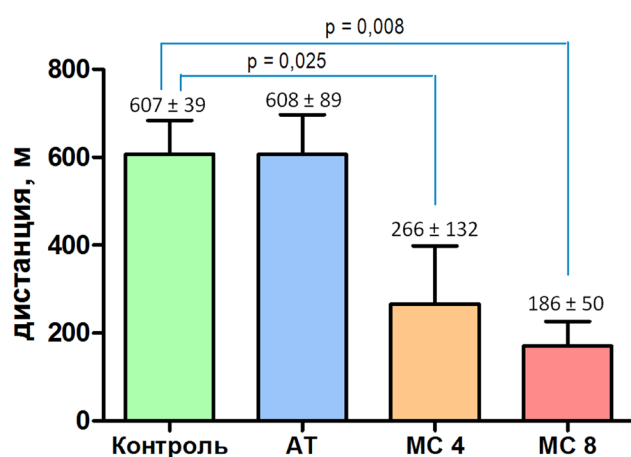


Рис. 1. Оценка толерантности к физической нагрузке по данным тредмил-теста через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц

Fig. 1. Evaluation of exercise tolerance according to the treadmill test in 6 weeks after the last injection of embolization particles

контрольной группой ($p=0,025$ и $p=0,008$ соответственно). Различия между группами МС4 и МС8 были незначимыми. Значимых различий в толерантности к физической нагрузке между применением АТ и группой контроля также выявлено не было (рис. 1).

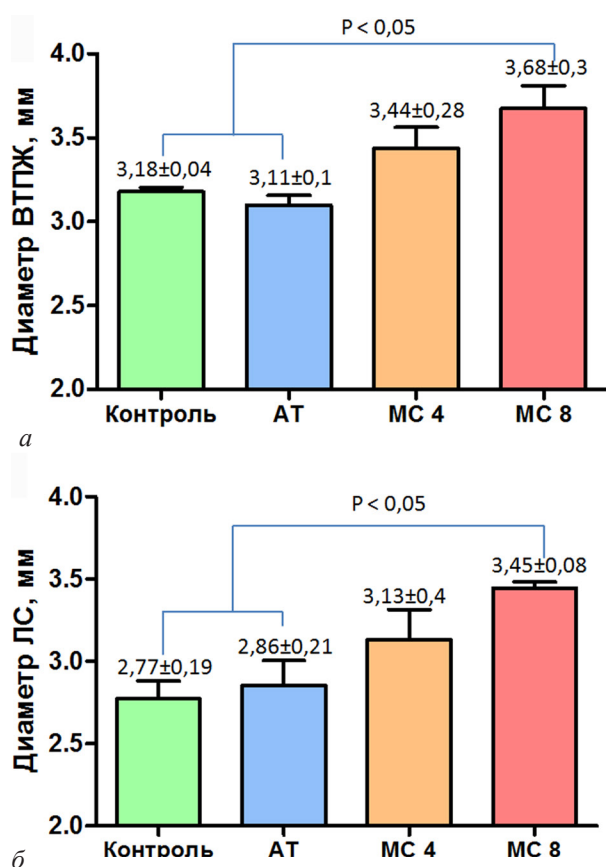


Рис. 2. Оценка ремоделирования выносящего тракта правого желудочка и легочного ствола по данным ЭХО-КГ через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц:

а – диаметр выносящего тракта ПЖ (ВТПЖ) (мм); б – диаметр легочного ствола (ЛС) (мм); в – репрезентативное изображение сердца (В-режим) животного из группы МС 8, сфокусированное на уровне ВТПЖ и ЛС, в короткой парастернальной позиции

Fig. 2. Assessment of remodeling of the right ventricle outflow tract (RVOT) and pulmonary trunk according to the echocardiography in 6 weeks after the last injection of embolization particles:

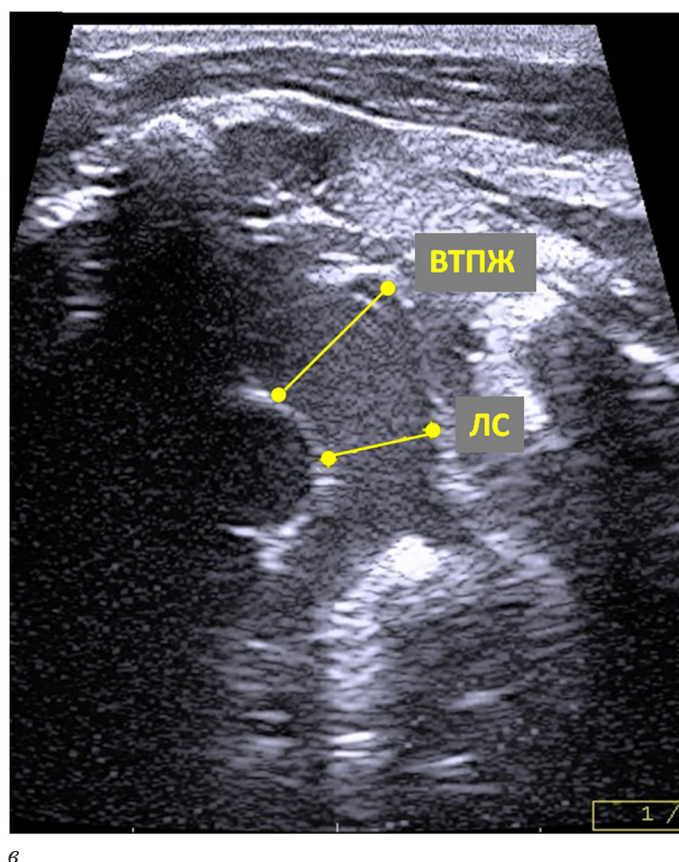
а – right ventricle outflow tract diameter (ВТПЖ) (mm); б – diameter of the pulmonary trunk (ЛС) (mm); в – the representative image of an animal heart (B-mode) from the MC 8 group, focused on ВТПЖ and ЛС level, using the parasternal short axis view

Эхокардиографическое исследование

Данные ЭХО-КГ свидетельствуют о значимом, по сравнению с контролем и АТ, увеличении диаметров ВТПЖ и ЛС в группе МС8 ($p<0,05$ в обоих случаях). Значимых различий между МС4 и МС8 по этим параметрам достигнуто не было. Применение АТ не приводило к значимому изменению диаметра ВТПЖ и ЛС (рис. 2). По данным доплерографического исследования, максимальная скорость потока в ЛС (V_{\max} ЛС) была значимо меньше в группах МС4 и МС8 по сравнению с контролем и значимо не различалась между группами применения микросфер. Эти данные указывают на меньший градиент давления ПЖЛС и косвенно свидетельствуют о повышении давления в ЛС (рис. 3).

Систолическая функция ПЖ и ЛЖ, измеренная с помощью TAPSE и ФУ соответственно, во всех исследуемых группах оставалась в пределах нормы (рис. 4).

Систолическое давление в правом желудочке. Через 6 недель, по данным катетеризации ПЖ, уровень СДПЖ в группе контроля составил ($21,3 \pm 2,5$) мм рт. ст. СДПЖ в группе АТ значимо не отличалось от контроля и составляло ($21,2 \pm 3,6$) мм рт. ст. В группе МС4 отмечалась статистически незначимая тенденция к повышению



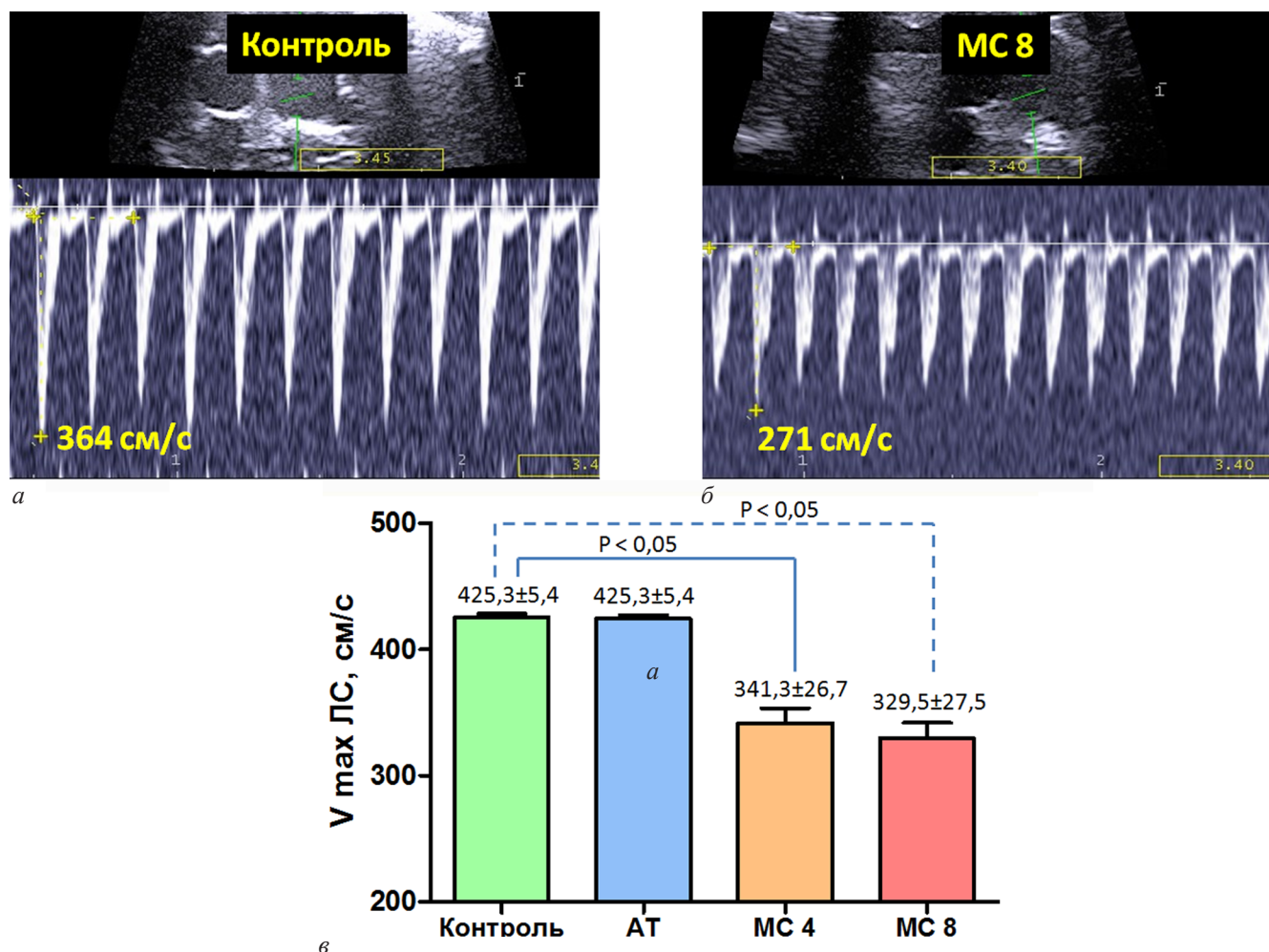


Рис. 3. Допплерографическое исследование потока в легочном стволе по данным ЭХО-КГ через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц:

a – репрезентативное изображение потока в ЛС у животного из контрольной группы; *б* – репрезентативное изображение потока в ЛС у животного из группы МС 8; *в* – максимальная скорость потока в ЛС в исследуемых группах

Fig. 3. Doppler study of the flow in the pulmonary trunk (ЛС) according to echocardiographic studies 6 weeks after the last injection of embolization particles:

a – the representative image of the flow in the pulmonary trunk of an animal from control group; *б* – the representative image of the flow in the pulmonary trunk of an animal from the group MC8; *в* – the maximal flow rate in the pulmonary trunk in studied groups

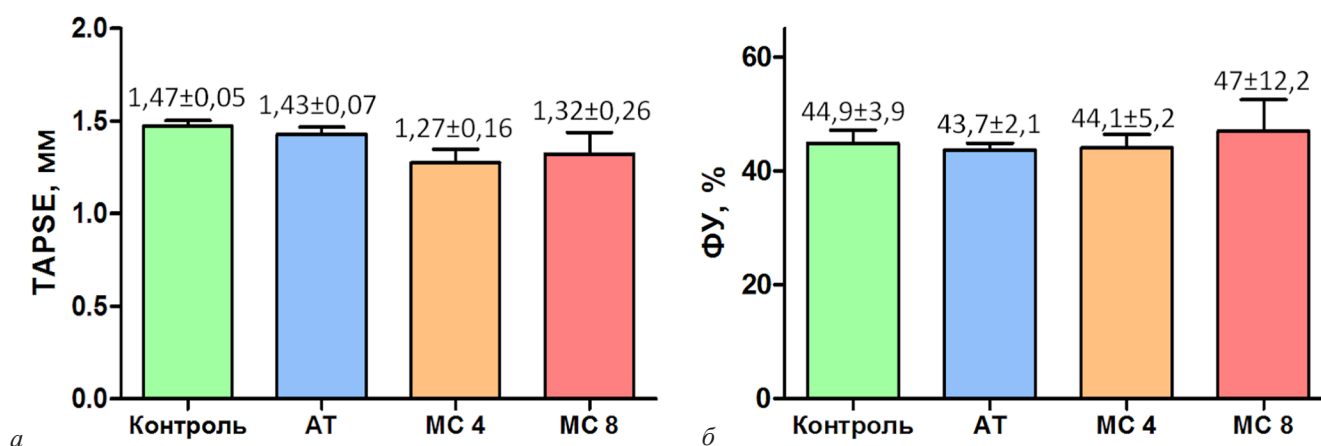


Рис. 4. Оценка систолической функции левого и правого желудочка с помощью ЭХО-КГ через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц:

a – систолическая функция ПЖ, оцененная с помощью систолической экскурсии плоскости трикуспидального кольца (TAPSE); *б* – систолическая функция ЛЖ, оцененная с помощью фракции укорочения (ФУ)

Fig. 4. Assessment of the systolic function of the left and right ventricle using echocardiography 6 weeks after the last injection of embolization particles:

a – RV systolic function, estimated using the tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE); *б* – LV systolic function, estimated using the shortening fraction (ФУ)

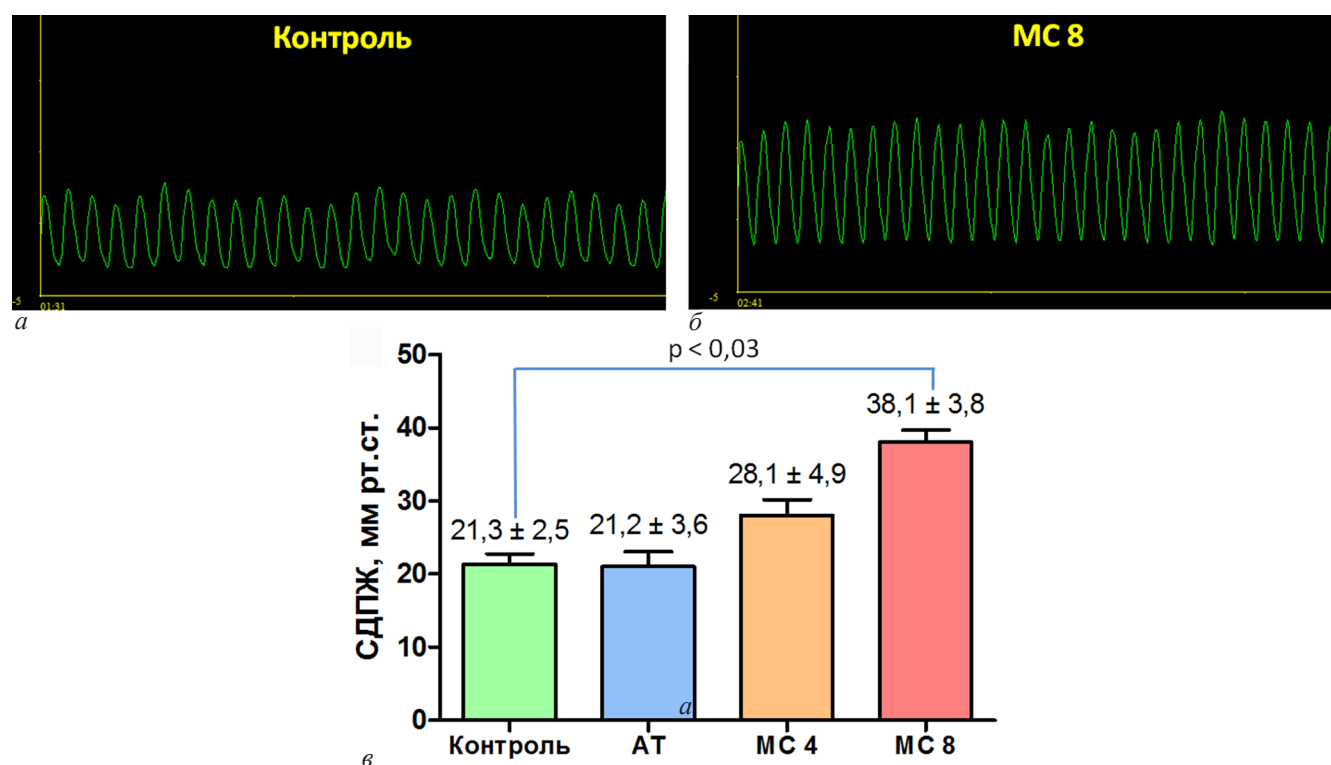


Рис. 5. Систолическое давление в правом желудочке по данным его катетеризации с прямой манометрией через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц: *а, б* – репрезентативные записи давления в ПЖ у животных из группы контроля и МС8 соответственно; *в* – уровень СДПЖ

Fig. 5. Right ventricle systolic pressure according to catheterization with direct manometry in 6 weeks after the last injection of embolization particles: *а, б* – representative records of the right ventricle systolic pressure in animals from the control group and MS8, respectively; *в* – right ventricle systolic pressure

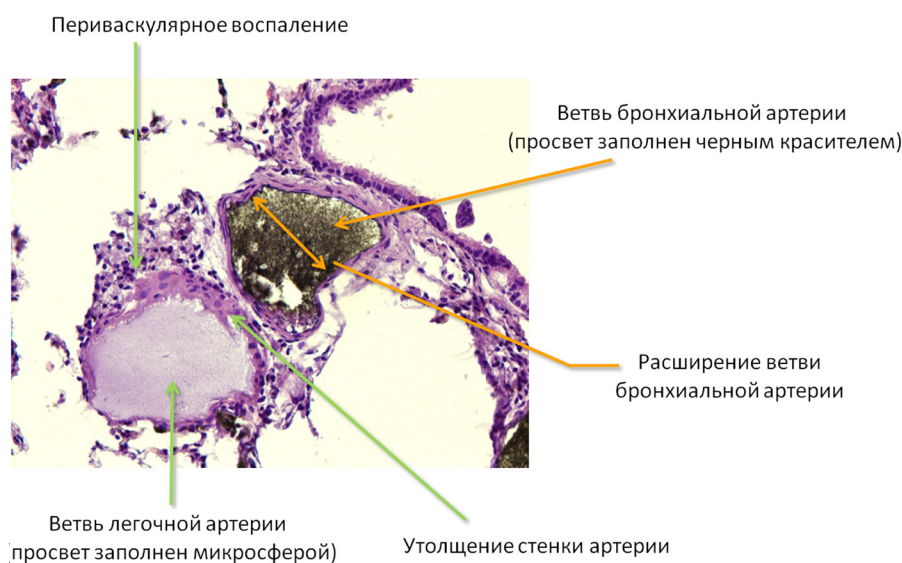


Рис. 6. Гистологические изменения в легких в группе применения микросфер через 2 недели после последнего введения эмболизирующих частиц

Fig. 6. Histological changes in the lungs in the group using the microspheres in 2 weeks after the last injection of embolization particles

СДПЖ ((28,1±4,9) мм рт. ст.). Значимое повышение СДПЖ по сравнению с контролем отмечалось только в группе МС8 ((38,1±3,8) мм рт. ст., $p < 0,03$ в сравнении с контролем) (рис. 5).

Гистологическое исследование сосудов легких

По данным гистологического исследования через 2 недели после последнего введения эмболизирующих частиц, в группах МС4 и МС8 отмечались

множественные эмболы в просвете ветвей легочной артерии, выраженное перифокальное воспаление, утолщение стенки ветвей легочной артерии. Кроме того, были выявлены изменения со стороны бронхиальных артерий: увеличение их диаметра, утолщение сосудистой стенки (рис. 6). В группе применения АТ существенных изменений по сравнению со здоровыми животными в структуре сосудистого русла легких выявлено не было.

Через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц индекс гипертрофии в группах МС4 и МС8 был значимо выше по сравнению с группой контроля ($p=0,04$ и $p=0,006$ соответственно). При использовании АТ через 6 недель значимых различий в индексе гипертрофии сосудистой стенки по сравнению с контрольной группой выявлено не было (рис. 7). По данным окраски Picro Sirius Red, в группах МС4 и МС8 отмечался значимо больший фиброз сосудистой стенки.

Иммуноферментный анализ содержания эндотелина-1 в крови

По данным иммуноферментного анализа, уровень эндотелина-1 в крови через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц в группе контроля составил $4,13 \pm 0,63$ фемтомоль/мл. Содержание эндотелина-1 в группах АТ и МС4 ($4,37 \pm 0,45$), ($4,99 \pm 0,74$) фемтомоль/мл соответственно) значимо не отличалось от группы контроля. Значимое повышение уровня эндотелина-1 отмечалось только в группе МС8 ($8,11 \pm 0,32$) фемтомоль/мл, $p < 0,05$ в сравнении с контролем).

Обсуждение

В результате проведенной работы создана новая модель ХТЭЛГ, характеризующаяся стойким повышением давления в легочной артерии, снижением толерантности к физической нагрузке, появлением гистологических изменений, характерных для ХТЭЛГ: редукцией сосудистого русла за счет закрытия субсегментарных/сегментарных/дистальных ветвей легочной артерии, гипертрофией и фиброзом сосудистой стенки, утолщением интимы ветвей легочной артерии.

Несмотря на высокую смертность в группе МС8, именно в этой группе отмечалось стойкое повышение систолического давления в легочной артерии через 6 недель после введения эмболизирующих частиц, что является обязательным критерием ХТЭЛГ. Кроме того, только в группе МС8 отмечалось значимое повышение уровня эндотелина-1, что указывает на возникновение значимой системной эндотелиальной дисфункции на фоне выраженных структурных изменений малого круга кровообращения.

С другой стороны, введение микросфер по протоколу группы МС4, несмотря на нестабильность повышения давления в легочной артерии, также приводило к характерным гистологическим и эхокардиографическим изменениям в малом круге кровообращения, снижению толерантности к физической нагрузке. Учитывая большую простоту моделирования и лучшую выживаемость животных по сравнению с группой МС8, этот протокол может быть использован при изучении различных вариантов посттромбоэмболического синдрома.

Применение аутологических тромбов по исследуемому протоколу не привело к значимым морфофункциональным изменениям во всех исследованных точках. Отсутствие изменений, вероятно, связано с высокой активностью фибринолитической системы крыс [9]. Таким образом, применение аутологических

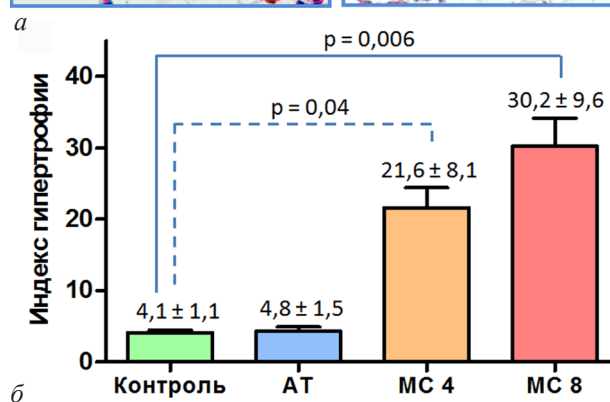
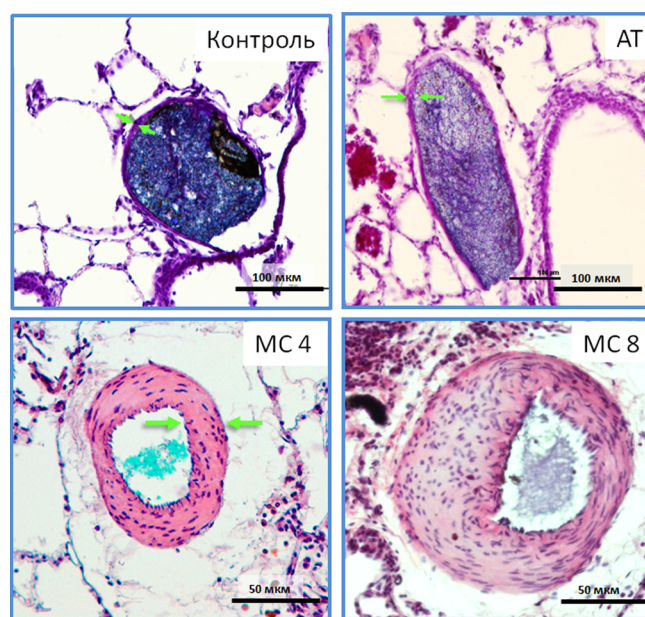


Рис. 7. Гистологические изменения ветвей легочной артерии через 6 недель после последнего введения эмболизирующих частиц:

а – репрезентативные микрофотографии субсегментарных ветвей легочной артерии из разных групп; б – индекс гипертрофии ветвей легочной артерии

Fig. 7. Histological changes in the branches of the pulmonary artery in 6 weeks after the last injection of embolization particles: а – representative microphotographs of subsegmental branches of the pulmonary artery from different groups; б – pulmonary arterial hypertrophy index

тромбов у крыс может быть рекомендовано только для изучения раннего периода ТЭЛА.

Дополнительным преимуществом использования микросфер из альгината натрия является возможность заключения в них тромботической массы с эффектом замедленного высвобождения биологически активных веществ, секретируемых тромбоцитами (серотонин, бета-тромбоглобулин, тромбоспондин, ионы кальция и др.) и продуктов деградации фибрина, что позволяет дополнительно повысить соответствие патогенеза с моделируемой патологией [15].

Таким образом, разработанная модель может быть использована для изучения патогенеза ХТЭЛГ и хронической тромбоэмболической болезни, а также проведения доклинических исследований новых лекарственных субстанций, направленных как на селективную вазодилатацию сосудов малого круга кровообращения, так и на улучшение прогноза выживаемости путем их антифибротических, противовоспалительных и антипролиферативных свойств.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Бокерия Л. А., Затевахин И. И., Кириенко А. И. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению, профилактике венозных тромбозмических осложнений // Флебология. – 2015. – Т. 9. № 4/2. – С. 4–46. [Bockeria LA, Zatevakhin II, Kirienko AI et al. Russian clinical guidelines on the diagnosis, treatment, prevention of venous thromboembolic complications. Phlebology. 2015;9(4/2):4–46. (In Russ.)].
2. Grosse SD, Nelson RE, Nyarko KA, Richardson LC, Raskob GE. The economic burden of incident venous thromboembolism in the United States: A review of estimated attributable healthcare costs. *Thromb. Res.* 2016;137:3–10. Doi: 10.1016/j.thromres.2015.11.033.
3. Lang IM, Pesavento R, Bonderman D, Yuan JX. Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding. *Eur. Respir. J.* 2013;41(2):462–468. Doi: 10.1183/09031936.00049312.
4. Riedel M, Stanek V, Widimsky J, Prerovsky I. Longterm follow-up of patients with pulmonary thromboembolism. Late prognosis and evolution of hemodynamic and respiratory data. *Chest.* 1982;81(2):151–158.
5. Klok FA, van der Hulle T, den Exter PL et al. The post-PE syndrome: a new concept for chronic complications of pulmonary embolism. *Blood Rev.* 2014;28(6):221–226. Doi: 10.1016/j.blre.2014.07.003.
6. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur. Heart. J.* 2014;14;35(43):3033–69, 3069a–3069k. Doi: 10.1093/eurheartj/ehu283.
7. Deng C, Wu D, Yang M et al. Expression of tissue factor and forkhead box transcription factor O-1 in a rat model for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2016;42(4):520–528. Doi: 10.1007/s11239-016-1413-9.
8. Deng C, Zhong Z, Wu D et al. Role of FoxO1 and apoptosis in pulmonary vascular remodeling in a rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Sci. Rep.* 2017;23;7(1):2270. Doi: 10.1038/s41598-017-02007-5.
9. Runyon MS, Gellar MA, Sanapareddy N et al. Development and comparison of a minimally-invasive model of autologous clot pulmonary embolism in Sprague-Dawley and Copenhagen rats. *Thromb. J.* 2010;11;8:3. Doi: 10.1186/1477-9560-8-3.
10. Toba M, Nagaoka T, Morio Y et al. Involvement of Rho kinase in the pathogenesis of acute pulmonary embolism-induced polystyrene microspheres in rats. *Am J Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2010;298(3):297–303. Doi: 10.1152/ajplung.90237.2008.
11. Watts JA, Marchick MR, Gellar MA, Kline JA. Up-regulation of arginase II contributes to pulmonary vascular endothelial cell dysfunction during experimental pulmonary embolism. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2014;24(4):407–413 Doi: 10.1016/j.pupt.2011.01.009.
12. Arias-Loza PA, Jung P, Abeßer M et al. Development and Characterization of an Inducible Rat Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Hypertension.* 2016;67(5):1000–1005. Doi: 10.1016/j.pupt.2011.01.009.
13. Карпов А. А., Пузанов М. В., Альмухаметова Ф. Р. и др. Микроинкапсулирование мезенхимных стволовых клеток как инструмент для изучения механизмов клеточной терапии при инфаркте миокарда // Регионарное

кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – Т. 16. № 2. – С. 75–82. [Karpov AA, Puzanov MV, Almukhametova FR et al. Microencapsulation of mesenchymal stem cells as a tool for studying the mechanisms of cell therapy in myocardial infarction. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2017;16(2):75–82. (In Russ.)]

14. Каркищенко Н. Н., Каркищенко В. Н., Шустов Е. Б. и др. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность: метод. реком. – М.: ФМБА России, 2017. – С. 70. [Karkishchenko NN, Karkishchenko VN, Shustov EB et al. Biomedical (preclinical) study of drugs affecting physical performance. *Guidelines.* Moscow, FMBA Russia. 2017:70. (In Russ.)].

15. Способ моделирования хронической тромбозмической легочной гипертензии // Патент России № 2675353. 2018. Бюл. № 35. / Карпов А. А., Ломакина А. М., Черепанов Д. Е. и др. [Karpov A. A., Lomakina A. M., Cherepanov D. E. (2018). *Method of modeling chronic thromboembolic pulmonary hypertension*, Pat. No. 2675353; Russian Federation].

Информация об авторах

Карпов Андрей Александрович – канд. мед. наук, врач ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, e-mail: Karpov_AA@almazovcentre.ru.

Аникин Никита Алексеевич – студент ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: freedomofstyle@yandex.ru.

Черепанов Дмитрий Евгениевич – врач ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, e-mail: ced678@mail.ru.

Михайлова Александра Михайловна – ординатор ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: aechika82@mail.ru.

Краснова Марина Викторовна – аспирант ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» МЗ РФ, e-mail: marina.krasnova@pharminnotech.com.

Смирнов Сергей Сергеевич – студент ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: saveliy.morozov.96@mail.ru.

Буненков Николай Сергеевич – аспирант ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: bunenkov2006@gmail.com.

Чефу Светлана Григорьевна – канд. биол. наук, зав. лабораторией экспериментальных исследований ЦЛМ, e-mail: chefusveta@yandex.ru.

Ивкин Дмитрий Юрьевич – доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» МЗ РФ, директор центра экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» МЗ РФ, e-mail: ivkin.mail.ru@mail.ru.

Моисеева Ольга Михайловна – д-р мед. наук, профессор, директор Института сердца и сосудов, главный научный сотрудник НИО некоронарогенных заболеваний сердца, e-mail: moiseeva.cardio@gmail.com.

Галагуза Михаил Михайлович – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский

государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: galagoudza@mail.ru.

Author information

Karpov Andrei A. – Candidate of Medical Sciences, Doctor Almazov National Medical Research Centre, e-mail: Karpov_AA@almazovcentre.ru.

Anikin Nikita A. – student of the First Pavlov State Medical University of Saint Petersburg, e-mail: freedomofstyle@yandex.ru.

Cherepanov Dmitry E. – doctor Almazov National Medical Research Centre, e-mail: ced678@mail.ru.

Mikhailova Alexandra M. – intern of First Pavlov State Medical University of Saint Petersburg, e-mail: aechika82@mail.ru.

Krasnova Marina V. – graduate student of the Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, e-mail: marina.krasnova@pharminnotech.com.

Smirnov Sergey S. – student of the First Pavlov State Medical University of Saint Petersburg, e-mail: saveliy.morozov.96@mail.ru.

Bunenkov Nikolay S. – postgraduate student of the First Pavlov State Medical University of Saint Petersburg, e-mail: bunenkov2006@gmail.com.

Chefu Svetlana Grigorievna – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Experimental Research, TsLM, e-mail: chefusveta@yandex.ru.

Ivkin Dmitry Yuryevich – Director of the Center for Experimental Pharmacology of the Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, email: ivkin.mail.ru@mail.ru.

Moiseeva Olga Mikhailovna – Deputy Director of the Institute, Head of the Research Department of Noncoronary Heart Disease, MD, DSc, Professor, e-mail: moiseeva.cardio@gmail.com.

Galagudza Michael M. – MD, Dr. Med. Sci., Professor and Corresponding Member of the Russian Academy of Science, Director of the Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre; Professor at the Department of Pathophysiology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, e-mail: galagoudza@mail.ru.