

<https://doi.org/10.36396/MS.2020.16.4.005>

Выбор экспериментальной модели артериального тромбоза на животных для тестирования нового рекомбинантного тромболитика — делеционного варианта плазминогена человека

Н.А. СКРЫПИНА, А.В. СКАМРОВ, З.И. ЦОКОЛАЕВА, Т.И. БЕЛЯНКО, Р.Ш. БИБИЛАШВИЛИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. 3-я Черепковская 15а, Москва, 121552, Россия

Резюме

Растворение артериального тромба с помощью рекомбинантного белка — модифицированного плазмина человека — исследовали на животной модели (бедренной артерии кролика). Опробованы различные способы моделирования артериального тромбоза, и как наиболее адекватный выбран способ поражения стенки сосуда путем механического повреждения артерии.

При венозном тромбе введение рекомбинантного плазмина или рекомбинантной проурокиназы приводит к растворению тромба и восстановлению кровотока. При артериальном тромбе, полученном путем механического повреждения артерии, введение рекомбинантного плазмина или рекомбинантной проурокиназы не приводит к восстановлению кровотока в артерии кроликов из-за спазма сосуда. Введение папаверина в месте спазма устраняет спазм и восстанавливает кровоток. Это явление не описано в литературе, но служит препятствием при выборе адекватной модели артериального тромбоза.

Ключевые слова: тромболитизис, тромбоз, прямой тромболитик, животная модель тромбоза, спазм сосуда.

Choosing of suitable animal model of arterial thrombosis to test new recombinant thrombolytic agent — modified human plasminogen

N.A. SKRYPINA, A.V. SKAMROV, Z.I. TSOKOLAEVA, T.I. BELYANKO, R.SH. BIBILASHVILI

Federal State Budget Organization «National Medical Research Center of Cardiology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3rd Cherepkovskaya Str. 15a, Moscow, 121552, Russia

Summary

Dissolution of arterial thrombus by recombinant human modified plasmin was examined in a rabbit model of femoral artery occlusion. Various ways to model arterial thrombosis have been tested. Mechanical damage to the artery was chosen as the most adequate method to model arterial thrombosis. Recombinant plasmin or prourokinase dissolve venous thrombus and restore blood flow. Due to vascular spasm these compounds fail to restore blood flow in arterial thrombosis caused by mechanical damage to the artery. Papaverin application at the site of spasm removes it and restores blood flow. This phenomenon is not described in the literature and hinders the choice of adequate model of arterial thrombosis.

Keywords: thrombolysis, thrombosis, thrombolytic drugs, animal models of thrombosis, vascular spasm.

Сведения об авторах:

Скрыпина Наталия Алексеевна — к. б. н., биолог лаборатории геномной инженерии Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; e-mail: nat-skrypina@yandex.ru; +7 (495) 414-64-86; ORCID 0000-0003-4757-8961.

Скамров Андрей Викторович (автор, ответственный за переписку) — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории геномной инженерии Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; e-mail: askamrov@yandex.ru; +7 (495) 414-65-39; ORCID 0000-0001-5634-7490.

Цоколаева Зоя Ивановна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; e-mail: Tsokolaevazoya@mail.ru; +7 (495) 414-67-83; ORCID 0000-0003-2441-6062.

Белянко Татьяна Игоревна — биолог лаборатории геномной инженерии Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; e-mail: tatbel5@yandex.ru; +7 (495) 414-64-86; ORCID 0000-0002-8412-3811.

Бибилашвили Роберт Шалвович — к. ф.-м. н., руководитель лаборатории геномной инженерии Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; e-mail: r.bibilashvili@yandex.ru; +7 (495) 414-61-03; ORCID 0000-0002-3293-7071.

Введение

Тромбозы (образование внутрисосудистых сгустков крови, препятствующих нормальному кровотоку) и их лечение — очень острая проблема в медицине. Тромбоз в системе коронарного кровообращения ведет к инфаркту миокарда, тромбоз сосудов мозга — к инсульту, тромбоз глубоких вен нижних конечностей нередко ведет к тромбоэмболии легочной артерии, и эти события — одни из основных причин смертности и инвалидизации населения в мире [1].

Несмотря на многочисленные исследования последних десятилетий, задача лечения тромбозов остается нерешенной. В настоящее время проводятся интенсивные поиски как новых методов разрушения и устранения тромбов, так и совершенствование известных лекарственных средств и протоколов их применения.

Для разработки и тестирования новых способов воздействия на тромбы требуются подходящие животные модели тромбоза. Выбор лабораторного животного для модели — компромисс между филогенетической близостью к человеку и затратами на содержание животного.

В случае развития тромба в сосудах, особенно в артериях, единственным консервативным способом восстановления кровотока является его растворение (лизис). В связи с этим тромболитические препараты являются лекарствами первого ряда в лечении инфарктов, инсультов, тромбоэмболии легочной артерии.

Опробованным способом фибринолитической терапии при инсультах и инфарктах является внутривенное введение тромболитика. При таком способе введения концентрация литического агента возле тромба оказывается низкой. Кроме того, системное распределение препарата повышает риск кровотечений в нецелевых органах и ишемизированном мозге [2]. Так, внутривенное введение тканевого активатора плазминогена (tPA) связано с симптоматическими мозговыми гемorragиями в 6% случаев.

Внутриартериальная доставка фибринолитика прямого действия (плазмина) — предлагаемая терапия, которая может дополнить механическое удаление тромба и внутривенное введение фибринолитического препарата (тканевого активатора плазминогена, урокиназы и проурокиназы [3]). Плазмин (или его генно-инженерные модификации) при таком способе введения представляется препаратом выбора. Активаторы превращают плазминоген в активную форму — плазмин, который и растворяет тромб. В местах, где очень низкий кровоток из-за тромбоза, плазминоген быстро истощается, и дальнейшая поставка активаторов становится бессмысленной, так как не приводит к увеличению литической активности [2]. В ряде работ было показано, что плазмин потенциально более пригоден и более безопасен, чем активаторы плазминогена, при растворении протяженных кровяных тромбов у человека [4]. Его единственным ожидаемым недостатком является очень короткое время жизни в кровотоке [5–7].

Цель работы — подбор адекватной модели артериального тромбоза для исследования действия прямого тромболитика — модифицированного рекомбинантного плазмина человека [8].

Материал и методы

Рекомбинантный делеционный вариант плазминогена (в дальнейшем — миниплазминоген) был получен и очищен

в лаборатории генной инженерии [8, 9]. Проурокиназа рекомбинантная (активатор плазминогена) — из препарата «Гемаза» (производство ЭП МБП НМИЦ кардиологии) — растворена до концентрации 10 мкМ (0,5 мг/мл).

Миниплазмин получен активацией миниплазминогена с добавлением проурокиназы в молярном соотношении 200:1 с последующей инкубацией 10 минут при 37 °С.

Для исследования тромболитической активности препарата миниплазмينا были выбраны модели тромбоза бедренной артерии и яремной вены на кроликах. Кролики — самцы со средним весом 3,2 кг. Животных наркотизировали введением последовательно «Рометара» и «Золетила» в ушную вену, после чего обнажали кровеносный сосуд. За состоянием кровотока следили с помощью датчика электромагнитного расходомера Stathem SP 2202, установленного выше места тромба, с использованием программы индикации кровотока, адаптированной для персонального компьютера.

Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в учреждении, и национальным законам.

Образование венозных тромбов стимулировали введением внутривенно раствора тромбина в количестве 1 МЕ (50 мкл) в изолированный участок вены. Через 10 минут снималась верхняя (по течению) лигатура, и далее в течение 30 минут происходило созревание тромба. Общее время окклюзии составляло 40 минут. Образовывался плотный, хорошо оформленный тромб, перекрывающий кровоток в сосуде.

После образования тромба и снятия лигатуры препарат миниплазмينا вводили либо вблизи тромба (местное введение), либо в вену с другой стороны для исследования системного воздействия.

Методы образования артериального тромба

Индукция тромбоза с помощью введения раствора тромбина (1 МЕ, 50 мкл) в изолированный участок бедренной артерии. Через 10 минут снималась верхняя (проксимальная) лигатура, и далее в течение 30 минут происходило созревание тромба. Общее время окклюзии составляло 40 минут при перекрытом кровотоке с последующим ослаблением лигатур после созревания тромба.

Индукция тромбоза с помощью хлорного железа (прижиганием адвентиции) [10]. На изолированную бедренную артерию накладывали фильтр размером 3 × 3 мм, смоченный в водном растворе хлорного железа 10%, и покрывали парафином. Затем накладывали лигатуры на расстоянии 8 мм друг от друга и вводили 0,02 мл (0,5 МЕ) раствора бычьего тромбина. Через 15 минут снимали проксимальную лигатуру для доступа свежей крови. Еще через 15 минут ослабляли дистальную лигатуру. Выдерживали до 1 часа от момента наложения лигатур.

Индукция тромбоза путем механического повреждения артерий. Обнаженную артерию повреждали слабым воздействием пинцета, затем оставляли для осаждения тромбоцитов и образования тромба, перекрывая временно с помощью лигатур кровоток. Тромб созревал в течение 1 часа, затем лигатуры снимали.

Для введения препаратов непосредственно в артерию применяли иглы для мезотерапии диаметром 0,3 мм. Пробы крови для анализа отбирали из ушной вены.

Результаты

Предварительные опыты по проверке фибринолитической активности миниплазмина проводили на модели венозного тромба у кролика. При местном введении миниплазмина (в ту же вену перед тромбом по кровотоку) в количестве 1,4–2 мг вес тромба уменьшался со 130 ± 20 мг (контроль без введения препарата) до $28 \pm 8,9$ мг, извлеченный из сосуда тромб был рыхлым, кровоток восстанавливался в 100% случаев. При системном введении препарата (в ушную вену) результаты были менее впечатляющими, однако наблюдалось достоверное уменьшение веса тромба и в 60% случаев наблюдалось восстановление кровотока. Эти результаты были обнадеживающими, и за ними последовали опыты на модели артериального тромба.

На начальном этапе применялась методика (та же, что ранее для венозных тромбов) образования тромба в артерии с помощью введения 1–2 МЕ тромбина в изолированный отрезок артерии. Однако при использовании тромбина связывание образовавшегося тромба со стенкой артерии было слабым, тромб подвижным и при ослаблении лигатуры уплывал, что нехарактерно для ситуации артериального тромбоза. Методика индуцирования тромбоза с помощью введения раствора тромбина была отвергнута как неадекватная.

Еще один способ образования тромба в сосуде — использование аппликации хлорного железа [10]. Были опробованы концентрации хлорного железа от 10 до 20%, различных размер накладываемого фильтра и время аппликации, а также одновременное введение малых количеств тромбина. При использовании аппликации раствора хлорного железа 20% в течение 20 минут с последующим созреванием тромба в течение часа (4 кролика) у половины животных после введения рекомбинантного плазмина не наблюдалось реканализации сосуда или происходила реокклюзия. Извлеченный из сосуда тромб был сухим, ломким и по виду состоял из поврежденных химическим ожогом эритроцитов.

В последующих опытах концентрация используемого хлорного железа снижена до 10%, а процедура формирования тромба дополнена введением 0,5 МЕ тромбина в изолированный участок артерии. Из 10 экспериментов в 4 после введения рекомбинантного плазмина произошла полная реканализация сосуда, в остальных 6 экспериментах либо реканализации не было, либо наступала быстрая реокклюзия сосуда. В контрольных опытах с использованием известного тромболитического препарата «Пуролаза» признаки реканализации также наблюдались в 50% случаев. Извлеченный из сосуда тромб состоял по виду из поврежденных химическим ожогом эритроцитов.

При образовании тромба в сосуде после его механического повреждения в контрольных опытах (без введения тромболитических препаратов) вес образующихся тромбов составлял 4–5 мг при длине 3–5 мм. Результат применения тромболитика оказался неожиданным: при введении рекомбинантного плазмина местно в количестве 0,6–1,2 мг кровоток (по показаниям датчика) не восстанавливался (рис. 1), однако при иссечении артерии тромб в сосуде не обнаруживался.

Было высказано предположение, что сосуд закупоривает тромбоцитарная пробка. Для проверки этой гипотезы были проведены эксперименты с введением в ухо 2 мг интегрлина

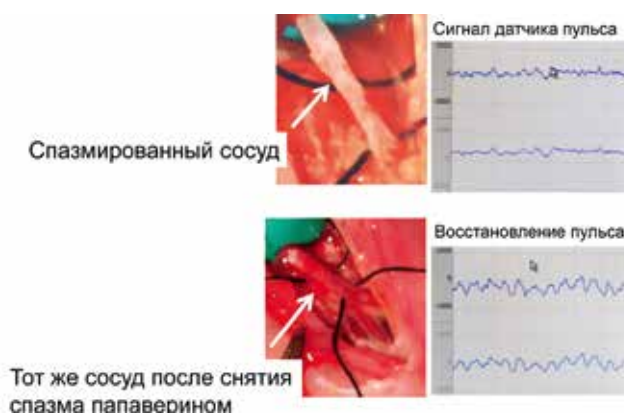


Рисунок 1. Спазм артерии кролика при растворении плазмином тромба, сформировавшегося после механического повреждения

(эпitifибатида, 1 мл) как ингибитора агрегации тромбоцитов, предваряющим введение 0,3 мл (0,6 мг) плазмина. Результат: восстановления кровотока нет, тромб в артерии отсутствует либо очень мал, артерия спавшаяся. Для ингибирования возможного влияния металлопротеиназ на процессы реканализации — реокклюзии применили доксициклин. Введение 30 мг/кг накануне и в день эксперимента не оказало влияния на результаты: тромб растворялся, но сосуд оставался спазмированным и кровоток не восстанавливался.

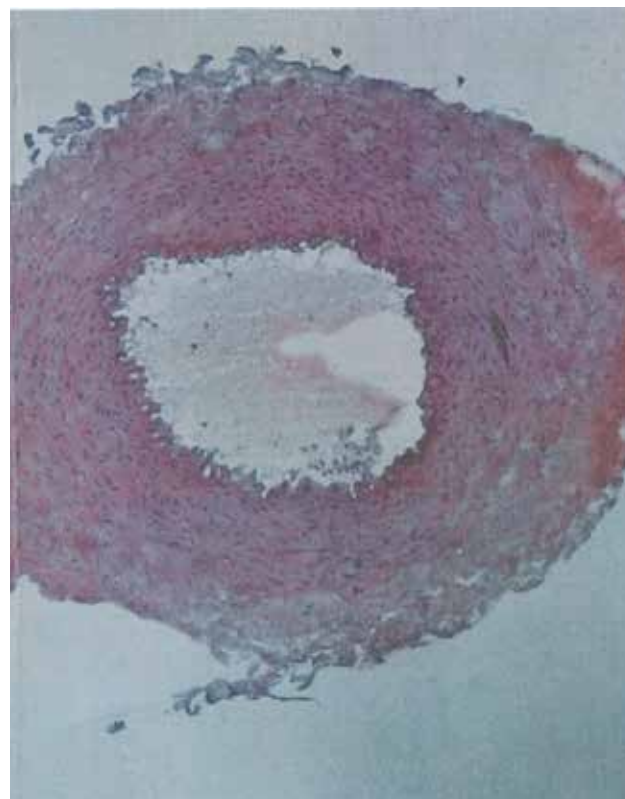


Рисунок 2. Срез спазмированной артерии кролика после механического повреждения и введения плазмина

Восстановления кровотока удалось добиться при применении папаверина, который снижает тонус гладких мышц и оказывает сосудорасширяющее и спазмолитическое действие. В контрольном опыте показано, что введение папаверина внутривенно после образования тромба в артерии не приводит к реканализации сосуда. Введение плазмينا тонкой иглой в артерию вблизи тромба также не приводит к реканализации. Сосуд выглядит побелевшим и спавшимся. Однако нанесение 0,1 мл (2 мг) раствора папаверина на поверхность сосуда восстанавливает кровоток в течение 5 минут (рис. 1, 2).

Обсуждение

В настоящей работе проведено тестирование распространенных моделей артериального тромбоза у кролика с целью выбора адекватной для исследования действия прямого тромболитика — модифицированного рекомбинантного плазмينا человека [8]. Способ формирования тромба в артерии с помощью введения тромбина в изолированный отрезок артерии был отвергнут как неадекватный из-за нестабильности формирующегося тромба, в ряде экспериментов кровотоки в артерии восстанавливались самопроизвольно вскоре после образования тромба и снятия лигатуры.

Одна из наиболее широко используемых животных моделей для исследования артериальных тромбозов — Fe-индуцированный тромб [10]. Эта модель предполагает аппликацию раствора хлорного железа на артерии для индуцирования патофизиологических условий тромбоза. Хлорное железо вызывает оксидативный стресс с образованием свободных радикалов, что приводит к перекисному окислению липидов и деструкции эндотелиальных клеток, в результате чего образуется окклюзивный тромб. Эта модель широко применялась на мышах и крысах и в меньшей степени на кроликах [12]. Для этой модели отмечалась важность для воспроизводимости результатов всех параметров: размера фильтровальной бумаги, количества и концентрации нанесенного на нее раствора, освещенности в процессе опыта и размера полученного повреждения на сосуде. Такая строгая стандартизация приводила к исключению из опыта значительной части результатов.

В наших опытах с использованием аппликации раствора соли железа извлекаемые из сосудов тромбы были сухими, лом-

кими и по виду состояли из поврежденных химическим ожогом эритроцитов. Подобные эффекты описаны в литературе и объясняются активацией ряда факторов после химического повреждения сосуда [11, 12].

Еще один способ образования тромба в сосуде — его механическое повреждение, которое приводит к активации тромбоцитов и локальному тромбозу [13]. Кровоток в поврежденной артерии замедляется, образуется слой агрегированных тромбоцитов, а при остановке кровотока — и образование фибринового тромба. При слабом механическом повреждении артерии с последующим ее перекрытием образуется эластичный тромб, который не уплывает при снятии лигатуры. Однако при введении рекомбинантного плазмينا местно кровотоки не восстанавливались, хотя тромб в артерии не обнаруживался. Неудачу в восстановлении кровотока нельзя объяснить ни действием металлопротеиназы, ни образованием «тромбоцитарного гвоздя» [14]. В клинических исследованиях плазмينا как препарата для лечения острого ишемического инсульта отмечалось, что при хорошей переносимости препарата успешная реканализация была достигнута лишь у ограниченного числа пациентов [15]. Возможно, это объясняется не неэффективным растворением тромба, а иными причинами. В наших экспериментах восстановление кровотока происходило при нанесении на поверхность сосуда раствора спазмолитика папаверина.

Заключение

Образование тромба в сосуде при слабом механическом повреждении артерии кролика с последующим ее перекрытием представляется наиболее адекватной моделью формирования тромба. Однако введение тромболитика (рекомбинантного плазмينا или рекомбинантной проурокиназы) приводило к спазмированию сосуда, преимущественно в месте повреждения, и к остановке кровотока. Данное явление не описано в литературе. Выяснение механизма возникновения спазма артерии и путей его предотвращения при применении тромболитиков требует дополнительных исследований.

Авторы выражают глубокую благодарность лаборанту-исследователю лаборатории экспериментальной патологии сердца Жариковой Екатерине Борисовне за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Feigin V, Forouzanfar M, Krishnamurthi R, Mensah G, Connor M, Bennett D, Moran A, Sacco R, Anderson L, Truelsen T, O'Donnel M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes C, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M, Murray C. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2014;383(9913):245–255. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61953-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61953-4)
2. Bhatia R, Hill MD, Shobha N, Menon B, Bal S, Kocher P, Watson T, Goyal M, Demchuk AM. Low rates of acute recanalization with intravenous recombinant tissue plasminogen activator in ischemic stroke: real-world experience and a call for action. *Stroke*. 2010;41(10):2254–2258. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.110.592535>
3. Lee M, Hong K, Saver JL. Efficacy of intra-arterial fibrinolysis for acute ischemic stroke: meta-analysis of randomized controlled trials. *Stroke*. 2010;41(5):932–937. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.109.574335>
4. Bizjak N, Bajd F, Vidmar J, Blinc A, Marder VJ, Novokhatny V, Serua I. Comparison of local thrombolytic efficacy of plasmin and rt-PA in an in-vitro flow system; a pilot study. *Blood Coagul & Fibrinolysis*. 2013;24(7):711–714. <https://doi.org/10.1097/mbc.0b013e328361bd48>
5. Novokhatny VV, Jesmok, GJ, Landskroner KA, Marder VJ, Zimmerman TP. Locally delivered plasmin: why should it be superior to plasminogen activators for direct thrombolysis? *Trends Pharmacol. Sci. Trends Pharmacol. Sci.* 2004;25(2):72–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.12.009>
6. Shlansky-Goldberg RD, Matsumoto, AH, Baumbach, GA, Siegel JB, Raabe RD, Murphy TP, Deng C, Dawkins JR, Marder VJ. A first-in-human phase I trial of locally delivered human plasmin for hemodialysis graft occlusion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6(6):944–950. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02969.x>
7. Marder VJ. Thrombolytic therapy for deep vein thrombosis: potential application of plasmin. *Thromb Res*. 2009;123:S56–S61. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(09\)70145-8](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(09)70145-8)
8. Гурский Я.Г., Минашкин М.М., Феоктистова Е.С., Скамров А.В., Скрыпина Н.А., Бибилашвили Р.Ш. Экспрессия делеционного

- варианта плазминогена человека в *Escherichia coli*. Биотехнология. 2010;1:25–31. [Gurskii YaG, Minashkin MM, Feoktistova ES, Skamrov AV, Skrypina NA, Bibilashvili RSh. Expression of a deleted variant of human plasminogen in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010;46(8):776–780. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/s0003683810080077>
9. Патент РФ на изобретение 2432397/ 27.10.2011 Бюл. №30. Белогуров А.А., Бибилашвили Р.Ш. Гурский Я.Г., Минашкин М.М., Скамров А.В. Скрыпина Н.А., Феоктистова Е.С. Рекомбинантный полипептид со свойствами плазминогена человека превращаться при активации в плазмин, который катализирует расщепление фибрина, фрагмент ДНК, кодирующий полипептид, рекомбинантная плазмидная ДНК для экспрессии полипептида и трансформированная клетка *Escherichia coli* — продуцента полипептида. [Belogurov AA, Bibilashvili RSh, Gurskij JaG, Minashkin MM, Skamrov AV, Skrypina NA, Feoktistova ES. Recombinant polypeptide with human plasminogen properties to convert into plasmin if activated which catalyses fibrin splitting, DNA fragment coding polypeptide, recombinant plasmid DNA for polypeptide expression and transformed *Escherichia coli* cell — polypeptide producer. (In Russ.)].
 10. Kurz K, Main B, Sandusky G. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 1990;60(4):269–280. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(90\)90106-m](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90106-m)
 11. Wang L, Miller C, Swarhout R, Rao M, Mackman N, Taubman M. Vascular smooth muscle-derived tissue factor is critical for arterial thrombosis after ferric chloride–induced injury. *Blood*. 2009;113(3):705–713. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-090944>
 12. Couture L, Richer L, Mercier M, Holie C, Lehoux D, Hossain SM. Troubleshooting the rabbit ferric chloride-induced arterial model of thrombosis to assess in vivo efficacy of antithrombotic drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;67(2):91–97. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.11.003>
 13. Yamashita A, Furukoji E, Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamamoto H, Tamura S, Ikeda Y, Sumiyoshi A, Asada Y. Increased Vascular Wall Thrombogenicity Combined With Reduced Blood Flow Promotes Occlusive Thrombus Formation in Rabbit Femoral Artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(12):2420–2424. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000147767.61336.de>
 14. Mata KM, Tefe-Silva C, Floriano EM, Fernandes CR, Rizzi E, Gerlach RF, Mazzuca MQ, Ramos SG. Interference of doxycycline pretreatment in a model of abdominal aortic aneurysms *Cardiovascular Pathology*. *Cardiovascular Pathology*. 2015;24(2):110–120. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2014.10.004>
 15. Mitchell PJ, Yan B, Brozman M, Ribo M, Marder V, Courtney KL, Saver JL. Plasmin (Human) Administration in Acute Middle Cerebral Artery Ischemic Stroke: Phase 1/2a, Open-Label, Dose-Escalation, Safety Study. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2017;26(2):308–320. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.022>