

РАЗДЕЛ – КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ PART – SHORT ARTICLES

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СИСТЕМНОГО ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ТРОМБОЗА

Баширова Л.И.

Ижевская государственная медицинская академия, Ижевск, Россия, e-mail: lindadeireko.lb@gmail.com

THE MORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE EXPERIMENTAL MODEL OF SYSTEMIC GENERALIZED THROMBOSIS

Bashirova LI

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia, e-mail: lindadeireko.lb@gmail.com

Для цитирования:

Баширова Л.И. Морфологическая оценка экспериментальной модели системного генерализованного тромбоза// Морфологические ведомости.- 2020. - Том 28.- № 2.- С. 74-77. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(2\):74-77](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(2):74-77)

For the citation:

Bashirova LI. The morphological evaluation of the experimental model of systemic generalized thrombosis. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter*. 2020;28(2):74-77. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28\(2\):74-77](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2020.28(2):74-77)

Резюме. Единственной регламентированной моделью синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания или ДВС-синдрома, является модель генерализованного тромбоза по Di Minno. В связи с расширением роли тканевого фактора и тромбина в инициации ДВС-синдрома, целью настоящего исследования является гистологическая оценка модели Di Minno в условиях инициации ДВС-синдрома тканевым фактором или тромбином со сравнением с классическим вариантом. Исследование выполнено на 80 мышцах самцах. Все лабораторные животные были разделены на три группы в зависимости от триггера тромбообразования: I группа – раствор коллаген+адреналин (0,5 мг/кг + 0,06 мг/кг), II группа – 10 мг/кг тромбопластина, III группа – 10 мг/кг тромбина. Гистологические исследования животных демонстрируют более низкое содержание тромбов в легких лабораторных животных, что позволяет предположить основную причину гибели животных не в остром тромбозе, а в развитии отсроченных проявлениях ДВС-синдрома при использовании тканевого фактора. В случае использования тромбина наоборот регистрируется падеж животных в первые сутки эксперимента и результаты гистологического исследования демонстрируют массивность тромбоза, что не предусматривает исходно данная модель, рассчитанная на оценку эффективности новых антитромбоцитарных препаратов в остром эксперименте. Таким образом, на основе морфологических исследований продемонстрированы ограничения применения тканевого фактора и тромбина в модельных тромбозах и обоснована целесообразность применения физиологических индукторов агрегации.

Ключевые слова: системный тромбоз, патологическая анатомия, тромбин, тромбопластин

Summary. The only regulated model of disseminated intravascular coagulation syndrome or disseminated intravascular coagulation syndrome is the Di Minno model of generalized thrombosis. Due to the expansion of the role of tissue factor and thrombin in the initiation of DIC, the aim of this study is the histological assessment of the Di Minno model under conditions of DIC initiation by tissue factor or thrombin with comparison with the classical variant. The study was performed on 80 male mice. All laboratory animals were divided into three groups depending on the trigger of thrombosis: Group I - collagen + adrenaline solution (0.5 mg / kg + 0.06 mg / kg), Group II - 10 mg / kg thromboplastin, Group III - 10 mg / kg thrombin. Histological studies of animal's preparations demonstrate a lower content of blood clots in the lungs of laboratory animals, which suggests that the main cause of death of animals is not acute thrombosis, but the development of delayed manifestations of DIC when using tissue factor. In the case of thrombin using, on the contrary, the death of animals is recorded on the first day of the experiment and the results of the histological study demonstrate the massiveness of thrombosis, which is not initially provided for by this model, calculated to assess the effectiveness of new antiplatelet drugs in an acute experiment. Thus, on the basis of morphological studies, the limitations of the use of tissue factor and thrombin in model thrombosis have been demonstrated and the expediency of using physiological inducers of aggregation has been substantiated.

Key words: systemic generalized thrombosis, pathology, thrombin, thromboplastin

Введение. На сегодняшний день объем доклинических исследований регламентирован «Руководством по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ» [1], в котором, в том числе указаны основные модели экспериментальных тромбозов, на которых должны быть оценены потенциальные корректоры системы гемостаза. Единственной регламентированной моделью синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания или ДВС-синдрома, является модель генерализованного тромбоза по Di Minno [2]. Анализ публикационной активности

позволяет выявить достаточно широкое использование данной модели исследователями [3-5]. Классическим вариантом исполнения является внутривенное введение индукторов агрегации тромбоцитов в хвостовую вену мыши, однако, в последнее время в связи с расширением представлений о ДВС-синдроме, звучат призывы о доминирующей роли тканевого фактора или тромбина в инициации ДВС-синдрома.

Цель исследования: гистологическая оценка модели Di Minno в условиях инициации ДВС-синдрома тканевым фактором или тромбином со сравнением с классическим вариантом.

Материалы и методы исследования. Вся экспериментальная работа выполнена в условиях *in vivo* на 80 половозрелых мышцах самцах с соблюдением требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных для экспериментальных животных, правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96, ГОСТР 50258-92) и приказа Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении Правил лабораторной практики» (GLP). На проведение исследование получено разрешение локального этического комитета Ижевской государственной медицинской академии (протокол № 2 от 20.12.2018). Моделирование генерализованного тромбоза проводили введением индукторов агрегации в хвостовую вену мышцей. Все лабораторные животные были разделены на три группы. У первой группы мышцей в качестве триггера тромбоза использовали смесь растворов 0,5 мг/кг коллагена и 0,06 мг/кг адреналина («Технология-стандарт», Россия), у второй – 10 мг/кг тромбопластина («Технология-стандарт», Россия), у третьей – 5 мг/кг тромбина («Технология-стандарт», Россия). Длительность наблюдения за животными составляла 14 дней. После вывода животных из эксперимента проводилось сравнение моделей по результатам макроскопической оценки органов и гистологическому исследованию легких. Для световой микроскопии материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. После стандартной проводки готовили парафиновые срезы микротомом LEICA RM 2145 (Leica Biosystems, Германия), которые окрашивали гематоксилином и эозином. Далее на световом оптическом уровне при увеличении $\times 40$ и $\times 100$ с помощью бинокулярного микроскопа LEICA CME (Leica Biosystems, Германия) в 10 полях зрения оценивали морфологические изменения.

Результаты исследования и обсуждение. В условиях системного тромбоза инъекция взвеси адреналина и коллагена (группа I) приводила к гибели всех животных в течение 5 суток. Макроскопически объем легких был увеличен. Микроскопически картина легких отличалась неоднородностью. На разрезах обнаруживались множественные червеобразной формы сгустки крови. Паренхима легких отечна, сосуды полнокровны, определяются очаги лимфо-гистоцитарной инфильтрации с примесью нейтрофилов. В артериальных сосудах долевых артерий выявляются тромбы смешанного характера, полностью или частично обтурирующие просвет (рисунок 1B).

Падеж животных в группе II на 14 сутки эксперимента составил 100%, однако в отличие от группы I смерть лабораторных животных регистрировалась ежедневно на протяжении всего периода наблюдений. Интересным представляется факт, что макроскопическая оценка извлеченных легких демонстрирует значительное снижение зоны тромбоэмболического поражения, однако одновременно в артериальных сосудах мелкого и среднего калибров обнаруживаются тромбы смешанного характера, полностью или частично обтурирующие просвет (рисунок 1C).

Падеж в группе III на 14 сутки эксперимента, аналогично группе II, составил 100%, однако смерть лабораторных животных регистрировалась в первые сутки. Интересным представляется факт, что макроскопическая оценка извлеченных легких демонстрирует значительное увеличение зоны тромбоэмболического поражения, одновременно в артериальных сосудах мелкого, среднего и крупного калибров обнаруживаются тромбы, полностью обтурирующие просвет (рисунок 1D).

Результаты собственного исследования демонстрируют равномерную гибель лабораторных животных на всем периоде наблюдения после инициации тромбоза

тромбопластином и мгновенную гибель при вводе тромбина, морфологическая оценка животных при этом одинаково характеризуется низким содержанием тромбов в легких лабораторных животных, что позволяет предположить основную причину гибели животных не в остром тромбозе, а в развитии отсроченных проявлениях ДВС-синдрома, что не предусматривает исходно данная модель, рассчитанная на оценку эффективности новых антитромбоцитарных препаратов в остром эксперименте.

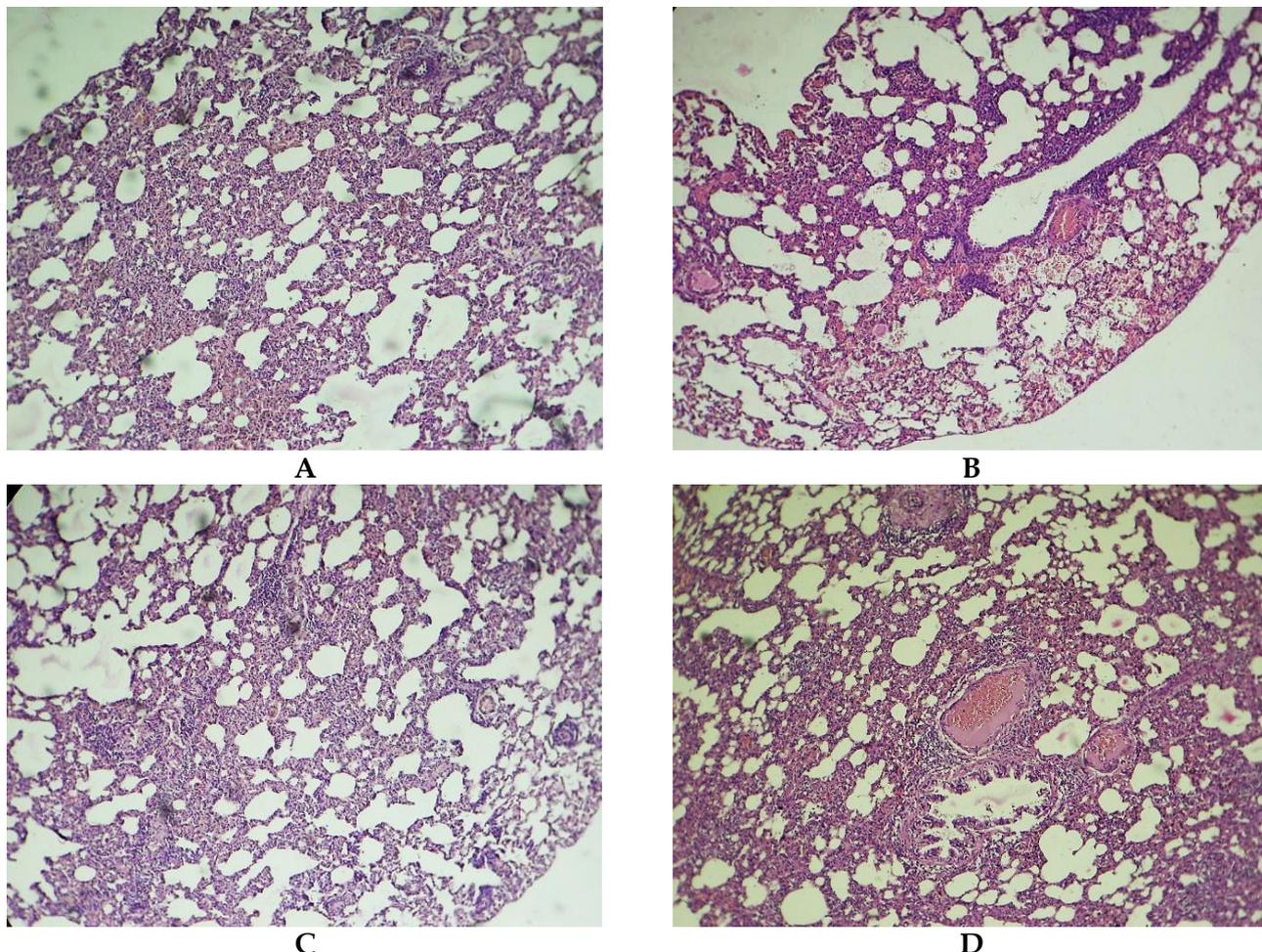


Рис. 1. Микрофото гистологических препаратов легких мышей. А - здоровая мышь, В - Группа I, С - группа II, D - группа III. Окр.: гематоксилином-эозином. Ув.: x100.

В эру рецептор-ассоциированной фармакологии и терапии необходимы более тонкие средства оценки эффективности фармацевтических препаратов в зависимости от их механизма действия, что сохраняет актуальность применения именно физиологических индукторов агрегации тромбоцитов, но в условиях целого организма. Именно разные пути активации тромбоцитов в зависимости от природы индуктора позволяют предположить или подтвердить механизм антиагрегационного эффекта потенциального лекарственного средства и обеспечить преемственность перехода с этапа исследований в условиях *in vitro* на лабораторных животных [6-8].

Заключение. Таким образом, по результатам проведенного исследования на примере классической модели Di Minno продемонстрированы ограничения применения тканевого фактора и тромбина в качестве инициатора тромбоза на животных и обоснована целесообразность применения физиологических индукторов агрегации.

Автор заявляет об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования.

Литература
References

1. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya/ Pod red. A.N. Mironova. M.: Grifi K, 2012. 944s.*
2. Di Minno G, Silver MJ. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1983;225(1):57-60.
3. Gurevich KG, Urakov AL, Bashirova LI, Samorodov AV, Purygin PP, Yermokhin VA, Gilmutdinova AS, Bondareva NA. The hemostatic activity of bis (2-aminoethan-1-sulfonate) calcium. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2018;11(11):452-455. DOI:10.22159/ajpcr.2018.v11i11.29049.
4. Urakov AL, Samorodov AV, Kamilov FK, Khaliullin FA, Khalimov AR. Dynamics of thrombosis and hemostasis system indicators in rats with thrombosis of inferior vena cava in experiment as a model for preclinical studies. *Biomed Pharmacol J.* 2017;10(1):237-245. DOI:10.13005/bpj/1103.
5. Urakov AL, Samorodov AV, Kamilov FK, Khaliullin FA, Gubaeva RA. Hemostatical activity of new benzylammonium salt 2-[3-methyl-1-npropyl-7-(1,1-dioxoethanyl-3)xantiny-8-thio]acetic acid. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol.* 2017;7(11):1213-1218. DOI:10.5455/njppp.2017.7.0516408072017.
6. Samorodov AV, Kamilov FK, Timirkhanova GA, Samorodova AI, Khaliullin FA, Murataev D. Antithrombotic activity of new 1-ethylxanthine cyclohexylammonium salt. *FASEB Journal.* 2014;28(1):1054.
7. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood.* 1988;71(1):1-8. DOI:10.1182/blood.V71.1.1.1.
8. Bick RL. Disseminated intravascular coagulation: a review of etiology, pathophysiology, diagnosis, and management: guidelines for care. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2002;8(1):1-31. DOI: 10.1177/107602960200800103.

Авторская справка

Баширова Линара Ирековна, аспирант кафедры общей и клинической фармакологии, Ижевская государственная медицинская академия, Ижевск, Россия;
e-mail: lindadeireko.lb@gmail.com