



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **79466**

(13) **U**

(51) МПК

A61L 17/04 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 11737**

(22) Дата подання заявки: **11.10.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.04.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.04.2013, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):

**Таланов Сергій Олександрович (UA),
Паталах Ірина Іванівна (UA),
Сагач Вадим Федорович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О.
БОГОМОЛЬЦЯ НАНУ,
вул. Богомольця, 4, м. Київ-24, 016010 (UA)**

(54) СПОСІБ АКТИВАЦІЇ ЕНДОТЕЛІЮ ІЗОЛЬОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ СУДИН ДЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ЕНДОТЕЛІЙЗАЛЕЖНИХ ПРОЦЕСІВ

(57) Реферат:

Спосіб активації ендотелію ізольованих фрагментів судин для моделювання ендотелійзалежних процесів включає ізоляцію фрагмента судини та відмивання його буферним розчином. Фіксують фрагмент судини в системі замкнутої циркуляції. Далі здійснюють пряму перфузію біологічним розчином фрагмента судини зі збереженням моношаром ендотелію. Стимуляцію клітин ендотелію здійснюють протизапальними біохімічними агентами. Потім здійснюють реєстрацію клітинної відповіді за накопиченням в перфузаті інтерлейкіну IL-6.

UA 79466 U

Корисна модель належить до галузі експериментальної медицини та лабораторної техніки і може бути застосована для медико-біологічних досліджень участі ендотелію у фізіології кровообігу, загальній біохімії крові та системі гемостазу, а також у патологічних порушеннях кооперативності взаємодій клітинної й плазмової складових процесу тромбоутворення чи

5 тромболілізу.

Згідно з сучасною науковою парадигмою патогенез тромбоутворення тісно пов'язаний із розвитком запалення в судинному руслі. Патогенез атеросклерозу також базується на уявленнях про запалення як основну етіологічну подію, яка провокує його виникнення та розвиток [1]. Поштовхом до ініціації запалення є активація ендотелію, що ініціює локальну адгезію лейкоцитів, тромбоцитів та ліпопротеїнів низької щільності, які прикріплюються до ендотелію в зоні пошкодження [2]. Активовані ендотеліоцити змінюють свій фенотип, втрачаючи захисні функції, та починають продукувати прозапальні молекули, інгібітори та активатори гемостазу, складні мультикомпонентні білкові комплекси тощо [3, 4]. Отже, активований ендотелій є необхідним чинником розвитку процесу запалення, а також регуляції обох ланок гемостазу, клітинної й гуморальної. Окрім коагуляції та запалення, ендотеліоцити залучаються до виконання таких важливих функцій, як регуляція тонусу судин, проникність судинної стінки та

ангіогенез [5].
Необхідність вивчення цих функцій потребує розробки методів дозованої активації ендотелію та контролю його стану за норми або за патологічних змін. Методи, відомі на сьогодні, пристосовані для роботи з клітинними лініями ізольованих ендотеліоцитів, які дозволяють легко змінювати діапазон експериментальних умов та реєструвати пряму клітинну відповідь на прозапальний стимул. Втім, ці методи непридатні для вивчення тих функцій ендотелію, які потребують участі інших клітин та позаклітинного матриксу судинної стінки. Певною мірою відтворюючи аутокринні взаємодії між ендотеліоцитами, такі методи не здатні моделювати ефекти паракринних кооперативних зв'язків між структурно зв'язаними компонентами судинної стінки (гладенько-м'язових клітин та фібробластів, колагенів субендотелію), які *in vivo* відіграють вирішальну роль у розвитку та підтримці процесів запалення, тромбоутворення та ремодулювання судинної стінки.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, вибрано спосіб залучення ізольованого фрагмента судини до моделювання процесів, локалізованих на поверхні судинної стінки, який описано в [6]. Даний спосіб був розроблений для вивчення взаємодій між тромбоцитами та адгезивними поверхнями судинної стінки (субендотелій або колагенові субстрати), він також дозволяє вивчати вплив реологічних параметрів або внесок різних структурних компонентів клітинної стінки у взаємодію клітин крові з поверхнею судини.

В способі найближчому аналогії фрагмент судини вивертають, видаляють моношар ендотелію та натягують інвертований фрагмент на стержень, вставлений в перфузійну камеру, приєднану до системи замкненої циркуляції біологічного розчину (перфузату), що забезпечує довготривалий (протягом 48 годин) контакт компонентів перфузату з субендотеліальними структурами судинної стінки, та здійснюють стимуляцію клітин субендотелію за допомогою фізичних, біологічних та біохімічних стимулів; наявність впливу стимулюючого фактора реєструють за змінами морфології та функціональної активності клітин інвертованої судинної стінки. Спосіб передбачає наступну послідовність експериментальних процедур:

1. Через торакальний відділ аорту піддослідної тварини інтенсивно промивають холодним фосфатним буфером (PBS), pH 7,4, видаляючи кров та моношар ендотелію, відділяють абдомінальну ділянку аорти та занурюють її в склянку з охолодженим PBS.

2. Ретельно видаляють сполучну та жирову тканини з зовнішньої поверхні фрагмента аорти.

3. Фіксують один з кінців фрагмента на стержні товщиною 3,5 мм.

4. Вивертають судину, насуваючи її на стержень, що забезпечує вільний доступ до інтими. Майже повне "злушення" ендотеліальних клітин під час цієї маніпуляції відкриває доступ до субендотелію.

5. Відрізають інвертований фрагмент артерії від закріпленого кінця та пересувають на середню частину стержня.

6. Видаляють залишки ендотелію з поверхні судини серією дотиків смужками фільтрувального паперу та додатковою промивкою охолодженим PBS.

7. Стержень з надягнутим фрагментом аорти вносять в перфузійну камеру, яку приєднують до системи циркуляції.

8. Встановлюють робочий діапазон тиску в системі та здійснюють стимуляцію клітин шляхом зміни гідралічного тиску чи внесенням адгезивних компонентів (клітин чи молекул).

9. По закінченні дослідження фрагмент піддають фіксації у 2,5 % розчині глутарового альдегіду в 0,1 М диметиларсиновокислому (какодилатному) буфері.

10. Після фіксації фрагмента судини оцінюють анатомічні і функціональні зміни стану ендотелію методами мікроскопії (електронної, скануючої, конфокальної), включаючи підрахунок клітин для якісної диференціації етапів адгезії та тромбоутворення.

Основним недоліком цього способу є повна відсутність ендотеліальних клітин на поверхні судинної стінки, що обумовлює його непридатність для вивчення ендотеліозалежних процесів. Крім того, даний спосіб передбачає реєстрацію клітинної відповіді однократно, після завершення терміну експозиції, та погано пристосований для дослідження динаміки процесів взаємодії ендотелію з компонентами перфузату.

Задачею способу, що заявляється, є розробка способу використання ізольованих фрагментів судини зі збереженням моношару клітин ендотелію, які залишаються структурною складовою судинної стінки, для забезпечення фізіологічної активації ендотелію та більш коректного відтворення в модельній системі *in vitro* таких ендотеліозалежних подій, як запалення чи оклюзія судини, які відбуваються в судинному руслі *in vivo*.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, що заявляється, фрагмент судини, на внутрішній поверхні якого зберігається моношар нативного ендотелію, піддають прямій перфузії в системі замкненої циркуляції біологічного розчину (перфузату) та здійснюють активацію нативного ендотелію протягом 1,5-3 годин шляхом однократного чи періодичного внесення в циркуляторне русло через спеціальний вхідний контейнер біохімічних прозапальних агентів; процес активації контролюють за динамікою накопичення в перфузаті молекулярного маркера запалення інтерлейкіну-6, який ендотеліальні клітини секретують у відповідь на стимулюючу дію прозапального агента. Концентрацію інтерлейкіну в біологічних зразках оцінюють за допомогою такого високочутливого методу, як твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA).

Технічним результатом корисної моделі є можливість відтворювати механізм фізіологічної активації ендотелію для моделювання процесів запалення, тромбоутворення і тромболілізу в судинному руслі.

Для виконання способу застосовується пристрій, фіг. 1, де зображена принципова схема пристрою для застосування ізольованих фрагментів судин у моделюванні ендотеліозалежних процесів.

Пристрій складається з наступних елементів. Герметичний вхідний контейнер 1, який має об'єм 1,5 мл (що складає приблизно половину робочого об'єму системи), призначений для заповнення системи перфузатом, для внесення індукторів запалення, активаторів чи інгібіторів зсідання крові та інших гуморальних факторів, а також для відбору проб. В прозору силіконову муфту 2 з внутрішнім діаметром 5 мм розміщують фрагмент судини 3. На відміну від найближчого аналога розчин Кребса вводять в замкнений об'єм муфти 2, де він не циркулює, а лише змочує зовнішню поверхню фрагмента судини та підтримує гомеостатичні умови його інкубації. Досягають герметичності захисної силіконової муфти 2 шляхом її закріплення металеви́ми затисками на гумових втулках 4 із зовнішнім діаметром 0,5 мм. Для з'єднання фрагмента 3 судини з системою циркуляції застосовують жорсткі конічні пластикові штуцери 5. Контейнер із перфузатом з'єднується з фрагментом судини через вихідний штуцер короткою проміжною з'єднувальною трубкою 6, утворюючи з ним єдиний блок. Замкнута система еластичних трубок 6, 7, 8, 9 загальною довжиною 750 мм із внутрішнім діаметром 1,5 мм забезпечує перфузію фрагмента судини 3 довжиною 30 мм. Циркуляцію перфузату в системі забезпечують за допомогою перистальтичного насоса 10. Конструкція пристрою передбачає використання багатоканального перистальтичного насоса 10, що дозволяє одночасно працювати з 2-3 фрагментами судин, що, в свою чергу, дає змогу стандартизувати умови для контрольних і дослідних варіантів. Даний пристрій дозволяє регулювати швидкість потоку та вивчати вплив реологічних факторів на досліджувані показники. Муфту 2 з фрагментом судини 3 і контейнером 1 розміщують у водяній бані 11, в якій підтримують фізіологічну температуру ($t=37^{\circ}\text{C}$).

Дана конструкція перфузійної системи дозволяє зберігати функціональну активність ендотелію судинної стінки протягом 3-х годин і більше. Вона забезпечує оптимальне співвідношення між площею внутрішньої поверхні судинного фрагмента та робочим об'ємом рідини в камері, що дозволяє реєструвати динаміку накопичення у розчині ендотеліальних факторів у відповідь на дію прозапальних індукторів.

Для пояснення суті розробки, що заявляється, нижче наведено приклади конкретного застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Моделювання гострої та хронічної прозапальної дії пероксиду водню на ендотелій аорти щура.

1. Відпрепаровують фрагмент аорти щура після введення тварині наркозу за стандартною процедурою. З цією метою на аорті вище фрагмента, що буде вилучений, виконують розріз в

верхній ділянці судини. Потім в розріз аорти вставляють пластикову канюлю, з'єднану гнучкою трубкою з медичним шприцем, заповненим розчином Кребса, нагрітим до 37 °С. На 4 см нижче першого розрізу виконують другий, після чого за допомогою медичного шприца обережно вводять теплий розчин Кребса у кількості, достатній для відмивання від крові ділянки, яка буде відпрепарована.

2. Після відмивання канюлю прибирають та відділяють фрагмент аорти по попередніх розрізах, притримуючи пінцетом за кінці та мінімально порушуючи шар сполучної тканини на його зовнішній поверхні. На пластикові штуцера обережно надягають судину. З іншого кінця на відстані 5 мм від кінців судини на штуцера надягають гумові втулки та фіксують на них муфту після надягання її на судину. Фрагмент судини розміщують в силіконовій муфті, попередньо надягнутий на вхідну з'єднувальну трубку. Ізольований у муфті фрагмент через зовнішні кінці штуцерів приєднують через контейнер 1 до системи циркуляції та розміщують в термостатовану камеру. Фрагмент орієнтують, враховуючи проксимальний та дистальний кінці, так, щоб відтворити фізіологічний напрямок потоку рідини. Подібним чином готують ще один, контрольний, фрагмент судин.

3. Підключають систему трубок до багатоканального насоса. Третій канал перистальтичного насоса використовують для холостої проби (замість судини використовують фрагмент трубки подібного діаметра та довжини).

4. За допомогою перистальтичного насоса 10 через контейнер 1 у систему циркуляції кожного фрагмента та в канал без фрагмента вносять 2,6-2,8 мл (що дорівнює робочому об'ємові даної перфузійної системи) дослідної рідини. Заповнюючи кожну систему циркуляції, слідкують, щоб з неї було повністю витиснене повітря. Після заповнення контейнер 1 кожної системи герметично закривають. Вмикають перистальтичний насос 10 та встановлюють робочу швидкість потоку.

5. Для стабілізації стану фрагментів судин забезпечують циркуляцію перфузату протягом 20 хв.

6. Через контейнер 1 замінюють розчин Кребса робочим розчином. Як робочий розчин (перфузату) використовують аутологічну сироватку щура у розведенні 1:1, яку отримують з крові, відібраної з аорти після розтину. Це може бути також фізіологічний розчин або буферна система, аутологічна плазма або сироватка піддослідного щура, плазма або сироватка людини, а також суспензія відмитих клітин крові щурів чи людини. Інкують фрагмент судини в режимі циркуляції робочого розчину протягом 10 хв.

7. Припинивши циркуляцію розчину, швидко відбирають з камери контрольні (фонові) проби.

8. Для моделювання гострого вливу через контейнер 1 однократно вносять 30 мкл 1 мМ розчину пероксиду водню, отримуючи кінцеву концентрацію 1-12 мкМ. Вмикають перистальтичний насос, фіксуючи час. Першу пробу відбирають на 30-й хв., з третьої по четверту - з інтервалом в 0,5 год. Для моделювання хронічного впливу вносять аналогічні об'єми пероксиду водню через 15, 30, 60, 90 та 120 хв. одразу після відбору проби. Розчин H_2O_2 додають разом з сироваткою, коли відновлюють її рівень в системі після чергового відбору проби (0,1 мл). Кожний дослід виконують протягом двох годин.

9. Активацію ендотелію визначають за накопиченням в циркулюючому розчині інтерлейкіну 6 (IL-6) - прозапального маркера активації ендотеліоцитів. Відібрані проби (по 0,1 мл) короткотерміново зберігають при -20 °С у замороженому стані до проведення аналізу на вміст IL-6. Концентрацію IL-6 визначають методом твердофазного імуоферментного аналізу з використанням тест-системи "Rat IL-6 HLISA" (Bender MedSystem GmbH, Austria).

Результати прикладу 1 подано на Фіг. 2, де зображено динаміка продукції інтерлейкіну IL-6 ендотелій аорти щура за умов одноразової періодичної дії пероксиду водню.

За допомогою способу, що заявляється, можливо за одноразового введення H_2O_2 підтримувати активований стан ендотелію протягом не менш ніж 90 хв., з максимальною відповіддю на 60 хв., після чого відбувається поступове затухання активаційного сигналу. За періодичного введення H_2O_2 встановлення максимального рівня продукції IL-6 прискорюється (40 хв.), а активований стан ендотелію підтримується не менш, ніж 2 год.

Приклад 2. Моделювання гострої та хронічної прозапальної дії тромбіну людини на ендотелій аорти щура.

1. Здійснюють препарування фрагментів аорти щура та підготовку перфузійної камери так, як описано в пунктах 1-3 прикладу 1.

2. Замінюють розчин Кребса робочим розчином (0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4). Інкують фрагмент судини в режимі циркуляції робочого розчину протягом 10 хв. Припинивши циркуляцію розчину, швидко відбирають з контейнера 1 контрольні (фонові) проби, вносять робочу дозу тромбіну і знов вмикають систему, фіксуючи час. Тромбін людини, для якого

властива самостійна прозапальна дія, в даному експерименті вводять з метою активації судинного ендотелію, який у відповідь на стимулюючий сигнал здатен підсилювати секрецію прозапальних агентів.

3. Реакцію ендотелію на прозапальну дію тромбіну відстежують за накопиченням в циркулюючому розчині інтерлейкіну 6 (IL-6) (див. пункт 7 прикладу 1). Для цього проби (по 0,2 мл) відбирають протягом трьох годин через кожні півгодини та короткотерміново зберігають у замороженому стані за температури -20 °C до проведення аналізу на вміст IL-6.

На Фіг. 3 зображена динаміка тромбін-індукованої продукції інтерлейкіну IL-6 ендотелій аорти щура за умов короткотривалої дії тромбіну (однократне введення на 30-й хвилині). Стрілкою на Фіг. 3 вказано момент введення тромбіну.

На Фіг. 4 зображена динаміка тромбін-індукованої продукції інтерлейкіну IL-6 ендотелій аорти щура за умов довготривалої дії тромбіну (рівень тромбіну відновлювали через кожні 30 хвилин). Стрілкою на Фіг. 4 вказано момент введення тромбіну.

В ході експерименту було з'ясовано, що у відповідь на однократне введення тромбіну ендотелій повільно підсилює продукцію IL-6 протягом першої години. Через 1,5 год. після введення тромбіну рівень IL-6 досягає максимальних значень, а потім швидко спадає (фіг. 3). Подібна реакція ендотелію розвивалась у відповідь на дію тромбіну людини в концентрації 7 NIH/мл, вдвічі зменшена доза (3,5 NIH/мл) була за межами порога активації, бо рівень маркера активації ендотелію майже не відрізнявся від фонового протягом всього часу експозиції (фіг. 3).

За умов періодичного введення тромбіну (п'ятикратне, з інтервалом 0,5 год., концентрація 10 NIH/мл) реакція ендотелію набуває періодичного характеру, про що свідчить два піки секреції IL-6 - через 0,5 год. та через 2 год. після введення тромбіну (фіг. 4).

Отже, запропонований спосіб дозволяє отримати кількісну оцінку відповіді інтактного ендотелію за допомогою IL-6, маркера активації ендотеліальних клітин, а, також, реєструвати зростання концентрації IL-6 в межах 10-30 % від фонового рівня. За допомогою заявленого способу можна відтворювати механізм фізіологічної активації ендотелію для моделювання процесів запалення, тромбоутворення і тромболілізу в судинному руслі.

Джерела інформації:

1. Fazel S., Weisel R. D., Verma S. A novel technique to assess flow-mediated vasodilation.// J. Am. Coll. Cardiol., 2004; 44:1478-1480.

2. Semeraro N., Colucci M. Changes in the coagulation-fibrinolysis balance of endothelial cells and mononuclear phagocytes: role in disseminated intravascular coagulation associated with infectious diseases //Intern. J. Clinic. & Lab. Research. - Vol. 21, N 2-4. - P. 214-220.

3. Simoncini S, Njock M.S, Robert S, Camoin-Jau L, Sampol J, Harile J.R, et al. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. Circ Res 2009; 104:943-951.

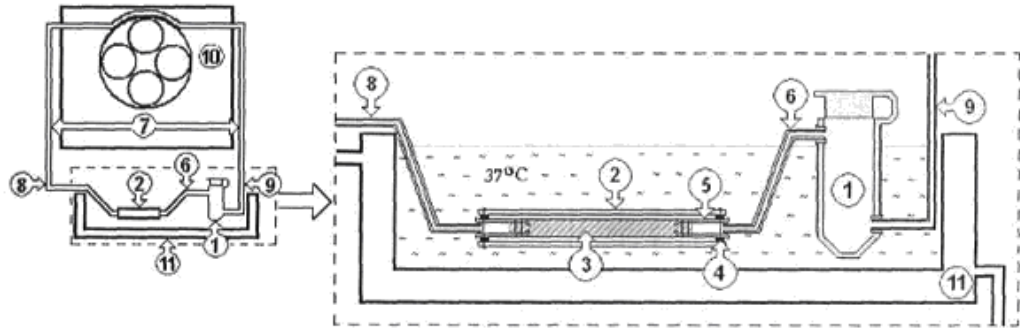
4. Sironi M, Breviario F, Proserpio P, Biondi A, Vecchi A, Van Damme J, Dejana E, Mantovani A. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells.// J. Immunol.-1989.-142(2). - P. 549-53.

5. Ross, R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. II J. Cell Biol-1971.-50. - P. 172-186.

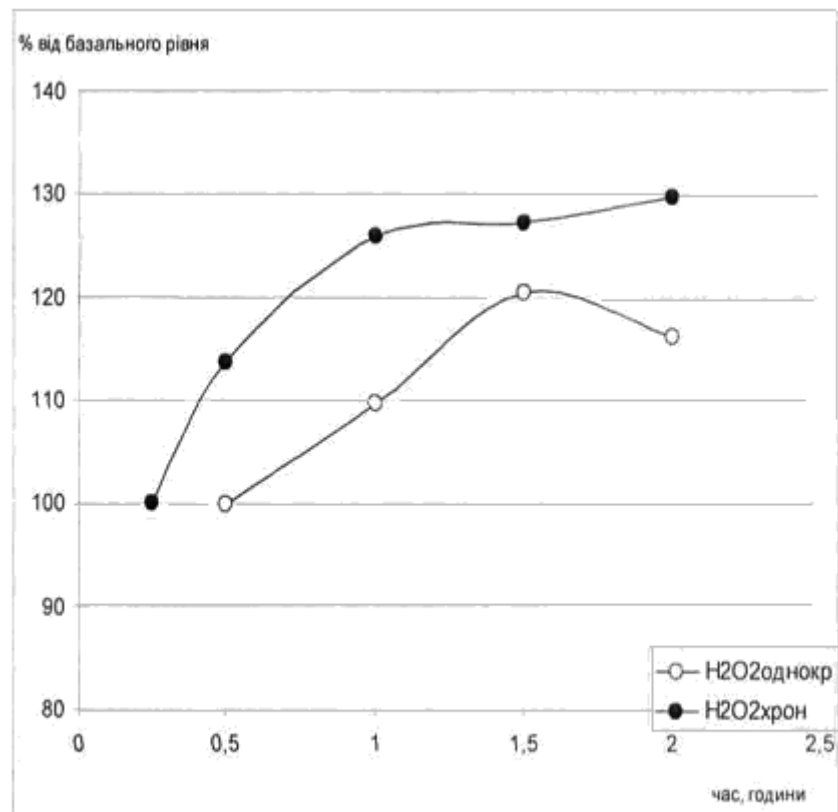
6. Sakariassen K.S., Muggli R., Baumgartner H. R. Measurements of Platelet Interaction with Components of the Vessel Wall in Flowing Blood // Methods in enzymology. 1989. - Vol. 169. - P. 37-70.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

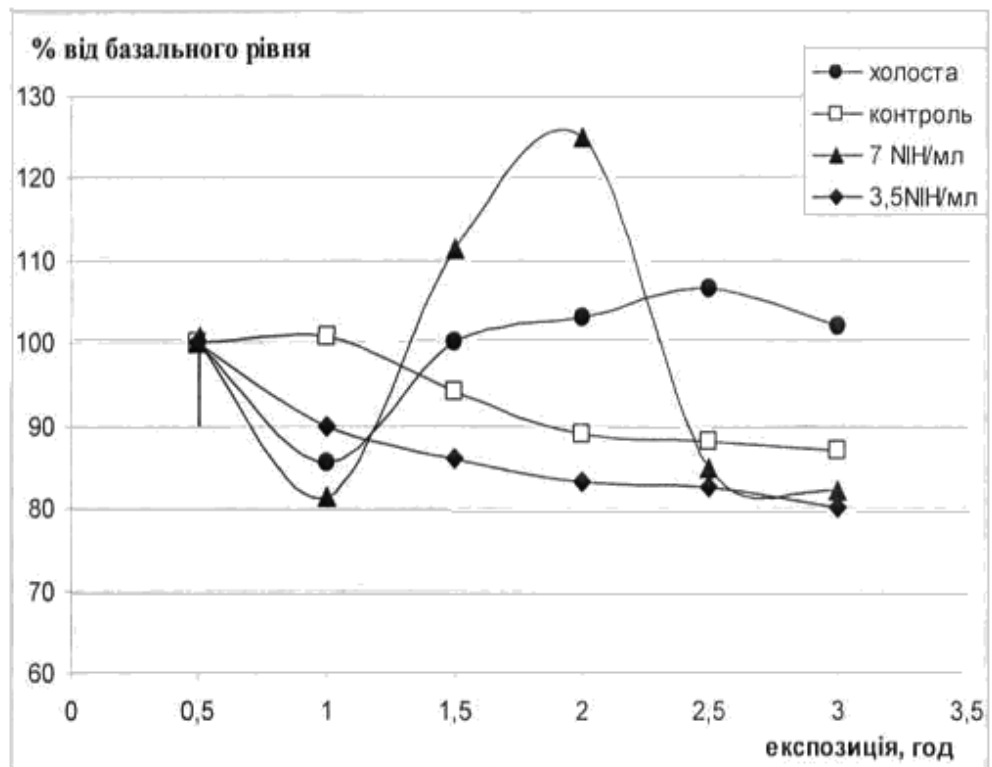
Спосіб активації ендотелію ізольованих фрагментів судин для моделювання ендотеліозалежних процесів, що включає ізоляцію фрагмента судини, відмивання його буферним розчином, фіксацію фрагмента судини в системі замкнутої циркуляції, перфузію фрагмента судини біологічним розчином, стимуляцію клітин ендотелію на внутрішній поверхні фрагмента судини та реєстрацію клітинної відповіді, який **відрізняється** тим, що в ньому здійснюється пряма перфузія біологічним розчином фрагмента судини зі збереженим моношаром ендотелію, а також стимуляція клітин ендотелію протизапальними біохімічними агентами - пероксидом водню та тромбіном, реєстрація клітинної відповіді за накопиченням в перфузаті інтерлейкіну IL-6, при цьому ізольований фрагмент судини містить моношар ендотеліальних клітин у функціонально активному стані.



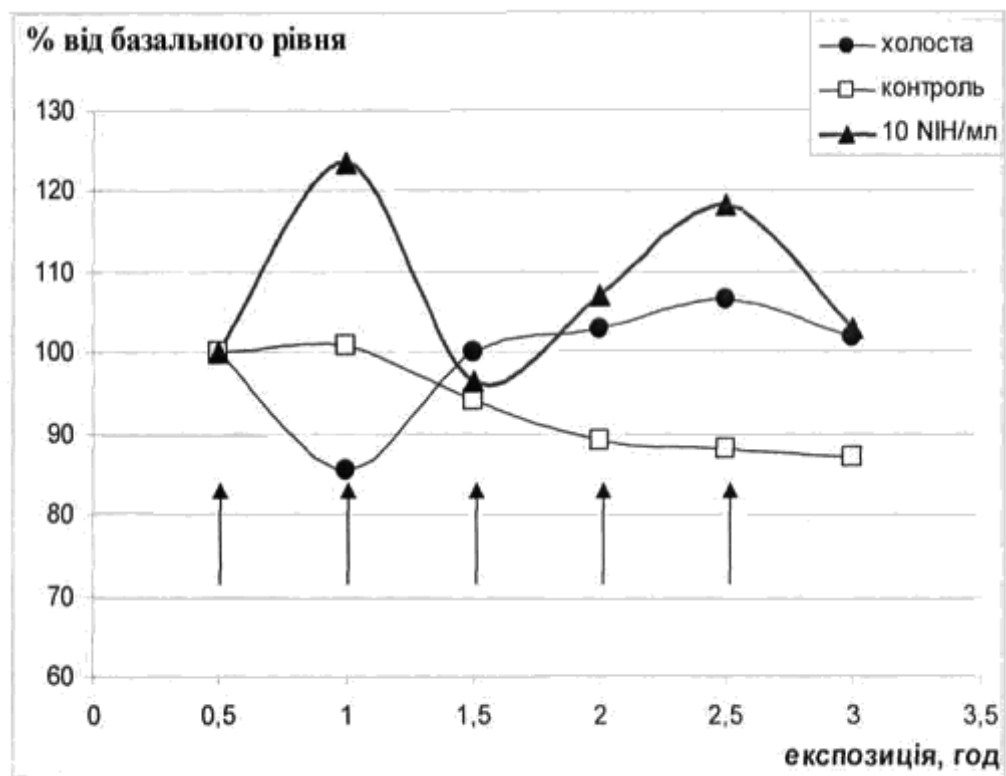
Фиг. 1



Фиг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601