



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **88624** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
G09B 23/28 (2006.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 11817	(72) Винахідник(и): Грицевич Назар Романович (UA), Заячківська Оксана Станіславівна (UA), Гжегоцький Мечислав Романович (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.10.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2014	(73) Власник(и): ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2014, Бюл.№ 6	

(54) СПОСІБ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛЮВАННЯ НЕЕРОЗИВНОГО ПОШКОДЖЕННЯ СТРАВОХОДУ IN VIVO ЗА ВМІСТОМ СІРКОВОДНЮ (H₂S)

(57) Реферат:

Спосіб експериментального моделювання неерозивних пошкоджень стравоходу in vivo включає індукцію пошкоджень стравоходу. При цьому пошкодження стравоходу моделюють за вмістом сірководню (H₂S) шляхом одноразового введення інгібіторів цистатіонін-γ-ліази (CSE) та цистатіонін-β-синтази (CBS), L-триптофану та донора синтезу сірководню сульфід натрію (NaHS) за 0,5 год. до індукції водно-імобілізаційного стресу.

UA 88624 U

Корисна модель належить до медицини та фізіології травлення, а також експериментальної гастроентерології, і може бути використана в гастроентерологічних доклінічних чи трансляційних дослідженнях шляхом моделювання превиразкових ушкоджень слизової оболонки стравоходу, які співвідносні з такими, що виникають при гастроєзофагеальній рефлюксній хворобі, зокрема при неерозивній рефлюксній хворобі стравоходу (НЕРХ).

Гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ) - хронічне гастроентерологічне захворювання, що за поширеністю перевищує пептичну виразку та часто з невідомих причин призводить до розвитку карцином [1]. В ульцерогенезі слизової оболонки стравоходу (СОС) важливу роль відіграють численні прозапальні чинники [2], а процес загоєння пошкодження СОС зумовлений клітинними та молекулярними механізмами, пов'язаними з підепітеліальним компонентом бар'єрної функції стравоходу. Зміна проникності судин СОС спричиняє дисфункцію епітеліального бар'єру за умов моделювання як топічних уражень кислотнопепсинового і алкалічно-біліарного, так і стрес-індукованого генезу [3]. Враховуючи значення вазоактивних чинників цитопротекції, особлива роль належить ендогенним газотрансмітерам: оксиду азоту, монооксиду вуглецю, сірководню (гідроген сульфід, H_2S), які легко дифундують через мембрани у клітини та змінюють їхні функції. Особливу увагу привертає H_2S , біосинтез якого залежить від активності цистатіонін- γ -ліази (від англ.: cystathionine γ -lyase, CSE), цистатіонін- β -синтази (від англ.: cystathionine β -synthetase, CBS) і який бере участь у регулюванні судинного тону, передачі нервових імпульсів та секреції інсуліну [4]. Відомо, що H_2S є ключовою сигнальною молекулою плейотропних механізмів, які контролюють лейкоцитарно-ендотеліальну адгезію, запальні реакції, апоптоз, а також репарацію за рахунок зміни експресії циклооксигенази II [5], виявлено його фізіологічну роль у ноціцепції, секреторній та моторно-евакуаторній функціях травної системи [6]. Проте роль H_2S у езофагоцитопротекції не з'ясована. В останні роки було доведено причетність порушень функціонування L-триптофан-серотонін-мелатонінової системи у регулюванні фізіологічних функцій в організмі, було встановлено роль мелатоніну у забезпеченні бар'єрної функції стравоходу та обґрунтовано раціональність її терапевтичного потенціалу для езофагопротекції [7]. Серед мішеней дії цієї системи особливе місце займає модуляторний контроль редокс статусу, протизапальна дія та вазотропна дія, проте ефект її донора L-триптофану на СОС на тлі змін транссульфування залишається невідомим.

Серед доклінічних технік привертають увагу експериментальне моделювання ГЕРХ з використанням перфузування стравоходу через спеціальний катетер кислотними розчинами та жовчі або їхньої комбінації [8], хірургічні втручання, наприклад сіалоаденектомія, [9] тощо чи дослідження, проведені на культурі клітин стравоходу *ex vivo* або *in vitro* [10].

До головних недоліків проаналізованих моделей належать складність оперативної техніки, тривалість експерименту, дороге обладнання, залучене в дослідженні, та погана відтворюваність на доступних лабораторних тваринах, а також характер пошкоджень СОС (виразково-ерозивний езофагіт), що не дозволяє дослідити ранні ознаки ураження стравоходу, а саме преерозивні зміни. Дослідження за умов *ex vivo* або *in vitro* не дозволяють прослідкувати комплексні зміни в стравоході та механізми розвитку дисфункцій на системному рівні в організмі, що беруть участь в патогенезі ГЕРХ. Вищезначене обумовило завдання подолати наявні несприятливі труднощі і розробити доступний спосіб експериментального моделювання ураження СОС, що за структурно-функціональними характеристиками був би співвідносний з ураженнями епітеліального бар'єру стравоходу, що виникають під час ГЕРХ.

Найближчим аналогом є спосіб моделювання *in vivo* неерозивного пошкодження стравоходу у C57BL/6 мишей, що являють собою лабораторний вид генетично модифікованих мишей з ослабленою імунною системою, яких годували специфічною дієтою з обмеженим вмістом цинку та додаванням гідрофобних жовчних кислот та дезоксихолевої кислоти [11]. Недоліком його є індукція пошкоджень стравоходу, що є аналогом розвитку та прогресування ГЕРХ до стравоходу Барретта, без врахування патогенетичних механізмів зниження резистентності епітеліального бар'єру стравоходу, в основі яких зміни проникності судин та індукція запалення. Цим способом неможливо визначити передумови та етіологію змін вазотропного компоненту СОС до дії екстремального навантаження. Ще одною вадою цього способу є висока кошторисна вартість, що включає видатки на специфічних тварин, догляд за ними впродовж 69 днів експерименту.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб експериментального моделювання неерозивного ураження стравоходу *in vivo* шляхом модифікації біосинтезу сірководню (H_2S), що призведе до змін цитопротекції та резистентності епітеліального бар'єру, появи неерозивних пошкоджень, що за структурно-функціональними характеристиками будуть співвідносними до змін стравоходу під час НЕРХ і ГЕРХ.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі експериментального моделювання неерозивних пошкодження стравоходу *in vivo*, що включає індукцію пошкоджень стравоходу, згідно з корисною моделлю, пошкодження стравоходу моделюють за вмістом сірководню (H_2S) шляхом одноразового введення інгібіторів цистатіонін- γ -ліази (CSE) та цистатіонін- β -синтази (CBS), L-триптофану та донора синтезу сірководню сульфиду натрію (NaHS) за 0,5 год. до індукції водно-імобілізаційного стресу.

Поставлена задача вирішується також тим, що вводять внутрішньоочеревинно інгібітор CSE-DL-пропаргілгліцин у дозі 25 мг/кг, інгібітор CBS - О-карбоксиметил-гідроксиламіну геміхлорид - у дозі 3 ммоль/л та донор синтезу H_2S NaHS - у дозі 100 ммоль/кг, L-триптофан вводять з їжею у дозі 400 мг/кг.

Інструментом досліджень значення газотрансмітерів, згідно з сучасною методологією, є блокада ензимів (для H_2S -CSE і CBS), від яких залежить їх синтез, або додаткове введення відповідного донору (для H_2S -NaHS), що збільшує продукцію газотрансмітеру [12]. У запропонованій корисній моделі застосовують блокаду дії ензимів CSE і CBS, від яких залежить синтез сірководню H_2S , природного компоненту цитопротекції, шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення інгібітора CSE-DL-пропаргілгліцин (від англ.: *propargylglycine*, PAG) та інгібітора CBS - О-карбоксиметил-гідроксиламіну геміхлорид (від англ., *O-carboxymethyl-hydroxylamine hemihydrochloride*, CHH) та донора синтезу сірководню - сульфиду натрію (NaHS) за 0,5 год. до індукції водно-імобілізаційного стресу.

Запропонований спосіб дозволяє *in vivo* дослідити роль H_2S у цитопротекції та резистентності СОС для індукції неерозивних стрес-асоційованих пошкоджень за умов моделювання його біосинтезу, використовуючи інгібітори, L-триптофан (L-Тру) та донор синтезу сірководню - екзогенний NaHS.

Експериментальні дослідження проілюстровані графічними зображеннями (мікрофотографіями): на фіг. 1 відображена СОС у тварин контрольної групи без ознак пошкодження; на фіг. 2 - індукція стресу у тварин із застосуванням CHH; на фіг. 3 - дія PAG на підслизову основу; на фіг. 4 - преерозивні зміни СОС на тлі блокади синтезу H_2S ; на фіг. 5 - введення NaHS поверхневий шар епітелію, підслизову основу, ІПС; на фіг. 6 - вплив використання L-Тру на пухку сполучну тканину, ІПС та ІЕВ; на фіг. 7 - поверхневий епітеліальний шар та роговий шар без виявлених змін; на фіг. 8 - вплив індукції L-Тру на підепітеліальний компонент СОС; на фіг. 9 - вплив поєднаної дії NaHS і L-Тру на підслизову основу СОС.

Неерозивне пошкодження стравоходу моделюють шляхом 3,5-годинного водно-імобілізаційного стресу за Takagi, 1964, у щурів, що отримували 0,9 % розчин NaCl 1,0 мл (як плацебо), L-триптофан 400 мг/кг та інгібітори CSE, пропаргілгліцин, PAG (25 мг/кг), CBS, карбоксиметил-гідроксиламін геміхлорид (CHH, 3 ммоль/л), донор біосинтезу H_2S , NaHS (100 ммоль/кг) за 0,5 год. до індукції стресу. Тварин виводили з експерименту під анестезією кетаміном (60 мг/кг⁻¹). Для визначення важкості неерозивного пошкодження гістоморфометричним аналізом досліджували індекси епітеліальної пластинки та зміни підепітеліальних структур нижньої третини стравоходу за візуально-аналоговою шкалою.

Подвійні, рандомізовані морфо-функціональні дослідження слизової оболонки нижньої третини стравоходу проводили на нелінійних щурах-самцях (n=70) масою 170-200 г, згідно з прийнятими міжнародними етичними принципами роботи ("Правила проведення робіт з використанням лабораторних тварин", 2007) та відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985).

Тварин розділили на групу контролю (інтактні) та таких, які не отримували або отримували з їжею L-триптофан (L-Тру) у дозі 400 мг/кг маси (в-во "Sigma", США) впродовж 7 днів. Для індукції уражень СОС щурам індукували водно-імобілізаційний стрес (BIC, модель Takagi, 1964) з попередньою 12 год. депривацією від їжі та вільним доступом до води. Для моделювання зміни цитопротекції шляхом модифікації активності транссульфування застосовували введення фізрозчину (1,0 мл 0,9 розчину NaCl) внутрішньоочеревинно (в.о.), PAG у дозі 25 мг/кг, в.о., CHH, 3 ммоль/л, в.о., та донор синтезу H_2S NaHS у дозі 100 ммоль/кг (усі препарати - в-во "Antibe Therapeutics", Канада). Для виведення тварин з експерименту застосовували кетамін у дозі 25 мг/кг, в.о. Для морфо-функціонального аналізу гістологічний матеріал нижньої третини стравоходу та місця переходу стравоходу в шлунок фіксували у 4 % нейтральному формаліні, серійні гістологічні зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксиліном і еозином (ГЕ) та здійснювали візуалізацію з використанням мікроскопа Swift Instruments International (Японія) і цифрової відеокамери Echoo-Imager 5020200 Microscope Digital Eyepiece (Китай). Стан бар'єрної функції стравоходу оцінювали за морфо-функціональним аналізом відповідно до візуально-аналогової шкали (ВАШ) з урахуванням таких кількісно-якісних критеріїв: 1) стан епітеліальної

вистилки за індексом альтерації (IEB): 0 - зміни відсутні, 1 - розволокнення рогового шару, 2 - вогнищева базофілія мас кератину, 3 - десквамація рогових мас, вакуолізація клітин базального шару, везикулярні ядра; 2) стан підепітеліальних структур за індексом їхніх змін (ІПС): 0 - зміни відсутні, 1 - дифузний набряк підслизової основи, 2 - виражений нерівномірний набряк підслизової основи та незначна інфільтрація, 3 - виражений набряк та дезорганізація підслизової основи, периваскулярні або субепітеліальні інфільтрати, периваскулярні крововиливи; 3) стан м'язової оболонки за проявами некрозу: 0 - зміни відсутні, 1 - каріорексис, каріопікноз, 2 - фокальний некроз; 3 - генералізований некроз.

Ступінь змін епітеліальної пластинки та підепітеліальних структур СОС у препаратах оцінювали мофрометричним аналізом у відносних одиницях згідно зі стандартною шкалою за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA "Image Tool for Windows. Version 2.00" (США). Ступінь пошкодження СОС обраховували шляхом визначення (у відсотках) відношення товщини ділянки ушкоджень епітеліального компонента та підепітеліальних структур (у відносних одиницях) до товщини епітеліального бар'єру. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за допомогою програми "Statistica 5,5" (США) з обчисленням середньоарифметичного і стандартного відхилення та похибки середніх значень, порівняння середніх значень двох вибірок за допомогою t-критерію, $p < 0,05$ вважали статистично вірогідними.

Ознаки пошкодження СОС у тварин контрольної групи були відсутні (фіг. 1), індукція стресу у тварин із застосуванням СНН призвела до зникнення папілярного рисунку СОС, IEB мав двобальні пошкодження, судини мікроциркуляторного русла у підслизовій основі заповнені агрегатами еритроцитів, м'язова оболонка мала однобальні ознаки деструктивного характеру за ВАШ (фіг. 2), тоді як дія PAG ініціювала виразний набряк підслизової основи, периваскулярні або субепітеліальні інфільтрати, периваскулярні крововиливи, що реалізувалось у збільшенні ІПС до трибальних пошкоджень і свідчило про суттєві зміни проникності судин, інфільтрацію лейкоцитами (фіг. 3). Простежено звуження просвіту стравоходу внаслідок набряку підслизової основи та заповнення його десквамованими елементами поверхневого шару, що в літературі описуються як виразні преерозивні зміни СОС і трактуються як ознаки неерозивного ураження [13]. На тлі блокади синтезу H_2S також було виявлено деструктивні двобальні зміни м'язової оболонки за ВАШ, особливо зовнішнього шару (фіг. 4), порівняно до контролю, які ініціюють зміни моторики нижнього стравохідного сфінктеру та збільшення експозиції СОС до шлункового вмісту. Введення $NaHS$ характеризувалось помірним папілярним рисунком, відсутністю десквамацій у просвіті, поверхневий шар епітелію посилено кератинізований, у підслизовій основі ознаки набряку помірні, ІПС був однобальним за ВАШ, відсутні ознаки ураження м'язової пластинки, порівняно до дослідних груп з блокадою активності H_2S , що свідчило про езофагопротекторну дію та адаптивно-компенсаторні ознаки посилення бар'єрної функції стравоходу (фіг. 5).

Використання L-Тру характеризувалось зменшенням геморагічних ознак, дезорганізації пухкої сполучної тканини, для ІПС та IEB були характерні однобальні пошкодження (фіг. 6), деструктивних змін поверхневого епітеліального шару та десквамації рогового шару не простежено (фіг. 7). Виявлено, що L-Тру індукує збільшення товщини підепітеліального компонента СОС (фіг. 8).

Поєднання дії $NaHS$ і L-Тру призвело до того, що у підслизовій основі СОС виявлено багато судин мікроциркуляторного русла, що було розцінено як свідчення вазотропного ефекту цих засобів (фіг. 9). У м'язовій оболонці, на тлі відсутності ознак її деструкції, також зафіксовано збільшення кількості судин, що підтверджується даними літератури про участь H_2S в ішемічному прекодиціонуванні, та прояви дії інших вазодилаторних газотрансмітерів [14, 15].

Неерозивні стрес-індуковані пошкодження характеризувалися підепітеліальними та епітеліальними змінами зі збільшенням їх індексів за ВАШ, порівняно до контролю. Встановлено, що за блокади синтезу H_2S , порівняно з групою контролю, збільшилися пошкодження СОС у вигляді виразного ураження підепітеліальних структур, зростання набряку, лейкоцитарної інфільтрації, змінилася товщина СОС: відбувся перерозподіл товщини епітеліальної вистилки та підепітеліальних структур, фокальних змін у м'язовій оболонці, що підтверджує розвиток неерозивного ураження стравоходу [15]. Показано, що введення L-Тру реалізувалось шляхом достовірних цитопротекторних та вазотропних ефектів ($p < 0,05$). Донор сірководню спричинив зменшення субепітеліальних пошкоджень, лейкоцитарну інфільтрацію, вказуючи на зменшення проникності судин та запалення.

Отримані дані вказують на важливість функціонування газотрансмітера H_2S у забезпеченні функціонування ендотелію та проникності судин СОС, оскільки зміна каталітичної активності головних ензимів його біосинтезу призводить до структурно-функціональної дезорганізації

підепітеліальних структур, що спричиняє ураження м'язової оболонки, запалення та геморагічні зміни в епітеліальному бар'єрі стравоходу. Натомість вплив донора синтезу H_2S призводить до оптимального кровопостачання СОС та збереження цілісності бар'єрної функції стравоходу, а дія L-Тру та H_2S нівелює стрес-асоційований цитодеструктивний вплив на СОС, вказуючи на їхні потенційні захисні властивості.

Ендогенно утворений сірководень виконує важливу фізіологічну роль у забезпеченні цитопротекції слизової оболонки стравоходу і є компонентом її локальної стрес-лімітуючої системи.

Доведено результатами морфологічних та морфометричних досліджень слизової оболонки нижнього відділу стравоходу, що механізм дії газотрансмітера H_2S полягає у зменшенні проникності судин та запалення, викликаючи зменшення ознак стрес-асоційованого неерозивного пошкодження та дисмоторики нижнього сфінктера стравоходу.

Отже, показано причетність ендогенного H_2S до захисних реакцій у езофагопротекції шляхом зменшення підепітеліальних пошкоджень та проникності судин. L-триптофан запобігав розвитку стрес-асоційованого неерозивного ураження стравоходу. Таким чином, результати дослідження є важливим свідченням про новий механізм у езофагопротекції та функціонуванні нижнього стравохідного сфінктеру.

Езофагопротекторний ефект L-триптофану та сірководню може бути найближчим аналогом для створення нових високоефективних езофагопротекторних лікарських засобів.

Джерела інформації:

1. Caliendo G., Cirino G., Santagada V., Wallace J.L. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H_2S): development of H_2S -releasing drugs as pharmaceuticals. *J Med Chem.* 2010 Sep 9;53(17):6275-86.

2. Hiroyuki E., Katsunori I., Kiyotaka A. et al. Exogenous luminal nitric oxide exposure accelerates columnar transformation of rat esophagus. *Jap Exposure Int. J. Cancer:* 2010 127, 2009-2019.

3. Hrytsevykh N., Zayachkivska O., Gzregotsky M. Morphofunctional reorganization of epithelial barrier of esophagus under binary blockade of cyclooxygenase of 1/2 and 5-lipoxygenase in diabetic rats. *Bull Biol Medic Probl Ua* 2011; 2(Suppl. 2): 65-66.

4. Hrytsevykh N., Zayachkivska O., Yaschenko A., et al. Search for new endothelial dysfunction markers in nonerosive esophagitis against the backdrop of postprandial glycaemia and the influence of L-tryptophan. *Pract Med Ua* 2012; XXVIII 29-38.

5. Konturek S., Zayachkivska O., Havryluk X., et al. Protective influence of melatonin against acute esophageal lesions involves prostaglandins, nitric oxide and sensory nerves. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58(Suppl. 2): 361-387.

6. Predmore B.L., Lefer D.J., Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal.* 2012 July 1; 17(1): 119-140.

7. Wallace J.L. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-enteropathy. *World J Gastroenterol.* 2013 March 28; 19(12): 1861-1876.

8. Wallace J.L., Ferraz J.F., Muscara M.N. Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury. *Antioxid Redox Signal.* 2012 July 1; 17(1): 58-67.

9. Zayachkivska O. Physiopathology of esophageal inflammation, ulcerogenesis and repair by studying the profile of glycoconjugate // *Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection in the Gastrointestinal Tract: Mechanisms, Prevention and Treatment/ Front Gastrointest Res.* - Basel, Karger 2012; 30: 148-160.

10. Zayachkivska O. Role of endogenous salivary bioregulators in forming esophagus protection in experimental injury of esophagus. *Contemporary Gastroenterol*, 2006; 4: 65-71.

11. Lee M.J., Song H.J., Jeong J.Y., et al. Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects of QGC in Cultured Feline Esophageal Epithelial Cells *Korean J Physiol Pharmacol.* 2013 Feb;17(1):81-87.

12. Guy N.C., Garewal H., Holubec H., et al. A Novel Dietary-Related Model of Esophagitis and Barrett's Esophagus, a Premalignant Lesion. *Nutr Cancer.* 2007;59(2):217-27.

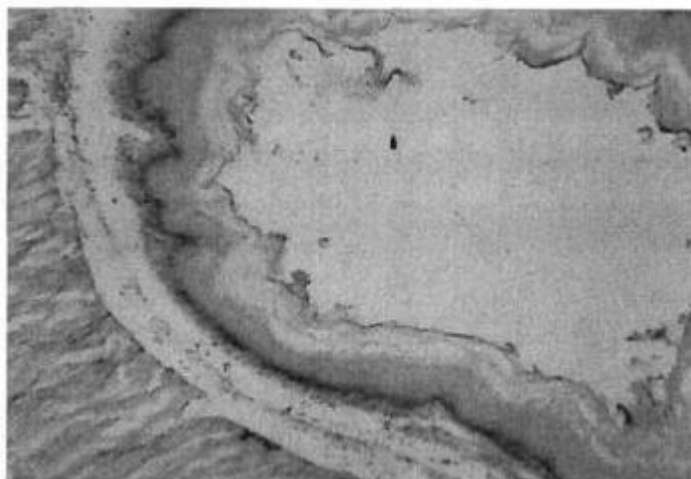
13. Zayachkivska O. Role of NO-mediated mechanism in resistance of mucosa of esophagus. *Ukr Med Almanac* 2006; 9 (Suppl. 6): 48-49.

14. Zayachkivska O., Gzregotsky M., Ferentc M. et al. Effects of nitrosative stress and reactive oxygen-scavenging systems in esophageal physiopathy under streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 (Suppl. 2): 77-87.

15. Zayachkivska O., Hrycevykh N., Zvir M. Effect of proinflammatory cytokine-mediated mechanism of quality of gastrointestinal restitutio ad integrum. *Annales UMCS* 2010; 28 (8): 211-214.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

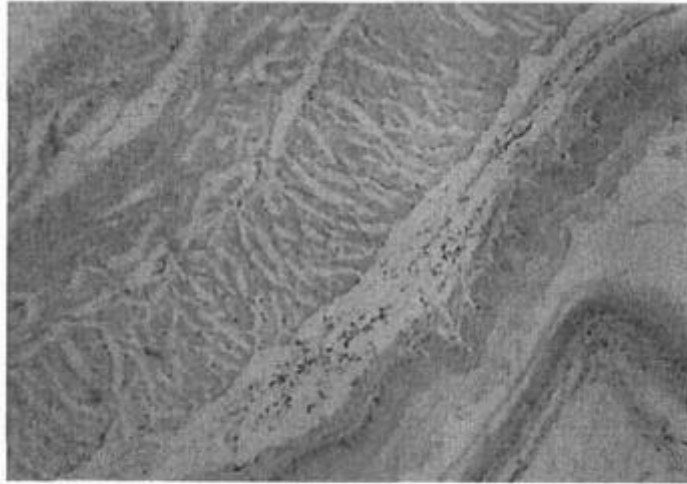
- 5 1. Спосіб експериментального моделювання неерозивних пошкоджень стравоходу *in vivo*, що включає індукцію пошкоджень стравоходу, який **відрізняється** тим, що пошкодження стравоходу моделюють за вмістом сірководню (H_2S) шляхом одноразового введення інгібіторів цистатіонін- γ -ліази (CSE) та цистатіонін- β -синтази (CBS), L-триптофану та донора синтезу сірководню сульфід натрію (NaHS) за 0,5 год. до індукції водно-імобілізаційного стресу.
- 10 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вводять внутрішньоочеревинно інгібітор CSE - DL-пропаргілгліцин у дозі 25 мг/кг, інгібітор CBS - О-карбоксиметил-гідроксиламіну геміхлорид - у дозі 3 ммоль/л та донор синтезу H_2S NaHS - у дозі 100 млмоль/кг, L-триптофан вводять з їжею у дозі 400 мг/кг.



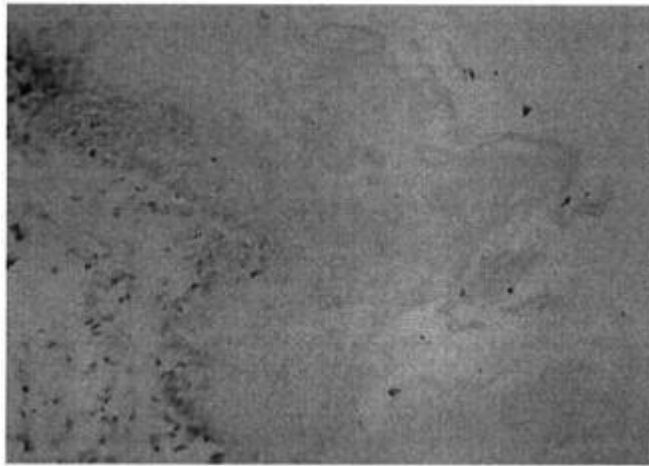
Фіг. 1



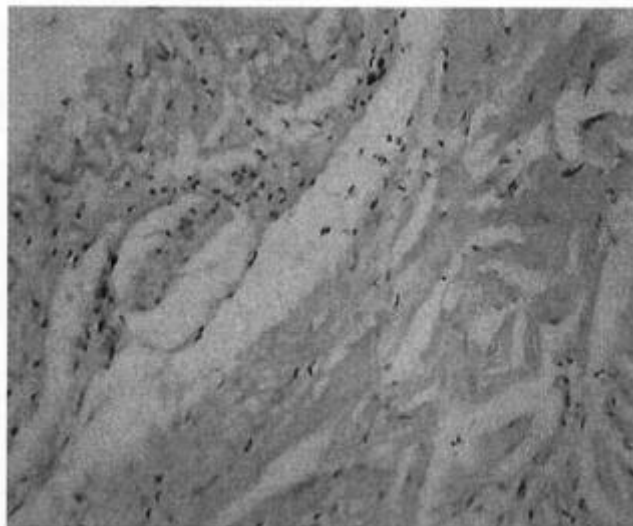
Фіг. 2



Φir. 3



Φir. 4



Φir. 5

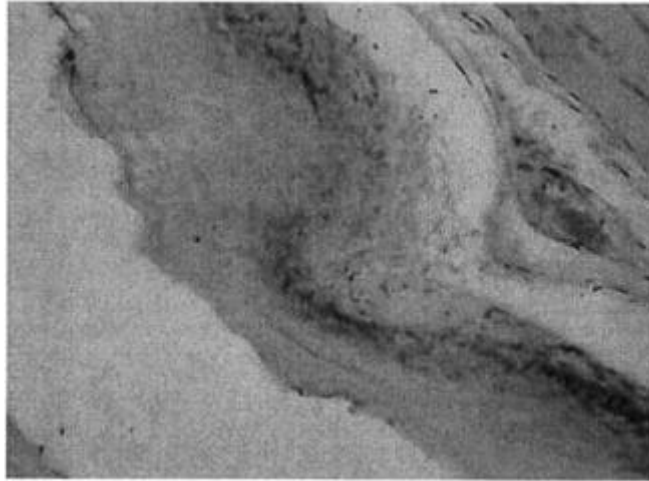


Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8

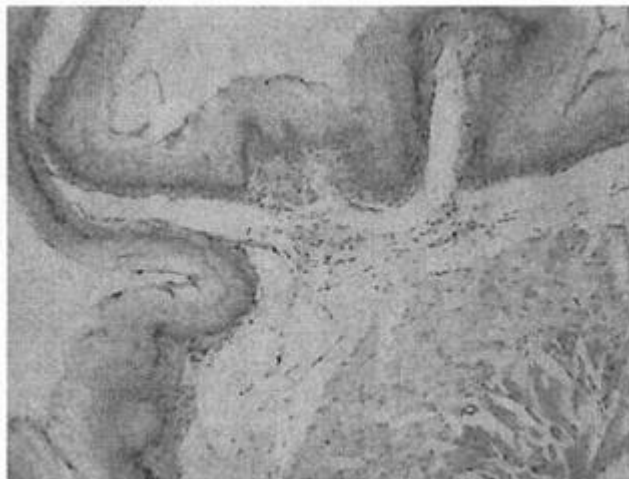


Fig. 9

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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