



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **117425**

(13) **U**

(51) МПК

G09B 23/28 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 00340**

(22) Дата подання заявки: **12.01.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **26.06.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **26.06.2017, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):

**Турчіна Наталія Степанівна (UA),
Савосько Сергій Іванович (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
бул. Шевченка, 13, м. Київ, 01601 (UA)**

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧНОГО УРАЖЕННЯ АОРТИ У МИШЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей включає призначення "холестеринової дієти". До раціону "холестеринової дієти" додають мерказоліл 10 мг на 100 г дієти та карбонат кальцію (CaCO_3) 1 г на 100 г дієти, ці компоненти додають зранку впродовж 12-14 тижнів, а після обіду догодовують стандартним комбікормом. По закінченню терміну годування у тварин визначають атеросклеротичні зміни стінки судин шляхом гістохімічного виявлення ліпідних включень у фронтальних зрізах аорти та скануванням внутрішньої поверхні судин секційних зразків аорти.

UA 117425 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до неврології, і може бути використана при моделюванні атеросклеротичного ураження аорти у мишей для запобігання розвитку інсульту.

Відомий зв'язок розвитку інсульту та атеросклеротичних змін судинної стінки. За даними ВООЗ серцево-судинні захворювання, в основі яких лежить явище атеросклерозу, найчастіше стають причиною інвалідності та летальних наслідків для населення планети (1). Атеросклероз визначають як поліетіологічне хронічне захворювання, яке характеризується накопиченням внутрішньоклітинних та позаклітинних ліпідів, іонів кальцію, елементів сполучної тканини та клітин системи крові у стінках артерій з утворенням бляшок (ліпідних смужок), що в кінцевому випадку може спричинити звуження або повне закриття просвіту судини (2, 7). Для зазначеної хвороби властивий прогресуючий розвиток структурних змін стінки судин і ускладнень.

Сьогодні домінують дві гіпотези розвитку та становлення атеросклерозу: ліпідно-інфільтративна гіпотеза та гіпотеза "відповідь на пошкодження", які в принципі не є протиріччями та за багатьма ознаками доповнюють одна одну при поясненні різноманітних процесів, що спостерігаються при атеросклерозі (3).

Декілька можливих причин розвитку атеросклерозу, серед яких гіперхолестеринемія (підвищений рівень холестеролу у крові), зміна співвідношення ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) та ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), а також дисфункція ендотелію (4). Водночас все більше науковців схилиються до думки про комплексну дію зазначених патологій, підкреслюючи, що визначальну роль у накопиченні атеросклеротичних відкладень має порушення проникності ендотелію (4, 5, 6). Ендотеліальні клітини продукують фактори росту та експресують молекули адгезії, внаслідок чого відбувається активація моноцитів - вони мігрують у зону ураження та перетворюються на макрофаги. Макрофаги у свою чергу поглинають велику кількість ЛПНЩ з утворенням модифікованих-ЛПНЩ (м-ЛПНЩ) або пінистих клітин. Така послідовність чинників зрештою призводить до формування осередку структурних змін у стінці судини (2,5). Найчастіше депозити реєструють у дузі аорти, брахіоцефальних та сонних артеріях, що у свою чергу робить їх вдалими модельними об'єктами (9, 10), серед яких саме на аорті зосереджена основна увага. Науковці виділяють стабільні та нестабільні атеросклеротичні відкладення (бляшки). Нестабільні відкладення спричиняють захворювання артерій. Це відбувається за рахунок утворенню тромбу (частини бляшки), який, потрапляючи у вузькі ділянки судин, здатен блокувати процес кровопостачання, у такий спосіб формуючи ішемію або інсульт (8).

В літературних джерелах описано значну кількість стандартизованих моделей відтворення атеросклеротичного ураження аорти. Разом з тим не всі вони є зручними у моделюванні та мають різні дані щодо підтвердження структурних змін в судинах.

Відомий спосіб відтворення (моделювання) атеросклеротичного ураження аорти з використанням моделі гіперліпідемії, не очікуючи структурних змін в аорті (3). Такий метод є загально визнаним для дослідження дії препаратів, що регулюють ліпідний обмін, але цей спосіб не дає підтвердження структурних змін в судинах за час моделювання.

Відомі способи моделювання атеросклеротичного ураження аорти з використанням нокаутних тварин, високочутливих до "холестеринової" - атерогенної дієти.

Найближчим аналогом (прототипом) з використанням нокаутних тварин вибраний спосіб моделювання атеросклеротичного ураження аорти, який відтворений у мишей шляхом призначення "холестеринової" дієти" (3) з використанням холестеролу, довголанцюгових жирних кислот та холевої кислоти або її солі.

Але цей спосіб не дозволяє отримати швидкого та значимого формування атеросклеротичних змін в аорті мишей для проведення подальших експериментальних досліджень над ними.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей шляхом пригнічення загального метаболічного статусу і прискорення темпів розвитку ендотеліальної дисфункції при додаванні до складу "холестеринової дієти" мерказолілу та карбонату кальцію, при відповідному режимі годування мишей, що забезпечує швидке та значне атеросклеротичне ураження аорти.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей включає призначення "холестеринової дієти", згідно з корисною моделлю, до раціону "холестеринової дієти" додають мерказоліл 10 мг на 100 г дієти та карбонат кальцію (CaCO_3) 1 г на 100 г дієти, ці компоненти додають зранку впродовж 12-14 тижнів, а після обіду догодовують стандартним комбікормом, по закінченню терміну годування у тварин визначають атеросклеротичні зміни стінки судин шляхом гістохімічного виявлення ліпідних включень у фронтальних зрізах аорти та скануванням внутрішньої поверхні судин секційних зразків аорти.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Для ранкового годування "холестериною дієтою" спочатку готують кашку на основі гранульованого комбікорму, яка складається з розтопленого жиру свинячого або сала та вершкового масла - 30-45 г, маргарину - 15-20 г, холестерину 1,5-2 г, до якої додають карбонат кальцію (CaCO_3) 1 г та мерказоліл 10 мг, при цьому комбікорм складає решту до 100 г "холестериною дієти". Дієту тварини отримують зранку в 9.00-10.00 годин, на тварину використовують 3-4 грами протягом 12-14 тижнів, після обіду догодовують стандартним комбікормом. Доступ до води вільний. По закінченні терміну годування у тварин визначають атеросклеротичні зміни стінки судин шляхом гістохімічного виявлення ліпідних включень у фронтальних зрізах аорти та скануванням внутрішньої поверхні судин секційних зразків аорти.

Тварин виводили із експерименту шляхом швидкої декапітації. Серце з аортою промивали фосфатним буфером ($\text{pH}=7,4$) і фіксували у 10 % нейтральному формаліні (на фосфатному буфері). Верифікацію структурного ураження аорти та детекцію ліпідних включень проводили 2-ма методами.

Перший метод полягає у гістохімічному виявленні ліпідних включень у фронтальних зрізах аорти. Для цього тотальний фрагмент аорти заморожують у кріостаті і виготовляють зрізи товщиною 20-30 мкм, які в подальшому профарбовують ліпофільним 0,3 % спиртовим розчином судану III. Принцип гістохімічної реакції полягає у тому, що ліпідні включення мають вищу тропність/спорідненість з суданом, ніж етанол, і тому вилучаються із розчину останнього.

Другий метод полягає у отриманні секційних зразків аорти для аналізу (сканування) внутрішньої поверхні судин, тобто ураженої інтими. Фіксовані фрагменти аорти зневоднюють в етанолі, повздовжньо розрізають і фіксують на металічному предметному столику. Після цього матеріал висушують у вакуумній установці Samdri-780A в критичній точці CO_2 . Висушені зразки придатні для дослідження топографії атерогенного ураження та для наступного дослідження методом растрової (скануючої) електронної мікроскопії.

Приклад використання способу.

Досліджуваних тварин розміщують у клітку площею $\frac{3}{4}$ формату аркуша A4, щільність розміщення 15 тварин на клітку. "Холестериною дієту" тваринам давали щоденно зранку з 9.00-10.00 годин. Протягом 12-14 тижнів "холестериною дієтою" годували 86 мишей, з них перенесли дієту задовільно через 8 тижнів 86 мишей (100 %), через 12-14 тижнів - 62 миші (летальність 27,9 %). Починаючи з 60-70 доби годування, у частини тварин ($n=15$; 17,4 %) реєстрували випадіння шерсті, монопарез задньої кінцівки ($n=3$; 3,4 %). Останнє, ймовірно, є наслідком ішемічного ураження кортикальних відділів головного мозку, що спричинило пошкодження пірамідного тракту. Проведено визначення атеросклеротичних змін стінки судин. Так на 14 тиждень вживання "холестериною дієти" показники функціональної проби у лабораторної миші з проявами втрати шерсті, слабкості (тест перевернутий екран / inverted screen) 197 проти 221 у контролі. В стінці аорти виявлено поодинокі фокальні ліпідні включення: $0,08 \text{ мм}^2$ від внутрішньої поверхні аорти (середній діаметр аорти 1,8 мм), збільшення стінки аорти в зоні відкладень до 357,0 мкм проти 134,2 мкм у контролі. У миші з монопарезом задньої кінцівки, вираженої слабкості і порушенням моторної функції кінцівки на 14 тиждень вживання "холестериною дієти" показники функціональної проби (тест перевернутий екран / inverted screen) 14 проти 221 у контролі. В стінці аорти виявлено поодинокі фокальні ліпідні включення: $0,12 \text{ мм}^2$ від внутрішньої поверхні аорти (середній діаметр аорти 2,1 мм), збільшення стінки аорти в зоні відкладень до 195,1 мкм проти 105,6 мкм у контролі.

Переваги застосування способу:

1. економічні: а) менша вартість; б) достатньо широко представлені інгредієнти в аптечній системі;

2. медичні: застосування способу направлене на досить швидкий результат формування атеросклеротичних змін в аорті/судинах мишей для проведення подальших експериментальних досліджень над ними, зокрема при неможливості використання інших видів лабораторних тварин. Крім цього комплексна оцінка структурних змін аорти в поперечній проекції гістохімічним методом і рельєфу інтими після вакуумного висушування (з можливістю подальшого сканування) дозволяють з більшою достовірністю провести верифікацію патологічних змін.

Джерела інформації:

1. Всемирная организация здравоохранения: российская версия http://www.who.int/publications/list/cadio_pocket_guidelines/ru/ (дата звернення: 27.09.2016).

2. Мухаммед А.А. Исследование гиполипидемических свойств веществ природного происхождения на основе чеснока, растительных масел и пищевых волокон: дис. канд. фарм. наук: 14.03.06 / Мухаммед Ариж Абделькаримовна. - М., 2014. - 165 с.

3. Костюжинська С.Г., Гоженко А.И. Експериментальне моделювання атеросклерозу: перспективи та труднощі. Клінічна та експериментальна патологія. 2014. - Том XII, № 1 (47).
4. Diet-Induced Atherosclerosis/Hypercholesterolemia in Rodent Models / M.A. Pellizzon [et al.]. // Brief Scientific Literature Review. - 2008.
- 5 5. Renard C. Role of diabetes in atherosclerotic pathogenesis. What have we learned from animal models? / C. Renard, E. Van Obberghen // Diabetes & amp. - 2006. - Vol. 32, № 1. - P. 15-29.
6. Circulation: A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis / H.C. Stary [et al.]. // Circulation. - 1995. - Vol. 92, № 5. - <http://circ.ahajournals.org/content/92/5/1355.long> (дата звернення: 29.09.2016).
- 10 7. Fishbein M.C. The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque / M.C. Fishbein // Cardiovasc Pathol. - 2010. - Vol. 19. - P. 5-11.
8. Evaluation of Selected Atherosclerosis Risk Factors in Women with Subclinical Hypothyroidism Treated with L-Thyroxine / Adamarczuk-Janczyszyn M., Zdrojowy-Welna A., Rogala N., Zatonska K., Bednarek-Tupikowska G. // Adv Clin Exp Med. 2016. - May-Jun. 25 (3) : 457-63.
- 15 9. Subclinical hypothyroidism is associated with higher carotid intima-media thickness in cross-sectional analysis of the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil) / Peixoto de Miranda E.J., Bittencourt M.S., Pereira A.C., Goulart A.C., Santos I.S., Lotufo P.A., Bensenor I.M. // Nutr Metab Cardiovasc Dis. - 2016, Oct. - 26(10):915-21.
- 20 10. Nishina P.M., Lowe S., Verstuyft J., Naggert, JK, Kuypers, FA, Paigen, B. Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice // J Lipid Res. - 1993. - 34:1413-1422.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 25 Спосіб моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей, що включає призначення "холестеринової дієти", який **відрізняється** тим, що до раціону "холестеринової дієти" додають мерказоліл 10 мг на 100 г дієти та карбонат кальцію (CaCO₃) 1 г на 100 г дієти, ці компоненти додають зранку впродовж 12-14 тижнів, а після обіду догодовують стандартним комбікормом, по закінченню терміну годування у тварин визначають атеросклеротичні зміни стінки судин шляхом гістохімічного виявлення ліпідних включень у фронтальних зрізах аорти та скануванням внутрішньої поверхні судин секційних зразків аорти.
- 30

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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