



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 102235

(13) U

(51) МПК

G09B 23/28 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 03154**

(22) Дата подання заявки: **06.04.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **26.10.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **26.10.2015, Бюл.№ 20**

(72) Винахідник(и):

**Колесник Юрій Михайлович (UA),
Колесник Михайло Юрійович (UA),
Абрамов Андрій Володимирович (UA),
Ганчева Ольга Вікторівна (UA),
Федотова Марія Ігорівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035
(UA)**

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПАТОЛОГІЧНОГО РЕМОДЕЛЮВАННЯ МІОКАРДА У ДРІБНИХ ГРИЗУНІВ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики патологічного ремоделювання міокарда у дрібних гризунів шляхом проведення мікроскопічного дослідження в гістологічних зрізах лівого шлуночка щурів лінії Вістар, визначення маркерів міокардіального апоптозу та фіброзу, причому проводять комплексне імуногістохімічне дослідження, в якому ступінь апоптозу оцінюють за концентрацією, вмістом та площею імунореактивності до високоселективного кардіоспецифічного маркера апоптозу анексину V, ступінь виразності міокардіального фіброзу встановлюють у відповідності від балансу колагену I типу та тайтину, для оцінки прогресування патологічного ремоделювання визначають ступінь виразності гіпертрофії міокарда за рівнем кардіотрофіну I та середньої кількості ядер 1 мкм^2 , вмісту та концентрації РНК в кардіоміоцитах, і якщо відмічають збільшення вмісту колагену I типу та зниження тайтину на фоні збережених морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (площі ядра, вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі), то діагностують патологічне ремоделювання міокарда із переважанням фіброзних перебудов, якщо спостерігають збільшення вмісту кардіотрофіну-1, збереження нормального рівня тайтину на фоні підвищення морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (збільшення вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі), то діагностують ремоделювання міокарда із переважанням патологічної гіпертрофії, якщо відмічають збільшення вмісту анексину V, то діагностують прогресування та обтяження перебігу патологічного процесу.

UA 102235 U

Корисна модель належить до медицини, а саме патологічної фізіології та експериментальної медицини, і може бути застосована для діагностики патологічного ремоделювання міокарда в кардіології та фармакології з метою визначення особливостей патогенезу захворювань серцево-судинної системи та розробки способів запобігання і лікування цих хвороб.

Проблема вибору маркерів для діагностики патологічного ремоделювання міокарда є актуальною не тільки для експериментальної медицини. Це пов'язано з тим, що патологічне ремоделювання серцевого м'язу супроводжується формуванням гіпертрофії та розвитком інтерстиціального фіброзу, переважно за рахунок накопичення колагену I типу, а також ініціації процесів апоптозу кардіоміоцитів. Ці зміни є морфологічним підґрунтям до формування діастолічної дисфункції та потенційно зловиясних аритмій. В клініці у хворих на серцево-судинну патологію для діагностики патологічного ремоделювання серцевого м'язу широко застосовують ехокардіоскопічний метод. Нажаль, в експериментальних дослідженнях на тваринах, а саме дрібних гризунах, при моделюванні патологій міокарда цей метод застосувати дуже складно через відсутність спеціального обладнання, тому гостро стає питання вибору інших методів діагностики патологічного ремоделювання міокарда.

Також необхідно відзначити, що іноді, навіть у рамках однієї модельної патології, спрямованість і ступінь виразності патологічного ремоделювання міокарда буває різною. Так, у деяких випадках при адаптаційних перебудовах "геометрії" серця виявляються ознаки фізіологічної гіпертрофії, тоді як дезадаптаційні процеси призводять до розвитку патологічної гіпертрофії, фіброзу або некрозу міокарда. При цьому ці патологічні зміни можуть носити як поєднаний, так і монопатологічний характер. Тому дуже важливою умовою підбору критеріїв патологічного ремоделювання міокарда є врахування переважання та спрямованості того чи іншого із вищезначених патологічних процесів.

З огляду на той важливий факт, що при дослідженні експериментальної патології серцево-судинної системи не розроблені об'єктивні критерії патологічного ремоделювання міокарда з кількісною оцінкою маркерів міокардіального фіброзу, гіпертрофії та апоптозу, виникає необхідність розробити сучасний комплекс діагностичних критеріїв патологічного ремоделювання міокарда для всебічного його вивчення, розробки методів ранньої діагностики, профілактики й лікування.

Комплексна оцінка вибраних нами параметрів патологічного ремоделювання міокарда дозволить визначити характер спрямованості морфологічних змін в серцевому м'язі. Розробка алгоритму діагностики на підставі запропонованих морфологічних критеріїв фіброзу, гіпертрофії та апоптозу буде сприяти об'єктивній верифікації спрямованості і ступеня виразності експериментальної патології серця, є актуальним питанням сучасної медицини і викликає необхідність приділити увагу розробці такого способу.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатами, що досягаються, є спосіб діагностики патологічного ремоделювання у щурів [Salata C., Ferreira-Machado S.C., De Andrade C.B., Mencalha A.L., Mandarim-De-Lacerda C.A., de Almeida C.E. Apoptosis induction of cardiomyocytes and subsequent fibrosis after irradiation and neoadjuvant chemotherapy //Int J Radiat Biol. - 2014. - Vol. 90, № 4. - P. 284-290], який полягає у визначенні у щурів лінії Вістар методом ПЦР ступеня фіброзу за рівнем експресії mRNA проколагену 1 типу й трансформуючого фактора росту (TGF) $\beta 1$ та апоптозу методом світлової мікроскопії вмісту Вах/Bcl2 в зрізах лівого шлуночка.

Прототип та спосіб, що пропонується, мають такі спільні суттєві ознаки:

- застосування щурів лінії Вістар;
- проведення мікроскопічного дослідження в гістологічних зрізах лівого шлуночка;
- визначення маркерів міокардіального апоптозу та фіброзу.

Але спосіб-прототип є недостатньо ефективним, тому що для діагностики ступеня виразності апоптозу використовуються неспецифічні маркери, ступінь фіброзу оцінюють тільки за рівнем експресії mRNA попередника колагену проколагену 1 типу, не враховуючи баланс розвитку фіброзу та пружності кардіоміоцитів. Об'єм досліджень потребує окрім обладнання для світлової мікроскопії використання спеціалістів, обладнання та реактивів для ПЦР, що значно ускладнює методику та збільшує фінансові витрати.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики патологічного ремоделювання міокарда у дрібних гризунів шляхом дослідження комплексу маркерів міокардіального фіброзу та використання іншого високоселективного кардіоспецифічного маркера апоптозу, що забезпечить підвищення адекватності та високоспецифічності методу.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає застосування щурів лінії Вістар, проведення мікроскопічного дослідження в гістологічних зрізах лівого шлуночка, визначення маркерів міокардіального апоптозу та фіброзу, новим є те, що проводять комплексне імуногістохімічне дослідження, в якому ступінь апоптозу оцінюють за концентрацією, вмістом та площею імунореактивності до високоселективного кардіоспецифічного маркера апоптозу анексину V, ступінь виразності міокардіального фіброзу встановлюють у відповідності від балансу колагену I типу та тайтину, для оцінки прогресування патологічного ремоделювання визначають ступінь виразності гіпертрофії міокарда за рівнем кардіотрофіну I та середньої кількості ядер 1 мкм^2 , вмісту та концентрації РНК в кардіоміоцитах, і якщо відмічається збільшення вмісту колагену I типу та зниження тайтину на фоні збережених морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (площі ядра, вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі), то діагностують патологічне ремоделювання міокарда із переважанням фіброзних перебудов, якщо спостерігається збільшення вмісту кардіотрофіну-1, зберігається нормальний рівень тайтину на фоні підвищення морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (збільшення вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі), то діагностують ремоделювання міокарда із переважанням патологічної гіпертрофії, якщо відмічається збільшення вмісту анексину V, то діагностують прогресування та обтяження перебігу патологічного процесу.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому:

- всі дослідження проводять одним методом - гістохімічним, що зменшує кількість обладнання, спеціалістів, які приймають участь в дослідженні та мінімізує фінансові витрати;
- запропонований комплекс морфологічних критеріїв дозволяє точно та з високим ступенем достовірності прогнозувати переважання фіброзних перебудов або патологічної гіпертрофії міокарда, тому що ми даємо кількісну та порівняльну оцінку запропонованих показників ремоделювання міокарда;

- для діагностики апоптозу використовується кардіоспецифічний маркер анексин V, який є високоселективним саме до кардіоміоцитів, в той час як маркери Bax/Bcl2 неселективні та можуть свідчити про процеси в інших тканинах (сполучній, жировій, ендотелії судин);

- для встановлення міокардіального фіброзу проводиться комплексне дослідження із визначенням експресії колагену I типу, як показника фіброзу, та білка тайтину, як регулятора міокардіальної пружності, що дає можливість не тільки встановити наявність сформованого фіброзу, а ще довести та спрогнозувати резерви скоротливої можливості міокарда;

- всі дослідження проводяться в автоматичному режимі, в ході якого виділяються зони зі статистично значущою флюоресценцією до тайтину, колагену I типу, кардіотрофіну-1 та анексину V із розрахунком наступних параметрів: площа імунореактивного матеріалу (%), що відображує інтенсивність експресії досліджуваних маркерів у міокарді; інтенсивність флюоресценції імунореактивного матеріалу, що відображує концентрацію (ОД_{IF}) маркерів у міокарді; питомий вміст ($\text{ОД}_{\text{IF}}/\text{мм}^2$) досліджуваних маркерів у міокарді, при цьому виключається можливість впливу на результат людського фактора і створюється можливість обробляти великі масиви даних;

- морфо-гістохімічні дослідження забарвлених зрізів "верхівки" лівого шлуночка галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном дозволяють оцінити вміст РНК в ядрах клітин та розрахувати їх чисельність в 1 мкм^2 , що є дуже важливим показником при прогресуванні патологічного ремоделювання міокарда та апоптозу кардіоміоцитів.

Спосіб здійснюють таким чином:

Фрагменти лівого шлуночка експериментальних тварин фіксуються у рідині Буена та після гістологічної обробки заливаються у парапласт ("MCM Cormick", США). На ротаційному мікротомі Microm-325 ("Microm Corp.", Німеччина) робляться серійні зрізи з різних відділів лівого шлуночка завтовшки 5 мкм. Зрізи депарафінують та демаскують в РТ-модулі ("Thermo Scientific", США) у цитратному буферному розчині ("Thermo Scientific", США). Для визначення міокардіального фіброзу визначають експресію колагену I типу та білка тайтину, для визначення клітинної загибелі кардіоміоцитів шляхом апоптозу гістологічні зрізи зразків міокарда інкубують з кролячими поліклональними антитілами до анексину V, для визначення гіпертрофії міокарда гістологічні зрізи інкубують з кролячими поліклональними антитілами до кардіотрофіну-1. Для визначення рівня РНК в ядрі кардіоміоциту та його цитоплазмі проводять морфо-гістохімічні дослідження кардіоміоцитів забарвлених галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном. І якщо відмічається збільшення вмісту колагену I типу та зниження тайтину на фоні збережених морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (площі ядра, вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі) то діагностують патологічне ремоделювання міокарда із переважанням фіброзних перебудов, якщо спостерігається збільшення вмісту кардіотрофіну-1, зберігається нормальний рівень тайтину на фоні підвищення функціональної активності кардіоміоцитів із збільшенням

вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі то діагностують ремоделювання міокарда із переважанням патологічної гіпертрофії, збільшення вмісту анексину V слід розглядати як показник прогресування та обтяження перебігу патологічного процесу.

Приклад.

5 Фрагменти лівого шлуночка щурів лінії Вістар фіксуються у рідині Буена та після гістологічної обробки заливаються у парапласт ("MkCormick", США). На ротаційному мікротомі Microm-325 ("Microm Corp.", Німеччина) робляться серійні зрізи з різних відділів лівого шлуночка завтовшки 5 мкм. Зрізи депарафінують та демаскують в РТ-модулі ("Thermo Scientific", США) у цитратному буферному розчині ("Thermo Scientific", США). Для визначення міокардіального фіброзу визначають експресію колагену I типу та білка тайтину, що регулює міокардіальну пружність. Гістологічні зрізи інкубують з мишиними моноклональними антитілами до колагену I ("Abeam", США) у розчині 1:1000 у вологій камері ($T=+4^{\circ}\text{C}$, 24 години). Потім проводять інкубацію з овечими антитілами до IgG миші, кон'югованими з FITC ("Sigma Chemical", США), у розведенні 1:64 у вологій камері ($T=+37^{\circ}\text{C}$, 45 хв.) та заключають у суміш "гліцерин/фосфатний буфер" (9:1). Для визначення гіпертрофії міокарда гістологічні зрізи інкубують з кролячими поліклональними антитілами до кардіотрофіну-1 ("Novus Biologicals", США) у розведенні 1:200 у вологій камері ($T=+4^{\circ}\text{C}$, 24 години). Як вторинні антитіла використовують козячі антитіла до IgG кроля, які були кон'юговані з FITC (Sigma Chemical, США), у розведенні 1:64 у вологій камері ($T=+37^{\circ}\text{C}$, 45 хв.) та заключають у суміш "гліцерин/фосфатний буфер" (9:1). Для визначення клітинної загибелі кардіоміоцитів шляхом апоптозу гістологічні зрізи зразків міокарда інкубують з кролячими поліклональними антитілами до анексину V ("Abeam Inc.", США) у розведенні 1:200 у вологій камері ($T=+4^{\circ}\text{C}$, 24 години). Потім проводять інкубацію з козячими антитілами до IgG кроля, кон'югованими з FITC ("Sigma Chemical", США), у розведенні 1:64 у вологій камері ($T=+37^{\circ}\text{C}$, 45 хв.) та заключають у суміш "гліцерин/фосфатний буфер" (9:1).

25 Дослідження зразків міокарда для імуногістохімічного дослідження проводять в ультрафіолетовому спектрі збудження за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією ("Carl Zeiss", Німеччина) на мікроскопі AxioImager-M2 ("Carl Zeiss", Німеччина). Зображення отримані з відеокамери AxioCam-5HRm ("Carl Zeiss", Німеччина) записують у вигляді комп'ютерного файлу з наступною обробкою системою цифрового аналізу AxioVision 4.8.2 ("Carl Zeiss", Німеччина).

В автоматичному режимі виділяються зони зі статистично значущою флюоресценцією до тайтину, колагену I типу, кардіотрофіну-1 та анексину V із розрахунком наступних параметрів:

1. Площа імунореактивного матеріалу (%), що відображує інтенсивність експресії досліджуваних маркерів у міокарді;
- 35 2. Інтенсивність флюоресценції імунореактивного матеріалу, що відображує концентрацію (OD_{if}) маркерів у міокарді;
3. Питомий вміст ($\text{OD}_{\text{if}}/\text{мм}^2$) досліджуваних маркерів у міокарді. Морфо-гістохімічні дослідження кардіоміоцитів проводяться на мікротомних зрізах міокарда "верхівки" серця завтовшки 5 мкм, які депарафінують в ксилолі, проводять регідратацію в східних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %) і протягом 48 годин забарвлюють галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном.
- 40

Морфо-денситометричний аналіз забарвлених препаратів проводять на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина). Зображення кардіоміоцитів за допомогою високочутливої відеокамери SONU-4922 (SONU Inc., США) вводять в комп'ютерну програмно-апаратну систему цифрового аналізу зображення. Зображення з мікрофотографій в автоматичному режимі оцифровується за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору із подальшим їх аналізом за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина).

В результаті аналізу визначають кількість ядер в 1 мм^2 , площу ядра та цитоплазми (мкм^2) кардіоміоцитів, концентрацію (OD_{if}) і вміст ($\text{OD}_{\text{if}}/\text{мкм}^2$) нуклеїнових кислот у ядрі та цитоплазмі; розраховують ядерно-цитоплазматичний коефіцієнт (ЯЦК) (як співвідношення ядер до площі цитоплазми кардіоміоцитів області, що аналізується).

Концентрацію нуклеїнових кислот визначають за формулою:

$$C_i = |\lg(D_i/D_0)|,$$

де D_1 - оптична щільність об'єкта;

55 D_0 - показники оптичної щільності ядра/цитоплазми й "фону" (міжклітинної речовини).

Вміст нуклеїнових кислот (C_1) обчислюють за формулою:

$$C_1 = (C \cdot S),$$

де C - концентрація нуклеїнових кислот;

S - площа ядра/цитоплазми.

60 Аналізувати необхідно не менше 100 полів зору у кожній серії.

Якщо відмічається збільшення вмісту колагену I типу та зниження тайтину на фоні збережених морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (площі ядра, вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі) то діагностують патологічне ремоделювання міокарда із переважанням фіброзних перебудов, якщо спостерігається збільшення вмісту кардіотрофіну-1, зберігається нормальний рівень тайтину на фоні підвищення морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (збільшення вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі), то діагностують ремоделювання міокарда із переважанням патологічної гіпертрофії, якщо відмічається збільшення вмісту анексину V, то діагностують прогресування та обтяження перебігу патологічного процесу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики патологічного ремоделювання міокарда у дрібних гризунів шляхом проведення мікроскопічного дослідження в гістологічних зрізах лівого шлуночка щурів лінії Вістар, визначення маркерів міокардіального апоптозу та фіброзу, який **відрізняється** тим, що проводять комплексне імуногістохімічне дослідження, в якому ступінь апоптозу оцінюють за концентрацією, вмістом та площею імунореактивності до високоселективного кардіоспецифічного маркера апоптозу анексину V, ступінь виразності міокардіального фіброзу встановлюють у відповідності від балансу колагену I типу та тайтину, для оцінки прогресування патологічного ремоделювання визначають ступінь виразності гіпертрофії міокарда за рівнем кардіотрофіну I та середньої кількості ядер 1 мкм^2 , вмісту та концентрації РНК в кардіоміоцитах, і якщо відмічають збільшення вмісту колагену I типу та зниження тайтину на фоні збережених морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (площі ядра, вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі), то діагностують патологічне ремоделювання міокарда із переважанням фіброзних перебудов, якщо спостерігають збільшення вмісту кардіотрофіну-1, збереження нормального рівня тайтину на фоні підвищення морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів (збільшення вмісту РНК в ядрі та цитоплазмі), то діагностують ремоделювання міокарда із переважанням патологічної гіпертрофії, якщо відмічають збільшення вмісту анексину V, то діагностують прогресування та обтяження перебігу патологічного процесу.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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