



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117423** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
G09B 23/28 (2006.01)
A23L 33/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 00332	(72) Винахідник(и): Турчіна Наталія Степанівна (UA), Савосько Сергій Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.01.2017	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.06.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.06.2017, Бюл.№ 12	

(54) СКЛАД "ХОЛЕСТЕРИНОВОЇ ДІЄТИ" ДЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧНОГО УРАЖЕННЯ АОРТИ У МИШЕЙ

(57) Реферат:

Склад «холестеринової дієти» для моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей містить тваринні та рослинні жири, холестерин, гранульований комбікорм. При цьому як жири дієта містить жир свинячий або сало та вершкове масло, маргарин, та додатково містить мерказоліл і карбонат кальцію.

UA 117423 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до неврології, і може бути використана при розробці профілактичної дієти 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 і 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 утворення 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 дієт та їх складу для відтворення (моделювання) атеросклеротичного ураження аорти у лабораторних тварин (мишей, щурів). Запропоновані авторами дієти використовують на нокаутних тваринах для моделювання атеросклеротичного ураження аорти, оскільки вони є височутливими до "холестеринової" - атерогенної дієти. Разом з тим для відтворення ряду патологічних станів такі лінії тварин є не прийнятними.

Найближчим аналогом вибраний склад "жирової" (холестеринової) дієти (3), який містить тваринні та рослинні жири, холестерин, гранульований комбікорм, для моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей.

Недоліком цього складу є те, що він не дозволяє отримати швидке та значиме формування атеросклеротичних змін в аорті неімбридних мишей для проведення подальших експериментальних досліджень над ними.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки складу "холестеринової дієти" для моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей шляхом додавання до складу "холестеринової дієти" мерказолілу та карбонату кальцію, визначення кількісного складу дієти, при якому відбувається пригнічення загального метаболічного статусу і прискорення темпів розвитку ендотеліальної дисфункції, що забезпечує швидке та значне атеросклеротичне ураження аорти.

Поставлена задача вирішується тим, що склад "холестеринової дієти" для моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей, що містить тваринні та рослинні жири, холестерин, гранульований комбікорм, згідно з корисною моделлю, як жири містить жир свинячий або сало та вершкове масло, маргарин, та додатково містить мерказоліл і карбонат кальцію, при наступному співвідношенні, на 100 г дієти:

жир свинячий або сало та	
вершкове масло	30-45 г
маргарин	15-20 г
холестерин	1,5-2 г
карбонат кальцію (CaCO_3)	1 г
мерказоліл	10 мг (0,01 г)

гранульований комбікорм решта.

Приклади складу дієти та її використання.

Приклад 1.

Для ранкового годування готують "холестеринову дієту" на основі гранульованого комбікорму, яка містить на 100 г дієти:

жир свинячий або сало та

вершкове масло 30 г

маргарин 15 г

холестерин 1,5 г

карбонат кальцію (CaCO_3) 1 г

мерказоліл 10 мг (0,01 г)

гранульований комбікорм 52,49 г.

- 5 Досліджуваних тварин розміщують у клітку площею $\frac{3}{4}$ формату аркуша A4, щільність розміщення 15 тварин на клітку. Таким складом дієти тварин годують 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.

Приклад 2.

Для ранкового годування готують "холестеринову дієту" на основі гранульованого комбікорму, яка містить на 100 г дієти:

жир свинячий або сало та

вершкове масло 45 г

маргарин 20 г

холестерин 2 г

карбонат кальцію (CaCO_3) 1 г

мерказоліл 10 мг (0,01 г)

гранульований комбікорм 31,99 г.

- 15 Годували такою дієтою мишей також, як у прикладі 1.

Приклад 3.

Для ранкового годування готують "холестеринову дієту" на основі гранульованого комбікорму, яка містить на 100 г дієти:

жир свинячий або сало та

вершкове масло 37,5 г

маргарин 17,5 г

холестерин 1,75 г

карбонат кальцію (CaCO_3) 1 г

мерказоліл 10 мг (0,01 г)

гранульований комбікорм 42,24 г.

Годували такою дієтою мишей також, як у прикладі 1.

- 20 Приклад 4 - за межами запропонованого складу дієти.

Для ранкового годування готують "холестеринову дієту" на основі гранульованого комбікорму, яка містить на 100 г дієти:

жир свинячий або сало та

вершкове масло 50 г

маргарин 10 г

холестерин 2,5 г

карбонат кальцію (CaCO_3) 1 г

мерказоліл 10 мг (0,01 г)

гранульований комбікорм 36,49 г.

- 25 Тварин виводили із експерименту шляхом швидкої декапітації. Серце з аортою промивали фосфатних 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.

- 30 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, поздовжньо розрізають і фіксують на металічному предметному столику. Після цього матеріал висушують у вакуумній установці Samdri-780A в критичній точці CO₂. Висушені зразки придатні для дослідження топографії атерогенного ураження та для наступного дослідження методом растрової (скануючої) електронної мікроскопії.

"Холестериною дієтою" годували 86 мишей за різним кількісним складом дієти в пропонуваніх границях, 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.

Результати годування пропонованою дієтою за межами зазначеного у формулі складу (див. приклад 4) не дають бажаного результату, оскільки спричиняють високу летальність тварин, що не дозволяє проводити тривалі експериментальні фармакологічні дослідження.

Проведено також визначення атеросклеротичних змін стінок судин. Так на 14 тиждень вживання "холестеринової дієти" показники функціональної проби у лабораторної миші з проявами втрати шерсті, слабкості (тест перевернутий екран / invertedscreen) 197 проти 221 у контролі. В стінці аорти виявлено поодинокі фокальні ліпідні включення: 0,08 мм² 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, виражено; слабкості і порушенням моторної функції кінцівки на 14 тиждень вживання "холестеринової дієти" показники функціональної проби (тест перевернутий екран / invertedscreen) 14 проти 221 у контролі. В стінці аорти виявлено поодинокі фокальні ліпідні включення: 0,12 мм² 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 пропонованої дієти для моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей:

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

2. медичні: застосування "холестеринової" дієти 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. 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 гиполлипидемических 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. Экспериментальне 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. Renard C. Role of diabetes in atherosclerotic pathogenesis. What have we learned from animal models? / C. Renard, E. Van Obberghen // Diabetes &. - 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).

7. Fishbein M.C. The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque / M.C. Fishbein // Cardiovasc Pathol. - Vol. 19. - 2010. - P. 6-11.

8. Evaluation of Selected Atherosclerosis Risk Factors in Women with Subclinical Hypothyroidism Treated with L-Thyroxine / Adamarczuk-Janczyszyn M., Zdrojowy-Welna A., Rogala N., Zatońska K., Bednarek-Tupikowska G. // Adv Clin Exp Med. 2016 May-Jun; 25(3):457-63.

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 É.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.

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

- 10 Склад «холестеринової дієти» для моделювання атеросклеротичного ураження аорти у мишей, що містить тваринні та рослинні жири, холестерин, гранульований комбікорм, який **відрізняється** тим, що як жири містить жир свинячий або сало та вершкове масло, маргарин, додатково містить мерказоліл і карбонат кальцію, при наступному співвідношенні на 100 г дієти:
- | | |
|---|---------|
| жир свинячий або сало та вершкове масло | 30-45 г |
| маргарин | 15-20 г |
| холестерин | 1,5-2 г |
| карбонат кальцію (CaCO ₃) | 1 г |
| мерказоліл | 10 мг |
| гранульований комбікорм | решта. |

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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

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