



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78105** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00
A61B 8/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 09893	(72) Винахідник(и): Співак Микола Якович (UA), Ємець Ілля Миколайович (UA), Бубнов Ростислав Володимирович (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.08.2012	(73) Власник(и): Співак Микола Якович, вул. Богомольця, 7/14, кв.113, м. Київ, 01024 (UA), Ємець Ілля Миколайович, вул. Артема, 32/38, кв. 43, м. Київ, 04053 (UA), Воробйова Ганна Михайлівна, вул. Червоноармійська, 23, кв. 9, м. Київ, 01004 (UA), Жовнір Володимир Аполлінарійович, Червонозоряний просп., 39-а, кв. 75, м. Київ, 03110 (UA), Мохнатий Сергій Іванович, вул. Леніна, 43, кв. 28, м. Київ, 02230 (UA), Тимошок Наталія Олександрівна, вул. Садова, 17, кв. 28, м. Київ, 03027 (UA), Лазаренко Людмила Миколаївна, вул. Мільчакова, 3-а, кв. 60, м. Київ, 02002 (UA), Ульберг Зоя Рудольфівна, Печерський узвіз, 8, кв. 72, м. Київ, 01023 (UA), Резніченко Людмила Сергіївна, вул. Е. Потьє, 9, м. Київ, 03057 (UA), Бубнов Ростислав Володимирович, пр. Глушкова, 22, кв. 82, м. Київ, 03187 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.03.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.03.2013, Бюл.№ 5	

UA 78105 U**(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ СЕРЦЕВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ****(57) Реферат:**

Спосіб моделювання серцевої недостатності включає проведення експерименту на лабораторних тваринах (щурах) із введенням кардіотоксичного препарату. Тварині вводять загальну кумулятивну дозу доксорубіцину 12,45-23,1 мг/кг та проводять прижиттєве динамічне ультразвукове дослідження з використанням датчиків частотою понад 10 МГц, що включає ехокардіографію трансторакальним доступом з використанням доплерографії, визначення руху тканин та оцінку системної гемодинаміки, стану внутрішніх органів, а також проводять введення препаратів під ультразвуковим контролем в серцеву сумку та в плевральну порожнину тварин.

Корисна модель належить до біології, мікробіології, медицини, зокрема кардіології, фізіології, фармакології, ультразвукової діагностики, променевої діагностики, моделювання біологічних процесів на малих лабораторних тваринах з можливістю динамічного прижиттєвого контролю.

Мишачі та щурячі моделі широко використовуються в біологічних та медичних науках, проте подібні дослідження досі обмежені нездатністю неінвазивно зібрати анатомічні та фізіологічні дані динамічно протягом часу дослідження. Як відомо, багато захворювань людини досліджуються на піддослідних тваринах, доцільність тваринних моделей у майбутньому визначається тим, що навіть найбільш потужні комп'ютери з застосуванням відповідних математичних моделей не в змозі відтворити взаємодію молекул клітин, органів, організму та навколишнього середовища [Science, Medicine, and Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Published by the National Research Council of the National Academies 2004; page 2.]. В США використовують до 80 млн. дрібних тварин для проведення експериментів щорічно (2001 рік) [Carbone, Larry. What Animals Want. Oxford University Press, 2004, p. 26.]. Для того, щоб дослідити зміни, піддослідних мишей доводилося вбивати і препарувати. Тому питання зменшення кількості втрат дрібних тварин та підвищення якості експерименту за рахунок прижиттєвої оцінки змін тканин тварин є досить актуальним завданням.

Сьогодні при порівнянні діагностичної ефективності різних методів непрямой візуалізації якісно нового значення почала набувати ультрасонографія (ультразвукове дослідження, УЗД), що пов'язано як з вдосконаленням самого методу ультразвукової (УЗ) візуалізації, так і з результатами тривимірної реконструкції, виконаної за сонографічними даними [Robb R.A. Three-Dimensional Biomedical Imaging. Principles and Practice. VCH Publishers, Inc., New York, NY, 1995.]. Так сучасні ультразвукові апарати навіть загального призначення дають можливість отримувати зображення з роздільною здатністю до 0,1 мм, що значно вище, ніж може бути досягнуто за допомогою магнітно-резонансної томографії (МРТ) напруженістю магнітного поля, навіть 3 Тесла, роздільною здатністю до 0,2×0,2×1,0 мм [Saupe N, Priessmann KP, Luechinger R, Bosiger P, Marincek B, Weishaupt D. MR imaging of the wrist: comparison between 1.5-and 3-T MR imaging-preliminary experience. Radiology 2005; 234:256-64.]. Останні технічні розробки дозволяють використовувати більш високі частоти ультразвуку з досягненням кращої роздільної здатності УЗ зображення, а постпроцесінг підвищує зручність для користувача. Крім того, слід враховувати наявність іонізуючого навантаження при комп'ютерній томографії, а також малодоступність та високі кошти магнітно-резонансної томографії.

Відомий спосіб використання ультрасонографії з дослідницькою метою - ультразвукової біомікроскопії (UBM), з застосуванням ехокардіографії для внутрішньоутробного дослідження серцево-судинної системи в ембріону миші [Colin K. L. and Daniel H. Turnbull Ultrasound biomicroscopy-Doppler in mouse cardiovascular development Physiol Genomics 14:3-15, 2003]. Проте, досі методи преклінічної візуалізації на дрібних тваринах, особливо з використанням УЗ технологій використовуються лише в поодиноких дослідницьких центрах світу, з застосуванням спеціального обладнання [Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide. Kiessling, Fabian; Pichler, Bernd J. (Eds.). 1st Edition., 2011, Springer].

Відомий також спосіб сонографії печінки у новонароджених телят [Патент України № 14421. опубл. 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.], що включає застосування ультразвукових хвиль, який відрізняється тим, що прижиттєве ультразвукове сканування печінки у новонароджених телят проводять в правих супраабдомінальній і супракостальній позиціях розташування датчика приладу ультразвукової дії "Scanner 100S" і визначають динамічність ехоморфології структур печінки.

Відомий спосіб проведення експерименту на тваринах [Пат. України, № заявки U 2012 09526], що включає використання променевого обладнання, який відрізняється тим, що при патологічних станів для прижиттєвої динамічної реєстрації змін в тканинах тварин проводять ультразвукове дослідження малих лабораторних тварин (щурів, мишей) з використанням датчиків частотою понад 10 МГц з використанням доплерографії, соноеластографії, введення контрастних препаратів, визначення руху тканин, проводять пункційні втручання під УЗ контролем з метою введення препаратів та отримання матеріалу для дослідження, а також створюють вексельні та векторні тривимірні моделі з використанням отриманих ультразвукових даних.

Переваги ультразвукового дослідження в експерименті:

- обстеження дозволяє отримувати зображення в режимі реального часу;
- ультразвукове дослідження забезпечує високу якість і роздільну здатність зображення; УЗД - оптимальний метод для контролю інтервенційних втручань;
- доступність;

- неінвазивна оцінка судинного русла за рахунок застосування доплерографії;
- неінвазивна оцінка щільності тканин за рахунок соноеластографії.

Відомий спосіб моделювання гіпореактивного інфаркту міокарда [Патент України № 2981, опубл. 15.09.2004, бюл. №, 2004р.] шляхом перев'язки гілки вінцевої артерії серця і введення ініціюючої речовини експериментальній тварині. Як ініціюючу речовину застосовують препарати

простагландину E2 в дозі 0,2-0,5 мг/кг маси тіла протягом перших 4 діб інфаркту міокарда. Повідомлялося про кардіотоксичну дію доксорубіцину (Кондратенко Е.И., Теплый Д.Л., Глинина А.Г., Мажитова М.В., Чинтимирова И.В. ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ И ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ДОКСОРУБИЦИНА / Нейрохимия2000. - К 1. - С. 32-35.

Пятаев Н.А., Щукин С.А., Минаева О.В., Скопин П.И. Зыряева Н.Н., Коровина Е.Ю. ДНК У КРЫС С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ КАРЦИНОМОЙ РС-1 / Российский биотерапевтический журнал 2011. - N 2. - С. 55-59.).

Описане використання ультразвукових методів за допомогою спеціального обладнання для прижиттєвого обстеження функції серця у щурів [Bjornerheim R., H. Kiil Grogard, Kjekshus H., Attramadal H., Smiseth O. A., High Frame Rate Doppler Echocardiography in the Rat: an Evaluation of the Method / Eur J Echocardiography (2001) 2, 78-87.]. Автори використовували дані ехокардіографії, вважають показники доплерографії більш репрезентативними за дані М-режиму. Є повідомлення про використання пристосованих внутрішньосудинних датчиків для трансезофагеального дослідження серця щура [Lu L, Ko E, Schwartz GG, Chou TM. Transesophageal echocardiography in rats using an intravascular ultrasound catheter. Am J Physiol 1997; 273 (4 Pt 2): H2078-H2082.].

Відомий спосіб моделювання серцевої недостатності з застосуванням доксорубіцину [Hayward R, Hydock DS. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2007 Jul;46(4):20-32.] шляхом 10-разового інтраперитонеального введення препарату у дозі 1 мг/кг з наступною трансезофагеальною ехокардіографією пристосованим внутрішньосудинним датчиком.

Описаний спосіб моделювання інфаркту міокарда, що включає перев'язку гілки коронарної артерії серця у експериментальних тварин і введення пірогеналу, який відрізняється тим, що додатково вводять кверцетин в дозі 10-20 мг/кг маси тіла щодня протягом перших 5 діб інфаркту міокарда [Патент України №3373 від 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.].

За прототип вибраний найближчий аналог - спосіб моделювання токсичного ураження міокарда у білих щурів, який включає внутрішньоочеревинне введення 50,0 % розчину чотирихлористого вуглецю, який відрізняється тим, що чотирихлористий вуглець вводять у дозі 0,15 мл/кг два рази на тиждень протягом місяця з одночасним загруднинним введенням 1 % розчину мезатону у дозі 0,15 мг/кг.

Проте даний спосіб не передбачає прижиттєвого динамічного обстеження піддослідних тварин шляхом використання ультразвукової візуалізації, проведення прицільного введення препарату під УЗ контролем. Без використання методів візуальної навігації способи введення речовин обмежуються оральним, в хвостову вену, інтраперитонеальним та субтенторіальним. В інших аналогах з застосуванням ультразвукової візуалізації використовували спеціальне малодоступне обладнання, остаточно не розроблена комплексна методологія оцінки серцево-судинної системи, обмежена оцінкою показників доплерографії, даних М-режиму; не проводили оцінку системної геодинаміки; не вводили препарати під УЗ контролем в серцеву сумку та в плевральну порожнину; не була визначена доза кардіотоксичного препарату для забезпечення можливості тривалого спостереження за твариною.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб моделювання на дрібних лабораторних тваринах патологічних станів серцево-судинної системи, підвищення об'єктивності реєстрації змін та відтворюваності моделювання за рахунок прижиттєвого динамічного обстеження піддослідних тварин шляхом використання ультразвукової візуалізації високочастотними датчиками, що дозволяє проводити та проводити дослідження нових лікарських засобів.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, що включає проведення експерименту на лабораторних тваринах (щурах) із введенням кардіотоксичного препарату, який відрізняється тим, що тварині вводять загальну кумулятивну дозу доксорубіцину 12,45-23,1 мг/кг та проводять прижиттєве динамічне ультразвукове дослідження з використанням датчиків частотою понад 10 МГц, що включає ехокардіографію трансторакальним доступом з використанням доплерографії, визначення руху тканин, та оцінку системної гемодинаміки, стану внутрішніх органів, а також проводять введення препаратів під ультразвуковим контролем в серцеву сумку та в плевральну порожнину тварин.

Дане рішення стало можливим завдяки емпіричному встановленню ультразвукової семіотики при обстеженні щурів та даних фонометрії на основі обстеження 10 особин гризунів кожної статі підібраних за принципом аналогів та застосування принципів інтервенційної сонографії.

5 Дані середніх лінійних розмірів основних органів щурів представлені в таблиця.

Таблиця

Фонометричні дані органів щурів

Орган	Контрольна група	Модель серцевої недостатності
Поздовжній розмір печінки, мм	15±1,5	18±1,7
Поздовжній розмір нирки, мм	16±1,3	17±1,4
селезінка	14±1,7	17±1,8
Нижня порожниста вена, мм	3,0±2,3	3,7±2,6
Ворітна вена, мм	1,5	1,78
Фракція викиду, %	78±6	46±8
Максимальна систолічна швидкість лівому шлуночку, см/сек.	11±1,3	6,5±1,6
Індекс резистентності в сегментарних артеріях нирки	0,68±0,04	0,7±0,04

Спосіб здійснюється наступним чином. Забезпечують надійну м'яку фіксацію тварини, за необхідності проводять загальне знечулення прийнятими методами. Обстеження проводять у
 10 положенні тварини лежачи на спині за допомогою ультразвукового апарату, що працює в режимі реального часу з використанням датчиків частотою понад 10 МГц з функцією М-режиму, доплерографії, соноеластографії. Виконують багатоплощинне сканування для забезпечення достатньої візуалізації досліджуваного органу. Оцінку стану органів тварин проводять відповідно до критеріїв і моделей ультразвукової діагностики органів людини. Проводять
 15 ехокардіографію у поздовжньому та поперечному скануванні серця, використовуючи М-режим. Визначають фракцію викиду, при доплерографії визначають максимальну систолічну швидкість у гирлі аорти. Проводять оцінку системної гемодинаміки, оцінюючи стан цільових внутрішніх органів. Так, оцінюють такі параметри: розміри печінки, щільність паренхіми печінки, діаметр вен великого кола кровообігу - нижньої порожнистої, печінкових, ниркових вен, стан
 20 портальної системи, ниркового кровоплину, наявність асцитів, гідротораксу тощо. Проводять введення препаратів під ультразвуковим контролем в серцеву сумку та в плевральну порожнину тварин голкою товщиною 29-31 G, а також для отримання матеріалу виконують тонкогловку аспіраційну біопсію. Пункційне втручання виконують при адекватній візуалізації, проводять у поперечному (out of plane) скануванні.

25 Приклади конкретного використання з клінічною до дослідницькою метою.

Приклад 1

Дослідження ефективності введення експериментальних препаратів на основі наночастинок. Проводилося моделювання серцевої недостатності згідно описаного способу на
 30 щурах лінії Вістар вагою 350 г (вік тварин - 3,5 міс.) та вага 200 г (вік тварин - 2 міс.). Після п'ятої ін'єкції препарату спостерігали клінічні ознаки серцевої недостатності - ціаноз хвостів, лапок.

Після досягнення порушення серцевої діяльності, зареєстрованого за допомогою УЗД, тваринам вводились перорально, отримано статистично значимі дані змін стану внутрішніх органів щура під дією препаратів порівняно з контрольною групою. Попередні результати
 35 свідчать про ефективність введення препаратів в порожнину перикарду - зареєстровано найбільш швидке відновлення показників гемодинаміки у таких тварин. Вторинні ознаки серцевої недостатності в експерименті були більш репрезентативними, ніж дані ехокардіографії.

Ультразвукове дослідження є ефективним методом для прижиттєвого моніторингу стану цільових органів тварини при моделюванні серцевої недостатності. Новий підхід може
 40 збільшити ефективність наукового експерименту за рахунок тривалого динамічного спостереження за тваринами. Інтервенційна сонографія є ефективним методом для цільового введення речовин в порожнину плеври та перикарду, а також з метою отримання матеріалу для прижиттєвого дослідження.

Корисна модель пояснюється рисунками, на яких зображено:

Фіг. 1. Ультразвукове обстеження фіксованого щура.

Фіг. 2. Дані ехокардіографії у щура.

Фіг. 3. Ультрасонограма. Асцит у щура. Біля печінки виявлена смуга рідини - непряма ознака венозного застою у великому колі кровообігу.

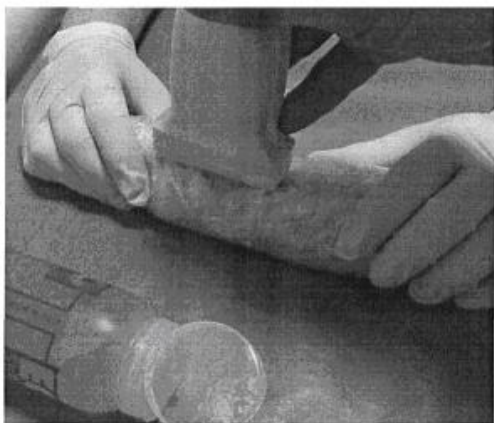
5 Фіг. 4, 5. Сонограма печінки. Фіг. 4 - розширена нижня порожниста вена до 45 мм; Фіг. 5 - розширені печінкові вени - непрямі ознаки венозного застою у великому колі кровообігу.

Фіг. 6. Сонограма. Гідроторакс у щура. В плевральній порожнині виявлена вільна рідина - непряма ознака венозного застою у малому колі кровообігу.

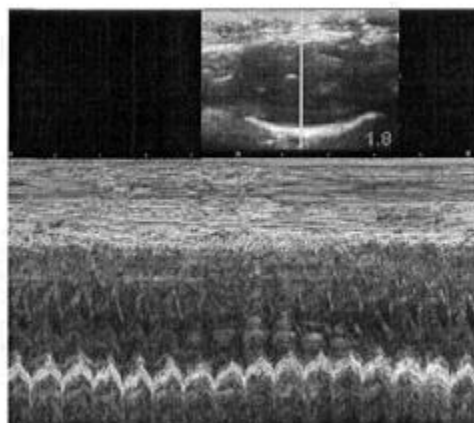
10 Таким чином, спосіб моделювання серцевої недостатності, який включає проведення експерименту на лабораторних тваринах (щурах) із введенням кардіотоксичного препарату з прижиттєвим динамічним ультразвуковим дослідження, може використовуватись з дослідницькою метою, для проведення фундаментальних, доклінічних досліджень, розробки нових лікарських засобів, є доступним та наочним методом та може рекомендуватись для впровадження для науково-дослідних інститутах, центрах, підрозділах кардіології, 15 ультразвукової діагностики, інтервенційної сонографії.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб моделювання серцевої недостатності, що включає проведення експерименту на лабораторних тваринах (щурах) із введенням кардіотоксичного препарату, який **відрізняється** тим, що тварині вводять загальну кумулятивну дозу доксорубіцину 12,45-23,1 мг/кг та проводять прижиттєве динамічне ультразвукове дослідження з використанням датчиків частотою понад 10 МГц, що включає ехокардіографію трансторакальним доступом з використанням доплерографії, визначення руху тканин та оцінку системної гемодинаміки, стану внутрішніх 25 органів, а також проводять введення препаратів під ультразвуковим контролем в серцеву сумку та в плевральну порожнину тварин.



Фіг. 1



Фіг. 2

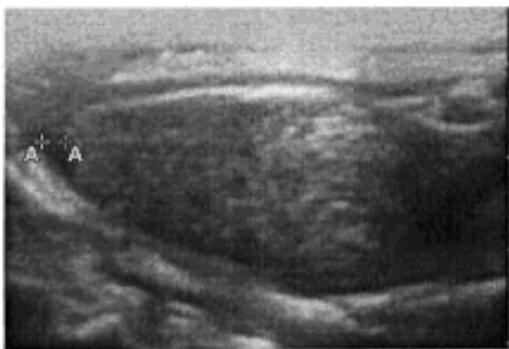


Fig. 3

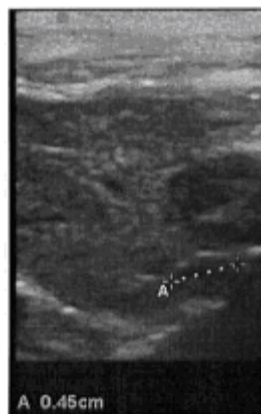


Fig. 4

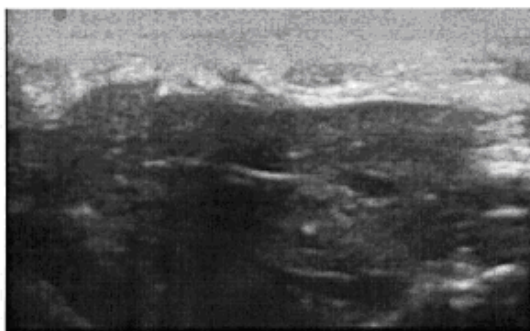


Fig. 5

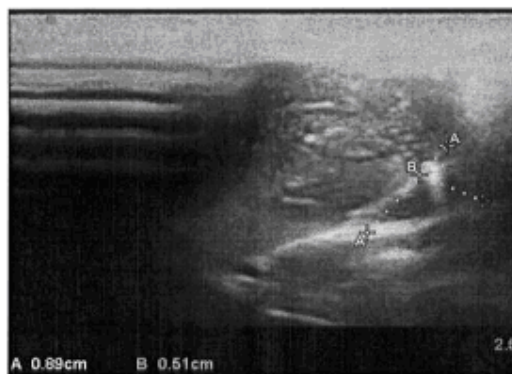


Fig. 6

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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