



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61B 5/021 (2006.01); G09B 23/28 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017105755, 21.02.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.02.2017

Дата регистрации:
30.01.2018

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 21.02.2017

(45) Опубликовано: 30.01.2018 Бюл. № 4

Адрес для переписки:
308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Цуриковой
Н.Д.

(72) Автор(ы):

Даниленко Людмила Михайловна (RU),
Тимохина Алена Сергеевна (RU),
Хаванский Анатолий Вячеславович (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Довгань Антон Павлович (RU),
Колесниченко Павел Дмитриевич (RU),
Тарасова Алла Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ЯЦИНЮК Б.Б. и др. Вестник
Уральской медицинской академии наук,
2010, N 1, С. 71-75. RU 2194436 C2, 20.12.2002.
RU 2491963 C1, 10.09.2013. RU 2167597 C2,
27.05.2001. CN 102608089 A, 25.07.2012. US
20020143259 A1, 03.10.2002. ГУБАРЕВА И.В.
Способ диагностики диастолической
дисфункции левого желудочка у больных с
артериальной гипертонией. Известия (см.
прод.)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ КАРДИОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной кардиофармакологии, и может быть использовано в комплексной оценке активности фармакологических средств на изолированном сердце крысы. Для этого способ включает регистрацию показателей сократимости в условиях навязывания сердцу высокого ритма сокращений и гиперкальциевой нагрузки. При этом регистрируют показатели сократительной функции левого желудочка, затем для определения динамики диастолического

напряжения проводят 20-минутную перфузию сердца раствором, содержащим 5 ммоль/л Ca^{2+} . В последующим навязывают частоту сокращения до 480 уд./мин в течение 15 сек с помощью электрического стимулятора. После чего рассчитывают коэффициент $STPI$ (площадь дефекта диастолы) в усл.ед. путем складывания площадей трапеций под кривой подъема конечно-диастолического давления и оценивают сократительную функцию сердца с учетом

показателей физиологических значений S_{ТТ}.
Способ обеспечивает информативность и
повышение достоверности показателей оценки
степени кардиопротективной или

кардиотоксической активности
фармакологических средств с помощью
коэффициента S_{ТТ}. 2 ил., 3 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

Самарского научного центра Российской академии наук, том 16, N 5(4), 2014, с.1266-1268. YAO
YY et al. Activation of Akt and cardioprotection against reperfusion injury are maximal with only five
minutes of sevoflurane postconditioning in isolated rat hearts. J Zhejiang Univ Sci B. 2013 Jun;14(6):511-7.

R U 2 6 4 3 1 0 4 C 1

R U 2 6 4 3 1 0 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61B 5/021 (2006.01)
G09B 23/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61B 5/021 (2006.01); *G09B 23/28* (2006.01)

(21)(22) Application: **2017105755**, **21.02.2017**

(24) Effective date for property rights:
21.02.2017

Registration date:
30.01.2018

Priority:

(22) Date of filing: **21.02.2017**

(45) Date of publication: **30.01.2018** Bull. № 4

Mail address:
**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul. Pobedy,
85, NIU "BelGU", OIS, Tsurikovej N.D.**

(72) Inventor(s):

**Danilenko Lyudmila Mikhajlovna (RU),
Timokhina Alena Sergeevna (RU),
Khavanskij Anatolij Vyacheslavovich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Dovgan Anton Pavlovich (RU),
Kolesnichenko Pavel Dmitrievich (RU),
Tarasova Alla Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU@") (RU)**

(54) **METHOD OF CARDIOPROTECTIVE ACTIVITY ESTIMATION OF PHARMACOLOGICAL FACILITIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely, to experimental cardiac pharmacology, and can be used in a comprehensive assessment of the activity of pharmacological agents on an isolated rat heart. For this, method includes the registration of indices of contractility under conditions of imposing a high rhythm of contractions and hypercalcium load on the heart. At the same time, the parameters of the contractile function of the left ventricle are recorded, then a 20-minute perfusion of the heart with a solution containing 5 mmol/l of Ca²⁺ is performed to determine the dynamics of the diastolic stress. In the future, the

reduction frequency is set to 480 bpm for 15 seconds using an electric stimulator. Then the coefficient S_{TTI} (area of defect diastole) is calculated in conventional units by folding trapezium squares under the curve of elevation of the end-diastolic pressure and evaluating the contractile function of the heart, taking into account the physiological values of S_{TTI}.

EFFECT: method provides information and increase in the reliability of evaluation indicators of the degree of cardioprotective or cardiotoxic activity pharmacological means using the coefficient S_{TTI}.

1 cl, 2 dwg, 1 ex, 3 tbl

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной кардиофармакологии, и может быть использовано в комплексной оценке кардиопротективной активности фармакологических средств в экспериментальных группах животных.

5 Известна оценка влияния кардиотоксичности некоторых лекарственных препаратов с помощью методики регистрации поглощения ионов кальция изолированным сердцем крысы (Заложных Е.А., Пискунова К.А., Гардиенко Т.О//Международный студенческий научный вестник. – 2016. – № 4 (часть 2)– С. 148-149), которая заключается в регистрации
10 поглощения ионов кальция изолированным сердцем, позволяющей проводить оценку влияния лекарственных средств на работу сердца.

Основным недостатком данного способа является влияние ряда препаратов (пираретам, верапамил и др.), имеющих высокую чувствительность на процесс Na^+ - Ca^{2+} обмена в сердце крыс, что снижает достоверность результатов.

15 Также существует способ оценки кардиопротективного действия препаратов при проведении пробы на нагрузку сопротивлением (Меерсон Ф.З. Метаболизм и функция кардиомиоцита, 1984; Кузнецов В.И. Сократительная функция, экстракардиальная регуляция и морфологические изменения в сердце крыс в динамике длительной непрерывно действующей стрессорной ситуации, 1990).

20 Недостатком этого способа является оценка функциональных возможностей миокарда *in vivo* по результатам абсолютных показателей левожелудочкового давления (ЛЖД), что при моделировании артериальной гипертензии, сердечной недостаточности, стресса и т.д. неминуемо запускает системные механизмы поддержания гомеостаза и, следовательно, является малоинформативным.

25 Неинвазивная оценка систолической функции сердца с помощью постоянно-волновой доплерэхокардиографии у собак с митральной регургитацией (К. Asano, Y. Masui, K. Masuda, T. Fujinaga. // Кардиология. – 2003. – С. 28-30), которая заключалась в том, что хорду митрального клапана дважды рассекли биотомом, введенным в ЛЖ через наружную сонную артерию. С помощью левосторонней вентрикулографии у всех собак оценили выраженность митральной регургитации согласно классификации Seller.
30 Результаты в эксперименте оценивали не ранее чем через 6 месяцев после формирования митральной регургитации.

Недостатком этого способа является длительное время эксперимента, сложность хирургических манипуляций и высокая стоимость оборудования.

35 Известен способ оценки кардиопротективного действия лекарственных средств по результатам измерения левожелудочкового давления при моделировании артериальной гипертензии (RU № 2194436, опубл. 20.12.2002). Основным недостатком данного способа является то, что данная модель не дает возможности оценить основные важные пути связанные с кардиопротективным эффектом, и не исключает влияние экстракардиальных факторов на сократимость миокарда, и выявляемые нарушения сократительной функции
40 сердца могут быть обусловлены повреждениями самого сердца. Кроме того, в данном способе используется сложная математическая модель.

Известен способ оценки сократимости и метаболизма изолированных сердец при токсических дозах ингибиторов АПФ (Яцинюк Б.Б., Сенцов В.Г., Долгих В.Т., Брусин К.М.//Вестник Уральской медицинской академии наук. – 2010. – № 1– С. 71-75), который
45 заключается в изучении сократимости и метаболизма изолированного сердца крысы по Лангендорфу, при введении токсических доз эналапа, с навязыванием сердцу высокого ритма сокращений и гиперкальциевой нагрузкой. Однако дефект диастолы оценивали лишь по показателям сократимости и метаболизма миокарда, не определяя площадь

под кривой, как один из информативных и точных показателей, характеризующий повреждение сердца.

Задачей изобретения является создание способа оценки кардиопротективной активности фармакологических средств, позволяющего объективно оценить степень кардиопротективной активности в экспериментальных группах животных.

Поставленная задача решается с помощью предлагаемого способа оценки кардиопротективной активности фармакологических средств, включающего моделирование патологии кардиомиопатии путем введения доксорубина внутривенно в дозе 20 мг/кг, через 48 ч оценку показателей сократимости левого желудочка в условиях высокого ритма сокращений 480 уд./мин в течение 15 с на фоне увеличения концентрации Ca^{2+} до 5 ммоль в перфузате на изолированном сердце крыс, кроме того, в качестве дополнительного критерия оценки кардиопротективной активности фармакологических средств используют коэффициент S_{TTI} , отражающий дефект диастолы - площади под кривой подъема конечно-диастолического давления.

Техническим результатом изобретения является информативность и повышение достоверности показателей оценки степени кардиопротективной активности фармакологических средств с помощью коэффициента S_{TTI} .

Для оценки резервных возможностей миокарда использовали индекс «напряжения по времени» Tension-Time Index (TTI) — показатель изменения механического напряжения миокарда, вычисляемый по кривой динамики внутрижелудочкового давления методом планиметрирования (т.е. измерением площади, заключенной под кривой). Площадь под кривой рассчитывали путем складывания площадей трапеций и которая равна произведению ее высоты на среднюю линию. Коэффициент диастолической дисфункции или дефект диастолы (S_{TTI}) выражали в усл. ед.

В экспериментах на изолированном сердце крыс проводили оценку кардиотоксического действия на доксорубиновой модели патологии (20 мг/кг, внутривенно) путем навязывания сердцу высокой частоты сокращений (480 уд./мин) в условиях увеличения концентрации Ca^{2+} до 5 ммоль в перфузате. В качестве критерия использован коэффициент S_{TTI} . Для этого рассчитывали площадь дефекта диастолы (S_{TTI}) путем оценки площади под кривой подъема конечно-диастолического давления в течение 15 с с навязыванием сердцу высокого ритма сокращений. При этом у интактных крыс S_{TTI} равен $1,4 \pm 0,1$ усл.ед., а у крыс с моделированием патологии $8,3 \pm 0,3$ усл.ед.

Изобретение поясняется фиг. 1 и 2.

На фиг. 1 продемонстрирована динамика показателей сократимости: левожелудочковое давление (ЛЖД, мм рт.ст.), частота сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин), максимальная скорость сокращения ($+dP/dt_{max}$, мм рт.ст./с), максимальная скорость расслабления миокарда ($-dP/dt_{max}$, мм рт.ст./с), показатели конечно-диастолического давления (КДД) на изолированном сердце у интактных животных путем навязывания сердцу высокого ритма сокращений (480 уд./мин) в условиях увеличения концентрации Ca^{2+} до 5 ммоль в перфузате.

На фиг. 2 продемонстрирована динамика показателей сократимости: левожелудочковое давление (ЛЖД, мм рт.ст.), частота сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин), максимальная скорость сокращения ($+dP/dt_{max}$, мм рт.ст./с), максимальная скорость расслабления миокарда ($-dP/dt_{max}$, мм рт.ст./с), показатели конечно-диастолического давления (КДД) у животных на фоне кардиотоксического действия

на доксорубицина (через 48 ч после в/б введения 20 мг/кг) в условиях навязывания сердцу высокого ритма сокращений (480 уд./мин) при увеличении концентрации Ca^{2+} до 5 ммоль в перфузате.

5 Технический результат достигается тем, что при оценке результатов в интактной группе при навязывания сердцу высокого ритма сокращений (480 уд./мин) в условиях увеличения концентрации Ca^{2+} до 5 ммоль в перфузате, дефект диастолы был в пределах физиологических значений ($S_{\text{ТТГ}}$ - $1,4 \pm 0,1$ усл.ед.) (фиг. 1).

10 При оценке результатов в группе на фоне кардиотоксического влияния доксорубицина у всех сердец было отмечено снижение ЛЖД, отрицательные инотропные эффекты и значительное повышение диастолического давления, что свидетельствует о нарушении расслабления миокарда. При этом коэффициент $S_{\text{ТТГ}}$ составил $8,3 \pm 0,3$ усл.ед. (фиг. 2).

Способ осуществлялся следующим образом.

15 Исследование проводили на изолированных сердцах крыс Wistar с массой тела 300 ± 20 г. Все крысы были разделены на 4 опытные группы по 8 животных. Первая группа, контрольная, которой внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Второй группе внутрибрюшинно вводили доксорубицин (Teva) в кумулятивной дозе 20 мг/кг, однократно. Животных из эксперимента выводили через 48 ч. Сердца извлекали у животных под золепидовым наркозом (30 мг/кг) и помещали в «ледяной» ($2-4^{\circ}\text{C}$)
20 раствор Кребса-Хензеляйта следующего состава (ммоль): NaCl – 118,5; KCl – 4,7; $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; KH_2PO_4 – 1,2; CaCl_2 – 1,5; глюкоза – 11,1; NaHCO_3 – 25,0. Уровень pH раствора в ходе всего эксперимента составлял 7,4. После прекращения спонтанных сокращений выделяли аорту и отделяли соединительную ткань. Затем аорту
25 канюлировали и производили ретроградную перфузию сердца методом Лангендорфа в режиме проточной перфузии в течение 20 мин раствором Кребса-Хензеляйта, насыщенным карбогеном ($95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$) при 37°C и при давлении 100 мм рт.ст. и скорости перфузата 10 мл/мин. Сократительную функцию сердца регистрировали с помощью введенного в полость левого желудочка латексного баллончика, соединенного
30 с датчиком давления, встроенного в аппарат для физиологических исследований MP150 компании «Biopac Systems, Inc» (California, USA). Баллончик заполняли дистиллированной водой, объем которой был достаточным для создания конечно-диастолического давления в левом желудочке на уровне 3-5 мм Hg. С помощью оригинальной прикладной программы Acq Knowledge компании «Biopac Systems, Inc» (California, USA) у всех крыс
35 проводили регистрацию показателей сократимости: левожелудочковое давление (ЛЖД, мм рт.ст.), частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин), максимальную скорость сокращения ($+dP/dt_{\text{max}}$, мм рт.ст./с), максимальную скорость расслабления миокарда ($-dP/dt_{\text{max}}$, мм рт.ст./с). Затем для определения динамики диастолического напряжения сердца использовали прием увеличения частоты до 480 уд./мин в условиях концентрации
40 Ca^{2+} (2,5 ммоль/л) и увеличения его содержания в 2 раза до 5 ммоль/л. Для создания высокой частоты (480 уд./мин) на металлизированную канюлю присоединяли коннектор-земля электрического стимулятора, а на ушко левого предсердия присоединяется коннектор-плюс. После 20 мин перфузии раствором с высоким содержанием Ca^{2+} (5 ммоль/л) сердце подвергалось стимуляции электрическими импульсами с помощью
45 прибора STM 200-1 компании «Biopac Systems, Inc» (California, USA) в течение 15 с.

Пример конкретного выполнения

Показатели сократительной функции сердец всех исследуемых групп в исходном состоянии и при повышении концентрации Ca^{2+} до 5 ммоль/л представлены в таблицах

1 и 2.

Исследования показали, что в условиях данной патологии изменения сократимости характеризуется отрицательным инотропным действием (таблица 1).

Показатели сократительной функции сердца крыс ($M \pm m$; $n=8$) 2,5 ммоль Ca^{2+} в перфузате

Таблица 1

Группы животных	ЛЖД мм рт.ст.	+dp/dt мм рт.ст./с	+dp/dt мм рт.ст./с	ЧСС уд./мин
Интактные животные	87,3±9,2**	1555,7±162,2**	-1465,2±173,2**	248±32,1
Контроль доксорубин за 48 ч (20 мг/кг)	69,5±11,2*	1246,7±154,3*	-1136,1±159,4*	247±29,4

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных;

** - $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля

Показатели сократительной функции сердца крыс ($M \pm m$; $n=8$) 5 ммоль Ca^{2+} в перфузате при стимуляции (480 уд./мин)

Таблица 2

Группы животных	ЛЖД мм рт.ст.	+dp/dt мм рт.ст./с	-dp/dt мм рт.ст./с	ЧСС уд./мин
Интактные животные	127±12,7**	1238,4±92,9**	-1102,6±74,4**	240±24,1
Контроль доксорубин за 48 ч (20 мг/кг)	155±21,2*	633,4±154,3*	-561,6±89,2*	273±30,4*

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; ** - $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля

Дальнейшим этапом экспериментов явилось повышение концентрации ионов Ca^{2+} до 5 ммоль/л в перфузионном растворе. После 20 мин перфузии раствором с высоким содержанием Ca^{2+} (5 ммоль/л) сердце подвергалось стимуляции электрическими импульсами в течение 15 с. Перфузия интактных сердец и сердец в группе контроля, раствором с повышенной концентрацией ионов кальция в течение 1-й мин проявлялась положительным инотропным эффектом, что выражалось в возрастании систолического давления и его скоростных характеристик. При этом конечно-диастолическое давление увеличивалось до 20-25 мм рт.ст. и формировало дефект диастолы. В цифровом выражении коэффициент S_{TTI} составил $S_{TTI} - 1,4 \pm 0,1$ усл.ед. (фиг. 1) (таблица 3).

В группе с моделированием доксорубициновой кардиомиопатии при навязывании высокого ритма сокращений (480 уд./мин) положительный инотропный эффект не развивался, а происходило увеличение конечно-диастолического давления до 40-60 мм рт.ст. Дефект диастолы и в цифровом выражении S_{TTI} составил $S_{TTI} - 8,3 \pm 0,3$ усл.ед. (фиг.2) (таблица 3).

Коэффициент дефекта диастолы S_{TTI} , усл.ед. (при доксорубициновой модели кардиомиопатии)

Таблица 3

Группы животных	Коэффициент S_{TTI}
Интактные животные	1,4±0,1**
Контроль доксорубин за 48 ч (20 мг/кг)	8,3±0,3*

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; ** - $p < 0,05$ в сравнении с группой контроля

Таким образом, приведенные результаты наглядно демонстрируют, что для оценки кардиопротективной активности фармакологических средств цифровым значением является коэффициент дефекта диастолы $S_{\text{ТТ}}$ в виде планиметрического измерения площади под кривой конечно-диастолического давления.

5

(57) Формула изобретения

Способ оценки сократительной функции изолированного сердца крысы, включающий регистрацию показателей сократимости в условиях навязывания сердцу высокого ритма сокращений и гиперкальциевой нагрузки, отличающийся тем, что регистрируют
10 показатели сократительной функции левого желудочка, затем для определения динамики диастолического напряжения проводят 20-минутную перфузию сердца раствором, содержащим 5 ммоль/л Ca^{2+} , с последующим навязыванием частоты сокращения до 480 уд./мин в течение 15 с с помощью электрического стимулятора, после чего
15 рассчитывают коэффициент $S_{\text{ТТ}}$ (площадь дефекта диастолы) в усл.ед. путем складывания площадей трапеций под кривой подъема конечно-диастолического давления и оценивают сократительную функцию сердца с учетом показателей физиологических значений $S_{\text{ТТ}}$.

20

25

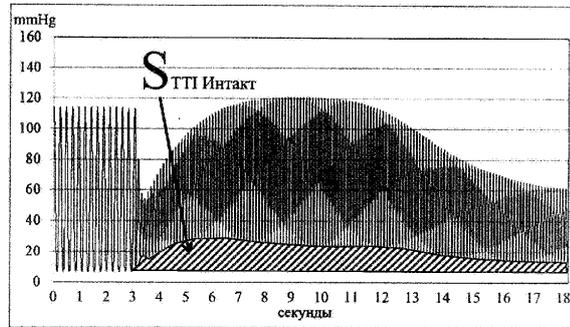
30

35

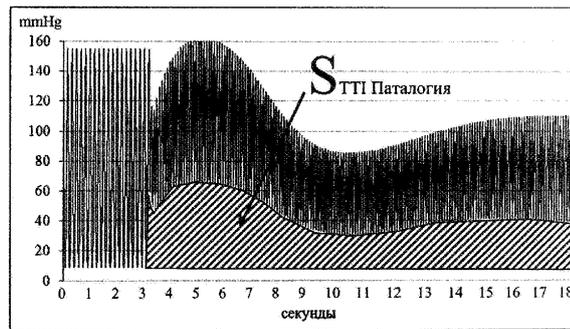
40

45

Способ оценки кардиопротективной
активности фармакологических средств



Фиг. 1



Фиг. 2