



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61N 5/10 (2022.05)

(21)(22) Заявка: 2022105546, 02.03.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
02.03.2022

Дата регистрации:  
01.08.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.03.2022

(45) Опубликовано: 01.08.2022 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул.  
Ленинградская, 70, ФГБУ РНЦРХТ МЗРФ,  
Попова Алена Александровна

(72) Автор(ы):

Корытов Олег Витальевич (RU),  
Корытова Луиза Ибрагимовна (RU),  
Морозова Анна Валерьевна (RU),  
Макаров Виктор Евгеньевич (RU),  
Попова Алена Александровна (RU),  
Майстренко Дмитрий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Российский научный центр  
радиологии и хирургических технологий  
имени академика А.М. Гранова"  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 131892 U1, 27.08.2013. RU 2313312  
C1, 27.12.2007. RU 2210816 C2, 20.08.2003. RU  
2734568 C1, 20.10.2020. AREF Z. et al., Variations  
in Surgical Procedures for Inducing Hind Limb  
Ischemia in Mice and the Impact of These  
Variations on Neovascularization Assessment. Int  
J Mol Sci. 2019, 20(15), pp. 3704. LEJAY A. et al.  
A New Murine Model of (см. прод.)

(54) Способ моделирования хронической ишемии у экспериментальных животных.

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальным и доклиническим исследованиям, и может быть использовано для моделирования хронической ишемии у экспериментальных животных. Осуществляют визуализацию бедренной артерии при помощи компьютерно-томографического исследования или магниторезонансной томографии. Облучают

бедренную артерию при помощи ионизирующего излучения на установке для стереотаксической лучевой терапии одной фракцией с суммарной очаговой дозе 20-25 Гр. Способ обеспечивает отсутствие хирургических рисков, высокую конформность и развитие ишемии по физиологическому пути за счет воздействия ионизирующего излучения. 3 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

Sustainable and Durable Chronic Critical Limb Ischemia Fairly Mimicking Human Pathology. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2015, Volume 49, Issue 2, pp. 205-212.

RU 2 777 184 C1

RU 2 777 184 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A61N 5/10 (2022.05)*

(21)(22) Application: **2022105546, 02.03.2022**

(24) Effective date for property rights:  
**02.03.2022**

Registration date:  
**01.08.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **02.03.2022**

(45) Date of publication: **01.08.2022** Bull. № 22

Mail address:

**197758, Sankt-Peterburg, pos. Pesochnyj, ul.  
Leningradskaya, 70, FGBU RNTSRKHT MZRF,  
Popova Alena Aleksandrovna**

(72) Inventor(s):

**Korytov Oleg Vitalevich (RU),  
Korytova Luiza Ibragimovna (RU),  
Morozova Anna Valerevna (RU),  
Makarov Viktor Evgenevich (RU),  
Popova Alena Aleksandrovna (RU),  
Maistrenko Dmitrii Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe  
uchrezhdenie "Rossiiskii nauchnyi tsentr  
radiologii i khirurgicheskikh tekhnologii imeni  
akademika A.M. Granova" Ministerstva  
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**

(54) **METHOD FOR MODELING CHRONIC ISCHEMIA IN EXPERIMENTAL ANIMALS.**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to experimental and preclinical studies, and can be used to simulate chronic ischemia in experimental animals. The femoral artery is visualized using computed tomography or magnetic resonance imaging. The femoral artery is irradiated with ionizing radiation

on a stereotaxic radiation therapy unit with a single fraction with a total focal dose of 20-25 Gy.

EFFECT: method ensures the absence of surgical risks, high conformity and the development of ischemia along the physiological path due to exposure to ionizing radiation.

1 cl, 3 dwg, 2 ex

RU 2 777 184 C 1

RU 2 777 184 C 1

Изобретение относится к медицине, касается экспериментальных и доклинических исследований и может быть использовано при моделировании хронической ишемии и изучении на этой модели механизмов ее развития и лечения.

5 На сегодняшний день существует множество способов моделирования хронической ишемии (ХИ). Для этих целей чаще всего используются сосуды задней конечности у лабораторных животных. Данные способы преимущественно заключаются в «окклюзионной оперативной методике», т.е. перекрытия кровотока в магистральной артерии.

10 Известен способ моделирования ишемии конечности, заключающийся в механическом перекрытии кровотоков в артериях 1-го и 2-го порядка соответственно от наружной подвздошной до подколенной артерии и расположенных ниже подколенной артерии, осуществляемый из обычного оперативного доступа по внутренней поверхности бедра (Патент РФ №2210816, опубл. 20.08.2003). Данный способ позволяет создать модель с

15 Однако перекрытие кровотока в артериях 2-го порядка, расположенных ниже подколенной артерии, как подтверждают проведенные эксперименты, может вызвать гангрену оперированной конечности, что делает данный метод не обеспечивающим создание качественной модели хронической ишемии конечности. Кроме того, способ не предусматривает перекрытия кровотока в артериях 2-го порядка, отходящих от артерий 1-го порядка на участке от наружной подвздошной до подколенной артерии достаточно быстро восстанавливается кровоток и компенсируются функциональные показатели кровообращения и метаболизм тканей в поздние сроки, что также делает этот способ, не обеспечивающим создания качественной модели для изучения хронической ишемии конечности. При этом использование вышеуказанного способа не позволяет добиться максимального приближения течения патологии к клиническому течению исследуемого заболевания.

20 Известен способ моделирования ишемии конечности (Патент РФ 2734568, опубл. 20.10.2020). Для визуализации бедренных артерий осуществляют полулунный разрез по медиальной поверхности бедра от паховой связки в дистальном направлении длиной 10-12 см. Ниже паховой связки тупым путем выделяют отходящую от аорты общую подвздошную артерию, наружную подвздошную артерию и внутреннюю подвздошную артерии. На устье общей подвздошной артерии накладывают лигатуру из не рассасывающегося шовного материала. Внутреннюю подвздошную артерию перевязывают и отсекают. Наружную подвздошную артерию перевязывают и прошивают не рассасывающимся шовным материалом, резецируют сегмент 4-5 см наружной подвздошной артерии. Выделяют общую бедренную артерию, проксимальные сегменты глубокой бедренной и поверхностной бедренной артерии. Отдельно перевязывают устье поверхностной и глубокой бедренных артерий не рассасывающимся шовным материалом.

35 Общими недостатками данных методов является высокая травматичность, риск инфекционных осложнений, а также увеличение риска смертности экспериментальных животных. Более того, хроническая ишемия развивается с течением времени, а предложенные методы формируют модель, не соответствующую физиологическому течению развития хронической ишемии, более характерно описывая острую или травматическую ишемию. Поэтому, существенным недостатком является то, что существующие модели хронической ишемии не позволяют добиться максимального приближения течения патологии к клиническому течению заболевания.

45 Таким образом, несмотря на наличие достаточного количества используемых

способов моделирования ХИ, существует настоятельная необходимость поиска новых, менее травматичных и рискованных методов, позволяющих добиться положительных результатов.

Наиболее близким к предлагаемому является способ моделирования фотодинамически-индуцированного тромбоза, описанный в статье «Моделирование фотодинамически-индуцированного тромбоза бедренной вены крыс» (Журнал «Регионарное кровообращение и микроциркуляция» 2019 г. 18(2)), который и взят нами в качестве прототипа.

В способе-прототипе исследования выполняли на крысах-самцах линии «Вистар» массой 250-290 г. В качестве фотосенсибилизатора (ФС) использовали Бенгальский розовый (БР), который вводили в виде 0,85 %-го раствора в 0,9 %-м стерильном растворе хлорида натрия в объеме 2 мл/кг (17 мг/кг) в хвостовую вену. Через 45 мин после введения БР животных наркотизировали (хлоралгидрат 4,3 % в 0,9 %-м стерильном растворе хлорида натрия в объеме 10 мл/кг) внутрибрюшинно и производили разрез кожи длиной около 3 см на внутренней поверхности бедра. Из сосудисто-нервного пучка выделяли участок бедренной вены длиной около 5 мм и подводили под него полосу непрозрачного пластика шириной 4 мм, изолируя тем самым окружающие ткани от последующего облучения. Лазерное облучение вены проводили при помощи диодного лазера «DPSS» (Республика Южная Корея), длина волны - 532 нм, мощность - 60 мВт, площадь облучения - 1 мм<sup>2</sup>, время облучения - 30 мин.

Было проведено 3 серии экспериментов. В первой серии опытов (n=5) через 1 ч после введения БР проводили лазерное облучение бедренной вены в течение 30 мин, после чего определяли скорость кровотока и забирали образцы для гистологического исследования. Учитывая значение замедления скорости кровотока при моделировании тромбоза вен, во второй серии опытов (n=10) облучение проводили на фоне клипирования вены проксимальнее облучаемой зоны (клипса микрохирургическая сосудистая средняя, длина - 18 мм). Итоговый протокол был следующим: введение БР, через 60 мин - регистрация кровотока и клипирование бедренной вены, облучение вены в течение 30 мин дистальнее зажима, через 90 мин - снятие клипсы и повторная регистрация кровотока. В третьей серии опытов (n=5) через 1 ч после введения БР на бедренную вену накладывали клипсу и через 120 мин проверяли наличие кровотока.

Авторы отметили, что в первой и третьей серии опытов у всех крыс скорость кровотока значимо не менялась, т.е. проходимость вены сохранялась. Образование тромба не отмечалось. Однако во второй серии опытов (30-минутное лазерное облучение бедренной вены + клипирование) после снятия зажима у всех животных кровотока отсутствовал. После снятия зажима в вене определяется «молодой» тромб с небольшим количеством лейкоцитов. Ни у одного из 5 животных, у которых сосуды для гистологического исследования не иссекали, через 24 ч после фотодинамического воздействия кровотока в вене не восстановился. Это означало, что для тромбообразования в бедренной вене крыс при фотодинамическом воздействии необходимо дополнительное временное прекращение кровотока в облучаемом сосуде, что обеспечивает надежную воспроизводимость тромбоза бедренной вены.

Предложенный способ-прототип доказал свою эффективность, однако, на наш взгляд, не лишен ряда недостатков.

Как уже было отмечено нами, проведение оперативного вмешательства сопряжено с высокой травматичностью, риском развития инфекционных осложнений, а также увеличением летального исхода экспериментальных животных. Фотодинамическое воздействие, по данным авторов прототипа, само по себе не вызывает тромбоз. Для

этого необходимо дополнительно проводить клипирование сосуда, что фактически не отличает данный способ от описанных выше. Развитие тромбоза, также, как и в описанных выше способах происходит по схеме развития острой ишемии, что также сопряжено с высокими рисками некротизации нижележащих конечностей, а также не создает модели, повторяющей развитие патологических процессов в естественной среде.

Технический результат настоящего изобретения заключается в создании эффективного и безопасного способа моделирования хронической ишемии, обеспечивающего максимальное приближение к клиническому течению заболеваний, за счет постепенной обтурации просвета магистральных сосудов, позволяющей с течением времени реагировать естественными компенсаторными механизмами (развитие коллатерального кровообращения) на дефицит кровообращения.

Этот результат достигается тем, что в известном способе моделирования хронической ишемии у экспериментальных животных, включающем визуализацию бедренной артерии с последующим ее облучением, согласно изобретению, визуализацию ее выполняют при помощи компьютерно-томографического исследования или магнитно-резонансной томографии, а облучение проводят при помощи ионизирующего излучения на установке для стереотаксической лучевой терапии одной фракцией с суммарной очаговой дозе 20-25 Гр.

Известно, что ионизирующее излучение приводит к повреждению клеток стенки сосудов, включая ее интиму (История лучевой терапии на протонном пучке с энергией 1000 МэВ. Гатчинский метод. Корятов О.В., Корятова Л.И., Ахтемзянов А.Р. 2018 г., Санкт-Петербург). Это связано с тем, что оно вызывает повреждение в клеточной ДНК, включая более 20 типов повреждений основания, разрывы с одной нитью, разрывы с двумя нитями и сшивки ДНК. Повреждение молекулы-мишени происходит в результате прямого и непрямого (или косвенного) действия излучения. При прямом механизме радиационно-индуцированного повреждения клеток происходит непосредственное взаимодействие излучения с молекулой мишени. Второй механизм радиационно-индуцированного повреждения клеток осуществляется активными продуктами (например, радикалами), образовавшимися из других молекул в результате их непосредственного взаимодействия с излучением. Механизм непрямого токсичности после облучения, заключается в воспалительном процессе. После облучения в окружающей ткани начинается провоспалительная реакция, приводящая к образованию многочисленных провоспалительных цитокинов и хемокинов. К ним относятся интерлейкин-1, интерлейкин-6, фактор некроза опухоли  $\alpha$  и трансформирующий фактор роста  $\beta$ . (Кардиоонкология: влияние химиотерапевтических препаратов и лучевой терапии на сердечно-сосудистую систему / Д. П. Дундуа, А. В. Стаферов, А. В. Сорокин, А. Г. Кедрова // Клиническая практика. - 2016. - № 4(28). - С. 41-48. Л. И. Галченко, В. В. Маточкин ЛУЧЕВЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ Учебное пособие для студентов, Иркутск, ИГМУ, 2015).

Развитие местных лучевых повреждений представляется в виде следующей патогенетической схемы. На начальных этапах происходит повреждение кровеносной системы, проявляющееся первоначально функциональными (стаз, спазм), а затем и морфологическими изменениями, что приводит к повышению давления в капиллярах и нарушению процессов микроциркуляции. Вследствие этого в стенке сосудов нарастают явления гипоксии и как следствие происходит усиление склеротических процессов, что в свою очередь вызывает нарастание явлений гипоксии. Как следствие, повреждения интимы стенки сосуда инициируется формирование пристеночных тромбов, блокирующих нормальный ток крови. (Александров С.Н. Отдалённая лучевая патология

млекопитающих: неопухолевые и опухолевые проявления отдаленной лучевой патологии, основы профилактики отдаленной лучевой патологии и терапии радиационных поражений. Санкт-Петербург: РНЦРХТ им. ак. А. М. Гранова Минздрава России, 2019. - 258 с.).

5 Занимаясь лечением больных с онкологическими заболеваниями, мы отметили, что при проведении лучевой терапии, особенно в условиях ультрагипофракционирования в гистологических материалах зачастую можно отметить фиброзную обтурацию просвета сосудов, питающих облучаемый орган, с признаками хронической ишемии окружающих тканей. Так, например, пациенту, страдающему от рака прямой кишки,  
10 было выполнена лучевая терапия в режиме 5 Гр в день 5 дней подряд. В связи с заболеванием пациента, провести хирургическое лечение сразу после облучения не удалось, оперативное лечение было отложено на 10 недель. После операции удаленный материал (прямая кишка с опухолью, мезоректальная клетчатка с лимфоколлекторами, питающие кишку сосуды (a.rectalis media, a.rectalis inferior, a.rectalis superior) был проведен,  
15 окрашен и изучен под микроскопом. В просвете a.rectalis media (Фиг. 1, Фиг. 2) обнаружена обтурация просвета с признаками ишемизации окружающих тканей, характерными для длительно протекающего процесса, без ярко выраженного острого блокирования кровотока.

Для лучшего понимания, приводим описание чертежей:

20 Фиг. 1. - фиброзно-обтурированный просвет a.rectalis media. Резко выраженная пролиферация интимы артерии с субтотальной облитерацией ее просвета после лучевой терапии (окраска гематоксилин-йозин, увеличение X 50).

Фиг. 2. - фиброзно-обтурированный просвет a.rectalis media. Резко выраженная пролиферация интимы артерии с субтотальной облитерацией ее просвета после лучевой  
25 терапии (окраска гематоксилин-йозин, увеличение X 200).

Фиг. 3 - Фиксация животного на стереотаксической раме аппарата «Gamma-Knife»

Это побудило нас попробовать применить подобный метод облучения магистральных сосудов для моделирования хронической ишемии у экспериментальных животных.

Для уточнения наиболее подходящих доз облучения нами была проведена серия  
30 экспериментов. В качестве животных для создания модели использовали крыс линии «Вистар», 200-250 гр, 15 самцов, 15 самок. Необходимо отметить, что всем животным визуализация бедренной артерии была проведена при помощи компьютерно-томографического исследования или магнитно-резонансной томографии, что позволило избежать проведения оперативного вмешательства.

35 1. Десять крыс «Вистар» 5 самцов, 5 самок были последовательно наркотизированы и фиксированы. Проведена визуализация правой бедренной артерии на аппарате МРТ. При помощи программного обеспечения «Gamma Plan 11.3» проведено предлучевое планирование. Крыса фиксирована в удерживающем устройстве аппарата Lexell Gamma-Knife (Фиг. 3) после чего подведена доза 15 Гр за 1 сеанс. Крысы обследованы через 4  
40 месяца, у 2 самцов и 1 самок выявлена обтурация просвета облученной бедренной артерии, у остальных животных изменений в просвете сосуда не выявлено. Таким образом, данная доза была признана недостаточной для гарантированного создания модели ХИ.

2. Десять крыс «Вистар» 5 самцов, 5 самок были последовательно наркотизированы  
45 и фиксированы. Проведена визуализация правой бедренной артерии на аппарате МРТ. При помощи программного обеспечения «Gamma Plan 11.3» проведено предлучевое планирование. Крыса фиксирована в удерживающем устройстве аппарата Lexell Gamma-Knife после чего подведена доза 20 Гр за 1 сеанс. Крысы обследованы через 4 месяца,

у 5 самцов и 5 самок выявлена обтурация просвета облученной бедренной артерии, таким образом, данная доза была признана достаточной для гарантированного создания модели ХИ.

3. Десять крыс «Вистар» 5 самцов, 5 самок были последовательно наркотизированы и фиксированы. Проведена визуализация правой бедренной артерии на аппарате МРТ. При помощи программного обеспечения «Gamma Plan 11.3» проведено предлучевое планирование. Крыса фиксирована в удерживающем устройстве аппарата Lexell Gamma-Knife после чего подведена доза 25 Гр за 1 сеанс. Крысы обследованы через 4 месяца, у 5 самцов и 5 самок выявлена обтурация просвета облученной бедренной артерии, таким образом, данная доза была признана достаточной для гарантированного создания модели ХИ.

4. Десять крыс «Вистар» 5 самцов, 5 самок были последовательно наркотизированы и фиксированы. Проведена визуализация правой бедренной артерии на аппарате МРТ. При помощи программного обеспечения «Gamma Plan 11.3» проведено предлучевое планирование. Крыса фиксирована в удерживающем устройстве аппарата Lexell Gamma-Knife после чего подведена доза 30 Гр за 1 сеанс. Крысы обследованы через 4 месяца, у 1 самца и 1 самки выявлено формирование варикозного расширения бедренной вены с ее тромбозом и некрозом конечности. У 4 самцов и 4 самок выявлена обтурация просвета облученной бедренной артерии, таким образом, данная доза была признана избыточной для создания модели ХИ и приводящей к повреждению соседних сосудов.

Таким образом, при помощи проведенных экспериментов мы определили, что облучение одной фракцией с суммарной очаговой дозе 20-25 Гр обеспечивает надежное создание модели хронической ишемии, не вызывая при этом негативных последствий для экспериментальных животных. А за счет постепенной обтурации просвета магистральных сосудов, обеспечивает максимальное приближение к клиническому течению заболеваний.

Применение ионизирующего излучения, подведенного при помощи установок для стереотаксической лучевой терапии, использующих фотонное излучение, гамма-излучение и протонное излучение подобных установок для моделирования хронической ишемии оправдано, и обеспечивает подведение однократного запланированного максимума необходимой дозы с высоким краевым градиентом в орган-мишень.

Также к преимуществам использования таких установок для моделирования хронической ишемии можно отнести отсутствие хирургических рисков, высокую конформность и развитие ишемии по физиологическому пути.

Сущность способа поясняется примерами.

#### Пример 1

Крыса линии «Вистар», самец, весом 248 гр была последовательно наркотизирована и фиксирована. Проведена визуализация правой бедренной артерии на аппарате МРТ. При помощи программного обеспечения «Gamma Plan 11.3» проведено предлучевое планирование. Крыса фиксирована в удерживающем устройстве аппарата Lexell Gamma-Knife (Фиг. 3), после чего подведена доза 20 Гр за 1 сеанс на область правой бедренной артерии. Крыса обследована через 4 месяца. Выявлена обтурация просвета облученной бедренной артерии, получена модель ишемии нижней конечности.

#### Пример 2

Крыса линии «Вистар», самка, весом 233 гр была последовательно наркотизирована и фиксирована. Проведена визуализация левой бедренной артерии на аппарате КТ. При помощи программного обеспечения «Gamma Plan 11.3» проведено предлучевое планирование. Крыса фиксирована в удерживающем устройстве аппарата Lexell Gamma-

Knife после чего подведена доза 25 Гр за 1 сеанс на область левой бедренной артерии. Крыса обследована через 4 месяца. Выявлена обтурация просвета облученной бедренной артерии, получена модель ишемии нижней конечности.

Предлагаемый способ моделирования хронической ишемии у экспериментальных животных имеет следующие преимущества перед аналогами:

1. Обеспечивает развитие ишемии по физиологическому пути;
2. Позволяет исключить хирургическое вмешательство для визуализации артерии;
3. Предлагаемый способ технически легко воспроизводим.

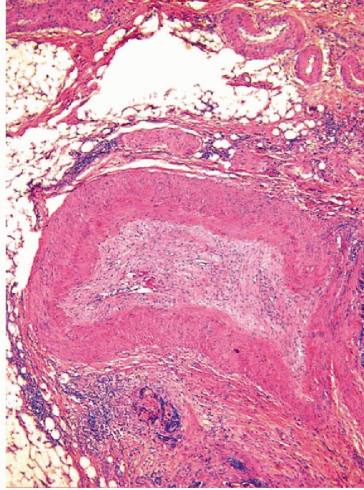
Способ разработан в отделе лучевых и комбинированных методов лечения «РНЦРХТ им. Ак. А.М. Гранова» МЗ РФ и может быть рекомендован для моделирования хронической ишемии.

#### (57) Формула изобретения

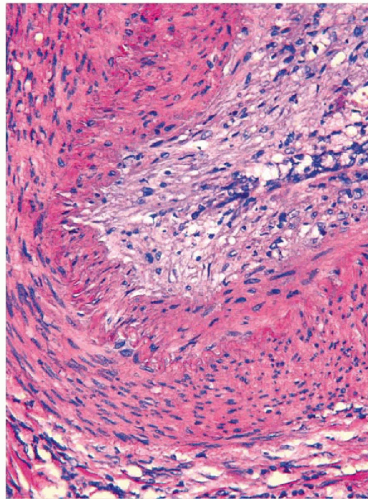
Способ моделирования хронической ишемии у экспериментальных животных, включающий визуализацию бедренной артерии с последующим ее облучением, отличающийся тем, что визуализацию ее выполняют при помощи компьютерно-томографического исследования или магнитно-резонансной томографии, а облучение проводят при помощи ионизирующего излучения на установке для стереотаксической лучевой терапии одной фракцией с суммарной очаговой дозе 20 - 25 Гр.



1

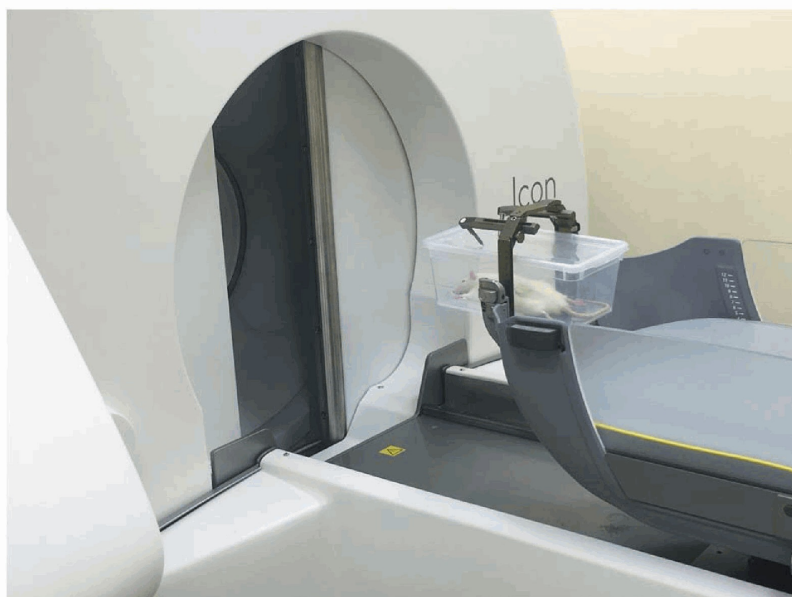


Фиг. 1



Фиг. 2

2



Фиг. 3