



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94073** (13) **U**  
(51) МПК  
**G09B 23/28** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2014 05605</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>26.05.2014</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>27.10.2014</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.10.2014, Бюл.№ 20</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Рикало Надія Анатоліївна (UA), Береговенко Юлія Михайлівна (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)</b></p>
--	--

**(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ПАТОГЕНЕТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ АПОПТОЗУ ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ ХРОНІЧНИХ ХВОРОБАХ ПЕЧІНКИ**

**(57) Реферат:**

Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки включає введення лікарських засобів, а саме проводиться введення з лікувальною метою інгібітора ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприл із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ЕД<sub>50</sub> протягом шести тижнів і більше.

**UA 94073 U**



Корисна модель належить до медицини, зокрема до розділу експериментальних досліджень. Може мати застосування для зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу при хронічних хворобах печінки в клінічній практиці.

5 Проблема лікування хронічних уражень печінки запального, токсичного і дистрофічного ґенезу залишається актуальною як серед науковців, так і практичних лікарів усього світу, оскільки дана патологія, як правило, завершується формуванням фіброзу чи цирозу печінки, гепатокарциноми, що може у окремих випадках призвести до смерті.

10 Проблема зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу у пацієнтів із хронічною патологією печінки стоїть особливо гостро. Це пов'язано із загибеллю великої кількості функціонуючих клітин, зменшення маси ураженого органу, з наступним розвитком печінкової недостатності та коми. На сьогоднішній день існує ряд запропонованих фармакологічних засобів із гепатопротекторами властивостями, які рекомендуються як антиапоптична терапія.

15 Найближчим аналогом, що пропонується, є застосування аргініну глутамату "Глутаргін", який, за даними [Березенко В.С. Особливості перебігу хронічного вірусного гепатиту С у дітей / В.С. Березенко // Перинатологія і педіатрія. - 2006. - № 1. - С. 91-94; Лук'янова О.М. Медикаментозна корекція склерогенезу як профілактика цирозу печінки у дітей з хронічними вірусними гепатитами / О.М. Лук'янова, В.С. Березенко, А.Г. Ципкун // Педіатрія, акушерство та гінекологія. - 2006. - № 4. - С. 5-10] має антиоксидантну, антигіпоксичну, мембраностабілізуючу активність, позитивно впливає на процеси енергозабезпечення в гепатоцитах, та широко 20 рекомендується для лікування хронічних хвороб печінки різного ґенезу.

Наведений аналог має ряд недоліків, а саме: недостатньо висока ефективність антиапоптичної терапії при лікуванні хронічного гепатиту. Так рівень патогенно індукованого апоптозу, який вимірювався методом проточної цитометрії шляхом визначення за субдиплоїдним піком фрагментації ДНК, як показник патогенно індукованого апоптозу 25 [Мушкхамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология: учебное пособие для студентов мед.вузов. - М.: ООО "МИА", 2007. - 536 с; Li Z., Hu D.-Y., Chu Q. et al. Cell apoptosis and regeneration of hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization // World J. of Gastroenterology. - 2004. - V.10 (13). - P. 1876-1880; Maier P., Wenk-Siefert I., Schawalder H.P. Cell-cycle and ploidy analysis in bone marrow and liver cells of rats after long-term consumption of irradiated wheat // Fd Chem. Toxic. - 1993. - V.31. - N.6. - P. 395-405] у експериментальних тварин із моделлю хронічного токсичного гепатиту не знижувався, а, навпаки, зростав, що на нашу думку, пов'язано із тим, що "Глутаргін" є донатором оксиду азоту, у зв'язку із чим посилює патогенно індукований апоптоз при експериментальному хронічному токсичному гепатиті у 30 статево незрілих щурів, що підтверджувалось як цитофлуориметрично, так і гістологічно. Збільшення фрагментації ДНК ядер при введенні даного препарату пояснюється посиленням апоптозу та некрозу клітин різних органів і тканин, у тому числі і тканини печінки, внаслідок підвищення у них кількості оксиду азоту, що призводить до розкриття мітохондріальних пор [Veenman L. The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development / L. Veenman, M. Gavish // Pharmacology and Therapeutics. - 40 2006. - V. 110, Iss. 3. - P. 503-524].

В основу корисної моделі "Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки" поставлена задача розробити ефективний спосіб зменшення рівня апоптозу печінкових клітин при хронічних ураженнях печінки різної етіології шляхом введення лікарських засобів.

45 Поставлена задача вирішується способом, який включає введення інгібітора ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприл із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ЕД<sub>50</sub> протягом шести тижнів і більше.

Спосіб здійснюють таким чином

50 Проводиться введення з лікувальною метою інгібітора ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприлу із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ЕД<sub>50</sub> протягом шести тижнів і більше. Застосування даного препарату дозволяє зменшити рівень фрагментації ДНК ядер печінкових клітин, як показника патогенно індукованого апоптозу, що підтверджується методом проточної цитометрії.

55 Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки, який передбачає введення інгібітора ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприлу із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ЕД<sub>50</sub> протягом шести тижнів і більше є ефективним методом зменшення загибелі гепатоцитів шляхом апоптозу при хронічних ураженнях печінки, що буде корисним для застосування у пацієнтів з даною патологією.

60 Приклад:

Тридцяти щурам з вихідною масою тіла 70-90 г інтрагастрально через шлунковий зонд вводили 20 % олійний розчин  $CCl_4$  в дозі 0,1 мл/100 г маси двічі на тиждень протягом трьох місяців. Паралельно, як пиття, замість води тваринам давали 5 % розчину етанолу для моделювання хронічного токсичного гепатиту. Восьми щурам паралельно із гепатотоксинами щодня протягом шести тижнів перорально вводили гепатопротектор "Глутаргін" (діюча речовина - аргініну глутамат) у лікувально-профілактичному режимі із розрахунку  $ED_{50}$ . Перерахунок середньотерапевтичної лікувальної дози рекомендованої для людини на 1 кг маси тіла на масу тіла щура проводився за константою біологічної активності за методикою Ю.Р. Риболовлева (1979, 1982). Іншій піддослідній групі тварин (8 щурів), які знаходилися за тих же умов експерименту, щоденно вводили інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприл. До контрольної групи увійшло 8 інтактних здорових щурів з ідентичною вихідною масою тіла. Після виведення тварин з експерименту під наркозом здійснювали забір тканини печінки для визначення фрагментації ДНК методом проточної цитометрії. З цією метою в стерильних умовах під капсулою з лівої великої частки із свіжого матеріалу вирізали шматочки тканини печінки розміром 0,5 см<sup>3</sup>, який негайно промивався стерильним 0,9 % фізіологічним розчином NaCl і поміщався у фосфатно-сольовий буфер рН 7,4 (Sigma) в переносний холодильник з температурою +4/+8 °С для подальшого дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин печінки МПЦ. Суспензії ядер з клітин печінки одержували за допомогою набору для дослідження ядерної ДНК "CyStain DNA" фірми "Partec" (Німеччина), відповідно до протоколу-інструкції виробника. Даний набір дозволяє швидко і одночасно проводити екстракцію ядер і мітити ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (ДАПІ) [А. Krishan, P.D. Dandekar, 2005; Maier P., Wenk-Siefert I., Schawalder H.P., 1993]. Печінку подрібнювали на шматочки розміром приблизно 1-2 мм<sup>3</sup> з наступною обробкою ДАПІ. Отриману нуклеарну суспензію тканини печінки пропускали через одноразові фільтри CellTrics з діаметром 50 мкм. Цитометричне дослідження фаз клітинного циклу та вимірювання кількості ДНК проводили в ядерній суспензії, отриманій зі шматочків свіжої печінки, не пізніше ніж через 2 години після виведення тварини з експерименту.

Фрагментація ДНК виконана програмними засобами FloMax (фірма Partec, Німеччина) методом виділення Sub-G<sub>1</sub> ділянки на ДНК-гістограмах, яка представлена на гістограмі інтервалом RN<sub>1</sub>.

Цитофлуориметричний аналіз проводився на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми Partec (Німеччина) у НДЦ ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Для ініціації флуоресценції ДАПІ використовувалася ртутна УФ-лампа, реєстрація відбувалася в УФ-спектрі. Із кожного зразка нуклеарної суспензії аналізувалося не менше 20 тисяч подій. При цитофлуориметричному дослідженні було встановлено, що у тварин із хронічним токсичним гепатитом, які не отримували лікування рівень фрагментації ДНК печінкових клітин становив  $5,32 \pm 1,66$  % проти  $2,57 \pm 0,55$  % у інтактних тварин контрольної групи ( $p < 0,001$ ). При введенні піддослідним тваринам з лікувальною метою препарату лізиноприл рівень фрагментації вірогідно зменшувався і становив  $4,05 \pm 1,34$  ( $p < 0,05$ ), тоді як при введенні аргініну глутамату даний показник залишався достатньо високим, що склало  $6,96 \pm 0,60$  % ( $p < 0,05$  проти контрольної групи та  $p < 0,05$  порівняно з групою, яка отримувала лізиноприл).

Таким чином, проведене дослідження по визначенню рівня фрагментації ДНК ядер печінкових клітин, як основного показника апоптозу, у піддослідних тварин, які отримували з лікувальною метою інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприл із розрахунку  $ED_{50}$  протягом шести тижнів показало вірогідне зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу у щурів із хронічним токсичним гепатитом підтвердженим методом проточної цитометрії, що доводить ефективність даного методу.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки, що включає введення лікарських засобів, який **відрізняється** тим, що проводиться введення з лікувальною метою інгібітора ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприл із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози  $ED_{50}$  протягом шести тижнів і більше.

---

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

---

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