



УКРАЇНА

(19) UA (11) 67192 (13) U
(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ ХОЛЕСТЕРИНОВОГО ЦИРОЗУ ПЕЧІНКИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

1

2

(21) u201107735

(22) 20.06.2011

(24) 10.02.2012

(46) 10.02.2012, Бюл.№ 3, 2012 р.

(72) БІЛОШИЦЬКА АЛІНА ВАСИЛІВНА, ПІСКУН
РАЇСА ПЕТРІВНА, ІСТОШИН ВАЛЕРІЙ МИХАЙ-
ЛОВИЧ(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА(57) Спосіб профілактики холестеринового цирозу
печінки в експерименті, що передбачає введення
гена апо-Е, який **відрізняється** тим, що ген, який
знаходиться в катіонних ліпосомах, вводиться вну-
трішньом'язово.

Корисна модель належить до медицини, а саме терапії, і може бути застосований при розробці нових методів лікування холестеринового цирозу печінки. Холестериновий цироз печінки в експерименті виникає при моделюванні атеросклерозу шляхом екзогенного навантаження тварин холестерином.

Атеросклероз та його ускладнення, насамперед, ішемічна хвороба серця, протягом багатьох десятиріч зберігає статус хвороби номер 1 - як по смертності, так і по соціальних та економічних втратах в усіх розвинених країнах світу. Велике різноманіття наявних на сьогоднішній день методів лікування атеросклерозу свідчить про недостатню вивченість етіології та патогенезу захворювання, недосконалості та малій ефективності цих методів. Всі багаточисельні засоби терапевтичного [М.Г.Бубнова, Д.М.Афонов, Н.В.Перова, В.П.Мазаев, "Связь уровня липемии после жировой нагрузки с выраженностью атеросклероза коронарных артерий"// Тер. архив.-2004. - №6. - С.62-67] та еферентного [М.Н.Долженко, А.Я.Базилевич, Н.А.Перепельченко, "Применение энтеросорбции в лечении больных с метаболическим синдромом и неалкогольным стеатогепатитом"// Нов. мед. фармации в Украине.-2001. - №8. - С.321] лікування і профілактики атеросклерозу мають, як правило, єдиний об'єкт дії - ліпіди крові. Оскільки можливість екзогенного застосування відомих засобів має лише тимчасовий ефект, потребує пожиттєвого призначення, досить дороге, виникає потреба пошуків нових напрямків лікування і профілактики атеросклерозу. Широкому застосуванню гіполіпідемічних засобів заважає висока частота побічних ефектів, ризик виникнення гепатотоксикозу. Інвазивні хірургічні методи застосо-

вуються тільки для лікування ускладнень атеросклерозу і також виключають системну спрямованість терапії. Тому генна терапія - метод, що дозволяє індукувати в клітинах синтез тих чи інших білків з потенційним терапевтичним ефектом, може використовуватись як альтернативний напрямок профілактики і лікування цієї патології [Andrew N.Baker, "Генная терапия как лечебная стратегия при ишемической болезни сердца" // Внутрішня медицина.-2007. - №1. - С.76-80]. Однією із сполук, що мають протиатеросклеротичні властивості, є аполіпопротеїн Е (апо-Е - ген, АПО-Е - білок) - глікопротеїн плазми крові, необхідний для транспорту холестеролу та фосфоліпідів. У людини існує 3 ізоформи апо-Е-2,-3,-4, що відрізняються наявністю аргініну чи цистеїну в 112-й та 156-й позиціях амінокислотної послідовності. При атеросклерозі апо-Е демонструє гепатопротекторні властивості [И.С.Павлов, Ю.О.Шульпекова, В.Б.Золотаревский, В.Т.Ивашкина, "Современные представления о патогенезе, диагностике и лечении фиброза печени"//РЖГГК.-2005.-2. - С.20; Теблов К.И., Арабидзе Г.Г., Полякова О.В., Афанасьева О.И., Афанасьева М.И., Сорябини Е.О., "Роль липопротеида А и аполипопротеида В-100 в развитии ишемической болезни сердца"//Рос. кард. журнал.-2005. - №5 (55). - С.20-22].

Найбільш близьким до декларованого нами способу й вибраним нами за прототип є спосіб Кордюма [Кордюм В.А. "Генотерапія атеросклерозу"// Теоретична медицина.-2004.-10, 2. - С.121]. Спосіб В.А.Кордюм і співавторів передбачає переважно стимуляцію збільшення антиатерогенних ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) у тварин без змодельованого атеросклерозу.

(19) UA (11) 67192 (13) U

Недоліки цього способу такі: він не містить оцінки кореляції позитивних структурних і біохімічних змін зі змінами функціонального стану органів, зокрема печінки, при атеросклерозі, тому залишається невідомим, яким чином впливає зниження рівня атерогенних ЛПНЩ на відновлення структури та функції печінки. Крім того, конструкцію з геном апо-А-1 людини автори вводили внутрішньопечінково, що по суті є досить складною операцією і вимагає відповідних умов операційного блока.

В основу корисної моделі поставлена задача профілактики атеросклерозу за допомогою внутрішньом'язового введення катіонних ліпосом, які несуть плазмідний вектор з геном апо-Е, який забезпечував би протекторний вплив на судинну систему й паренхіму печінки, гальмуючи розвиток холестеринового цирозу печінки при атеросклерозі, і попереджував би розвиток функціональних наслідків цирозу, зокрема печінкової недостатності.

Поставлену задачу вирішуються способом, що відтворюють наступним чином: препарат катіонних ліпосом та плазмідної ДНК готують за 15 хвилин до внутрішньом'язової інфузії шляхом змішування їх водних розчинів при кімнатній температурі. Використовують препарат катіонних ліпосом DOTAP methosulfate. Співвідношення ліпосоми/ДНК, яке забезпечує найбільш ефективну трансфекцію, при застосуванні препарату, складає 5:1. Для доставки препарату використовується звичайний одноразовий шприц для внутрішньом'язових ін'єкцій. Усього вводять 1мкг ДНК апо-Е на 5мг ДОТАР.

Модель експериментального атеросклерозу.

Модель атеросклерозу створюють за класичною методикою Н.Н.Анічкова. Всі піддослідні тварини були розділені на 3 групи: 1 група - інтактні тварини; 2 група - щури, яким моделювався атеросклероз; 3 група - профілактична - щури, яким одночасно з моделюванням атеросклерозу вводився ген апо-Е. Протягом 30 днів щурам другої та третьої груп внутрішньошлунково за допомогою зонда з оливою вводили холестерол в дозі 0,5г/кг маси і додатково метил-2-тіоурацил в дозі 12мг/кг маси для пригнічення функції щитоподібної залози ["Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації)" За ред. чл. кор. АМНУ О.В.Стефанова// К.:Авіценна.-2001. - С.528].

Структурно-функціональні зміни при експериментальному атеросклерозі та профілактичному введенні гена апо-Е людини досліджували наступним чином: - біохімічними дослідженнями сироватки крові;

- мікроморфометричним методом;
- електронномікроскопічним методом.

Ефективність трансфекції в зразках м'язової тканини підтверджували за допомогою зворотної транскриптазної реакції (RT-PCR).

Проведене дослідження показало, що генна терапія, направлена на індукцію синтезу апо-Е печінки щурів з експериментальним атеросклерозом, забезпечує протекторний вплив на судинну систему й паренхіму органа, гальмуючи розвиток її вторинних ушкоджень. Це виражалось в тому, що на 30-й день експерименту: рівень холестеролу у щурів з експериментальним атеросклерозом зрос-

тає більш ніж в 3 рази порівняно з групою інтактних тварин, і тільки в 1,5 разу у щурів, що отримували плазмідну з геном апо-Е. Рівень холестеролу альфа-ліпопротеїнів знижується у щурів з експериментальним атеросклерозом на 26,1%, а в профілактичній групі холестерол альфа-ліпопротеїнів тільки на 3,5% відрізняється від показників інтактних щурів. Холестерол пре-бета-ліпопротеїнів знижується на 57,2% у щурів з експериментальним атеросклерозом, а в профілактичній групі знижується на 40,09%. Холестерол бета-ліпопротеїнів збільшується в 10 разів у щурів з експериментальним атеросклерозом, а в профілактичній групі - тільки в 5 разів. Індекс атерогенності - збільшується в 8 разів у щурів з експериментальним атеросклерозом, а в профілактичній групі - тільки в 4 рази більше. Рівень тригліцеридів - у щурів з експериментальним атеросклерозом зменшується на 42,7%, а в групі тварин з профілактичним введенням плазмідної з геном апо-Е - на 30%. Рівень загальних ліпідів збільшується у щурів з атеросклерозом в 2 рази, в профілактичній групі збільшується тільки в 1,5 разу.

Оцінка впливу генної терапії на функціональні показники печінки показала, що в результаті проведеного дослідження в групі інтактних тварин виявлені показники активності визначених ферментів відповідають нормі для представників даного виду тварин. У тварин із експериментальним атеросклерозом відбувалось значне зростання активності аланінамінотрансферази (АЛТ) - в 4,2 разу, та аспартатамінотрансферази (АСТ) - в 4,2 разу, активність гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) - на 4,2%. В групі тварин, що отримували ген апо-Е профілактично показники активності ферментів зменшуються відносно показників тварин з експериментальним атеросклерозом: АЛТ - на 75%, АСТ - на 74%, ГГТ - на 3%, і наближаються до показників, що спостерігались у інтактних тварин.

На 30-й день експерименту за даними електронномікроскопічного дослідження у тварин з експериментальним атеросклерозом та профілактичним введенням гена апо-Е в гепатоцитах тварин візуалізуються ядра, іноді з двома ядерецями, гранулярний та агранулярний ендоплазматичний ретикулум, велика кількість мітохондрій, полісом, комплекс Гольджи, вакуолярні структури, зрідка спостерігаються поодинокі гепатоцити з невеликими краплинами ліпідів. Звертає на себе увагу поява синусоїдних капілярів, ендотеліоцити яких мають великий рівень гетерохроматину в ядрах. В перисинусоїдному просторі спостерігається незначна кількість ліпідів. Відсутні фіброblastи та колагенові волокна. Просвіт між сусідніми гепатоцитами незмінний. На біліарній поверхні гепатоцитів добре видно велику кількість коротких виростів цитолемі, просвіт жовчних капілярів в порівнянні з тваринами інтактної групи не змінений.

Мікроморфометрія судин печінки показала, що у тварин з експериментальним атеросклерозом в порівнянні з показниками інтактних тварин збільшуються: площа перерізу стінки судини - на 70,92%, зовнішня вісь максимальна - на 17,4%, зовнішня вісь мінімальна - на 11,75%, справжній зовнішній діаметр - на 21,37%. Товщина стінки

збільшується на 82,4 %, площа стінки - в 2,27 разу, індекс Вогенворта збільшується в 3,1 разу, зменшуються площа просвіту - на 30 %, внутрішня вісь максимальна - на 30 %, внутрішня вісь мінімальна - на 30 %, справжній внутрішній діаметр зменшується на 26,4 %. У тварин профілактичної групи вищеперераховані показники наближаються до показників тварин інтактної групи.

Приклад.

Щур №4, маса тіла 186г, самець. Протокол №4. Початок експерименту 14.02.08. Модель холестеринowego цирозу печінки відтворювали за класичною методикою Анічкова шляхом внутрішньошлункового введення кристалічного холестерину в дозі 0,5г/кг маси тіла протягом 14 днів. Профілактика проводилась одноразово на 14-й день досліду. Плазмідну з геном апо-Е вводили внутрішньом'язово в співвідношенні 1 мкг ДНК апо-Е на 5мг ДОТАР. Препарат катіонних ліпосом та плазмідної ДНК готували за 15хв. до внутрішньом'язової інфузії шляхом змішування їх водних розчинів при кімнатній температурі. Після експерименту на 28 день забій тварини проводили шляхом передозування тіопенталавого наркозу. У забитого щура брали печінку і для фіксації поміщали її в 10 % розчин нейтрального формаліну, промивали в проточній воді, проводили через батарею спиртів зростаючої міцності і заливали в целоїдин, серії

зрізів печінки товщиною 10мкм виготовляли за допомогою санного мікротома МС-2 і зафарбовували гематоксилін-еозином. Ефективність профілактики оцінювали за допомогою біохімічних, мікроморфометричних, електронномікроскопічних методів.

Застосування пропонованого методу показало, що генна терапія, направлена на індукцію синтезу апо-Е печінки щурів з експериментальним атеросклерозом, забезпечує протекторний вплив на судинну систему, ліпідний обмін сироватки щурів, гальмуючи розвиток вторинних ушкоджень печінки, і попереджає розвиток функціональних розладів, зокрема трансамінування, наслідків атеросклерозу.

У порівнянні з прототипом запропонований спосіб має низку переваг:

- гепатопротекція широкого спектру, а не окремих популяцій, клітин печінки;
- ефективний протекторний вплив на судинну систему печінки і її паренхіму з гальмуванням розвитку її вторинних ушкоджень (зокрема розвитку холестеринowego цирозу печінки);
- попередження розвитку при атеросклерозі функціональних розладів печінки;
- попереджує ультраструктурні зміни в гепатоцитах.