



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58332 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61K 31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПАТОГЕННО ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ ПЕЧІНКИ

1

2

(21) u201011186

(22) 20.09.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) МОРОЗ ВАСИЛЬ МАКСИМОВИЧ, РИКАЛО
НАДІЯ АНАТОЛІЇВНА

(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І.ПИРОГОВА

(57) Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при захворюванні печінки, що передбачає введення лікарських засобів, який **відрізняється** тим, ще вводять вітчизняний рослинний гепатопротектор "Артишоку екстракт" із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози OD_{50} протягом шести тижнів і більше.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до розділу експериментальних досліджень. Може мати застосування для зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу при запальних і дистрофічних захворюваннях печінки у дорослих і дітей в клінічній практиці.

Проблема лікування гострих та хронічних уражень печінки запального і дистрофічного ґенезу у дорослих та дітей залишається актуальною як серед науковців, так і практичних лікарів усього світу, оскільки дана патологія нерідко ускладнюється фіброзом чи цирозом печінки, гепатокарциномою, що може у окремих випадках призвести до смерті пацієнта.

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

Діагностичним прототипом, що пропонується, є застосування урсодезоксихолевої кислоти, яка, за даними [Raumgartner G., Beuers U. Ursodeoxycholic Acid in Cholestatic Liver Disease: Mechanisms of Action and Therapeutic Use Revisited // *Hepatology*. - 2002. - 36. - P.525-531] має потужний ефект, що спрямований на захист гепатоцитів від апоптозу. Наведений прототип модель має ряд недоліків, а саме: недостатньо висока ефектив-

ність антиапоптичної терапії при лікуванні хронічного гепатиту. Так рівень патогенно індукованого апоптозу, який вимірювався методом проточної цитометрії шляхом визначення за субдиплоїдним піком фрагментації ДНК, як показника патогенно індукованого апоптозу [Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. Молекулярная биология: учебное пособие для студентов мед.вузов. - М.: 000 «МИА», 2007. - 536с.; 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., Schawaldler 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 знижувалась лише на 15,6 %.

В основу корисної моделі "Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при захворюваннях печінки" поставлене завдання розробити ефективний метод зменшення рівня апоптозу печінкових клітин при гострих і хронічних ураженнях печінки запального і дистрофічного ґенезу у дорослих та дітей, шляхом введення лікарських засобів.

Поставлене завдання досягається способом, який передбачає введення вітчизняного рослинного гепатопротектору «Артишоку екстракт. Здоров'я» із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози OD_{50} протягом шести тижнів і більше.

Спосіб здійснюють таким чином

UA (19) 58332 (13) U

Проводиться введення з лікувальною метою вітчизняного рослинного гепатопротектору «Артишоку екстракт. Здоров'я» із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози OD_{50} 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.

Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при захворюваннях печінки, який передбачає введення вітчизняного рослинного гепатопротектору «Артишоку екстракт. Здоров'я» із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози OD_{50} протягом шести тижнів і більше є ефективним методом зменшення загибелі гепатоцитів шляхом апоптозу при гострих і хронічних ураженнях печінки запального і дистрофічного ґенезу, що буде корисним для застосування у дорослих та дітей з даною патологією.

Приклад:

Двадцяти чотирьом статевонезрілим щурам з вихідною масою тіла 50-60г 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 в якості 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 «Урсохол» (діюча речовина - урсодезоксихолієва кислота) у лікувально-профілактичному режимі із розрахунку OD_{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 гепатопротектор «Артишоку екстракт. Здоров'я». 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 шматочок тканини печінки розміром 0,5 см³, який негайно промивався стерильним 0,9% фізіологічним розчином NaCl і поміщався у фосфатно-сольовий буфер pH 7,4 (Sigma) в переносний холодильник з температурою +4/+8°C 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 діамідино-феніліндом (ДАПІ) [A. Krishan, P. D. Dandekar, 2005; Maier P., Wenk-Siefert I., Schawaldner H.P., 1993]. Печінку подрібнювали на шматочки розміром приблизно 1-2 мм³ 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-G₁ ділянки на ДНК-гістограмах, яка представлена на гістограмі інтервалом RN₁.

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±1,66 % проти 2,57±0,55 % у інтактних тварин контрольної групи (p<0,001). При введенні піддослідним тваринам з лікувальною метою препарату «Артишоку екстракт. Здоров'я» рівень фрагментації вірогідно зменшувався і становив 2,95±0,37 % (p <0,05), тоді як при введенні урсодезоксихолієвої кислоти даний показник залишався достатньо високим, що склало 4,49±1,60 % (p<0,05 проти контрольної групи).

Таким чином, проведене дослідження по визначенню рівня фрагментації ДНК ядер печінкових клітин, як основного показника апоптозу, у піддослідних тварин, які отримували з лікувальною вітчизняний рослинний гепатопротектор «Артишоку екстракт. Здоров'я» із розрахунку OD_{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.