



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99811** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 14056	(72) Винахідник(и): Рикало Надія Анатоліївна (UA), Яровенко Людмила Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 29.12.2014	(73) Власник(и): ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.06.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2015, Бюл.№ 12	

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПАТОГЕННО ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ АЛКОГОЛЬНИХ УШКОДЖЕННЯХ ПЕЧІНКИ

(57) Реферат:

Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при алкогольних ушкодженнях печінки, що передбачає введення лікарських засобів. Проводиться введення з лікувальною метою вітчизняного гепатопротектора L-аргініну L-глутамат із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ED₅₀ протягом одинадцяти тижнів і більше.

UA 99811 U

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

5 Проблема лікування гострих та хронічних алкогольних 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 алкогольним стеатогепатитом з жировою дистрофією та некрозом гепатоцитів з мезинхімальною реакцією (мікроемуліаторний стеатоз печінки), а за умов подальшого прогресування - фіброзом чи цирозом печінки, гепатокарциномою, що може у окремих випадках призвести до смерті пацієнта.

15 Проблема зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу у пацієнтів із гострою та хронічною алкогольною 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 гепатопротекторними властивостями, які рекомендуються у якості антиапоптичної терапії.

20 Перспективним напрямком вважається створення і використання в терапії алкогольних уражень печінки гепатопротекторних засобів на основі аміно- і кетокислот (аргінін, орнітин, глутамат, аспартат, α -кетоглутарат), активне вивчення вилуви і клінічної ефективності яких у хворих з алкогольним ураженням печінки триває навіть сьогодні. Відомо, про застосування відносно нового гепатопротектора «Глутаргін».

25 Діагностичним прототипом, що пропонується, є застосування урсодезоксихолевої кислоти, яка, за даними [Харченко Н.В. Порівняльна характеристика сучасних гепатопротекторів // Вісник фармакології та фармації. - 2001. - № 3-4. - С. 18-25; Paumgartner 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. Наведена модель має ряд недоліків, а саме: недостатньо висока ефективність антиапоптичної терапії при лікуванні алкогольного ураження печінки. Так, рівень патогенно індукованого апоптозу, який вимірювався методом проточної цитометрії шляхом визначення за субдиплоїдним піком фрагментації ДНК, як показника патогенно індукованого апоптозу [Мушамбаров 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 знижувався лише на 15,6 %, а експериментальних досліджень при алкогольному ураженні печінки ще не проводилось.

40 В основу корисної моделі "Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при алкогольних ураженнях печінки" поставлена задача розробити ефективний метод зменшення рівня апоптозу печінкових клітин при алкогольних ураженнях печінки запального і дистрофічного ґенезу у дорослих та дітей, шляхом введення лікарських засобів.

45 Поставлена задача вирішується способом, який передбачає введення вітчизняного гепатопротектора "Глутаргін" (діюча речовина: L-аргінін L-глутамат) із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ЕД₅₀ протягом одинадцяти тижнів і більше.

50 На моделі проводиться введення з лікувальною метою вітчизняного рослинного гепатопротектора "Глутаргін" із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ЕД₅₀ протягом одинадцяти 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 лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при алкогольних ушкодженнях печінки, який передбачає введення вітчизняного рослинного гепатопротектора "Глутаргін" із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ЕД₅₀ протягом одинадцяти тижнів і більше є ефективним методом зменшення загибелі гепатоцитів шляхом апоптозу при гострих і хронічних алкогольних ураженнях печінки запального і дистрофічного ґенезу, що буде корисним для застосування у дорослих та дітей з даною патологією.

60 На моделі токсичного гепатиту L-аргінину L-глутамат реалізує виражений мембраностабілізуючий ефект, зменшуючи інтенсивність ПОЛ, стимулює репаративні процеси в клітинах печінки, відновлює активність системи цитохром Р₄₅₀. Під впливом препарату

зменшуються прояви цитолітичного синдрому, рівень білірубину крові, підвищується білоксинтезуюча функція печінки, нормалізуються метаболічні процеси у гепатоцитах. L-аргініну L-глутамат сприяє відновленню процесів етерифікації холестерину в печінці, активує ключовий фермент біосинтезу холестерину - оксиметилглутарил-КоА-редуктази, активність якої за принципом зворотного зв'язку регулює концентрацію холестерину в крові [Скрипник І.М. Гепатопротектори: сучасні підходи до призначення і тактика їх вибору при хронічних дифузних захворюваннях печінки // Нова медицина. - 2004. - № 6. - С. 32-3].

Приклад:

Десятьом статевонезрілим щурам з вихідною масою тіла 60-75 г, десятьом статевозрілим щурам з вихідною масою тіла 185-190 г та десятьом старим щурам з вихідною масою тіла 300-320 г протягом дванадцяти тижнів, щоденно, давали 96 % розчин етанолу на стандартних шматочках білого хліба, із розрахунку дози алкоголю 14-18 г/кг маси тіла на добу (Ковалёв Г.А., Петренкота А.Ю., 2004), для моделювання хронічного алкогольного ушкодження печінки.

Тридцятьом щурам, по десять з кожної вікової групи паралельно із гепатотоксичною речовиною - етанолом, щодня протягом одинадцяти тижнів перорально вводили гепатопротектор "Глутаргін" (діюча речовина - L-аргінін L-глутамат) у лікувально-профілактичному режимі із розрахунку ED_{50} . Іншим тридцятьом щурам (по десять з кожної вікової групи), які знаходилися за тих же умов експерименту, щоденно протягом одинадцяти тижнів перорально вводили біофлаваноїд "Кверцетин" (діюча речовина - кверцетин) 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). До контрольних груп увійшло по десять 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 $0,5 \text{ см}^3$, який негайно промивався стерильним 0,9 % фізіологічним розчином NaCl і поміщався у фосфатно-сольовий буфер рН 7,4 (Sigma) в переносний холодильник з температурою $+4/+8 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 діамідинофеніліндолом (ДАПІ) [A. Krishan, P.D. Dandekar, 2005; Maier P., Wenk-Siefert I., Schawalder H.P., 1993]. Печінку подрібнювали на шматочки розміром приблизно $1-2 \text{ мм}^3$ 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 алкогольним ушкодженням печінки, які не отримували лікування рівень фрагментації ДНК печінкових клітин становив: у 1 групі - $2,24 \pm 0,09 \%$ ($p < 0,01$) проти $1,84 \pm 0,04 \%$ у інтактних тварин, у 2 групі - $2,40 \pm 0,09 \%$ ($p < 0,01$) проти $1,72 \pm 0,10 \%$ та у 3 групі - $3,84 \pm 0,57 \%$ ($p < 0,05$) проти $2,25 \pm 0,13 \%$. При проти $1,72 \pm 0,10 \%$ та у 3 групі - $3,84 \pm 0,57 \%$ ($p < 0,05$) проти $2,25 \pm 0,13 \%$. При введенні піддослідним тваринам з лікувальною метою препарату L-аргініну L-глутамат рівень фрагментації вірогідно зменшувався і становив: $2,12 \pm 0,08 \%$ ($p < 0,05$ у порівнянні з інтактом) у 1 групі, $1,82 \pm 0,11 \%$ ($p > 0,05$ у порівнянні з інтактом та $p < 0,01$ з ХАУП) у 2 групі та у 3 групі: $2,0 \pm 0,11 \%$ ($p > 0,05$ у порівнянні з інтактом, $p < 0,01$ у порівнянні з ХАУП та $p < 0,05$ у порівнянні зі значеннями отриманими при лікуванні кверцетином, тоді як при введенні кверцетину даний показник залишався достатньо високим та становив: $2,60 \pm 0,20 \%$ ($p < 0,05$ у порівнянні з інтактом) у 1 групі, $2,43 \pm 0,25 \%$ ($p < 0,05$) у 2 групі та $2,80 \pm 0,26 \%$ ($p < 0,05$) у 3 групі експериментальних тварин.

Таким чином, проведене дослідження по визначенню рівня фрагментації ДНК ядер печінкових клітин, як основного показника апоптозу, у піддослідних тварин, які отримували з

лікувальною метою L-аргінін L-глутамат із розрахунку ED_{50} протягом одинадцяти тижнів показало вірогідне зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу у щурів із хронічним алкогольним ушкодженням печінки підтвердженим методом проточної цитометрії, що доводить ефективність даного методу.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при алкогольних ушкодженнях печінки, що передбачає введення лікарських засобів, який **відрізняється** тим, що проводять введення з лікувальною метою вітчизняного гепатопротектора L-аргінину L-глутамат із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ED_{50} протягом одинадцяти тижнів і більше.

10

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601