



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81243** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 15033	(72) Винахідник(и): Рикало Надія Анатоліївна (UA), Андрощук Ольга Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.12.2012	(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: 25.06.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2013, Бюл.№ 12	

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПАТОГЕННО ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ КЛІТИН ПЕЧІНКИ ТА НИРОК ПРИ МЕДИКАМЕНТОЗНИХ УРАЖЕННЯХ РИФАМПІЦИНОМ ТА ІЗОНІАЗИДОМ

(57) Реферат:

Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу клітин печінки та нирок при медикаментозних ураженнях рифампіцином та ізоніазидом передбачає введення лікувальних препаратів. Хворих лікують вітчизняним гепатопротектором "Тіотриазолін" із розрахунку середньо терапевтичної лікувальної дози ЕД₅₀ протягом чотирьох тижнів і більше.

UA 81243 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до розділу експериментальних досліджень. Може мати застосування для зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу при медикаментозних ураженнях печінки і нирок протитуберкульозними препаратами (рифампіцином та ізоніазидом) у дорослих і дітей у клінічній практиці.

5 Проблема лікування медикаментозних уражень печінки токсичного ґенезу у дорослих та дітей залишається актуальною як серед науковців, так і практичних лікарів усього світу, оскільки дана патологія нерідко ускладнюється печінковою та нирковою недостатністю, гепаторенальним синдромом, що в окремих випадках може призвести до смерті пацієнта.

10 Проблема зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу клітин печінки та нирок у пацієнтів і медикаментозним ураженням даних органів протитуберкульозними препаратами, які мають гепато- та нефротоксичність, стоїть особливо гостро. Це пов'язано із загибеллю великої кількості функціонуючих клітин (гепатоцитів, епітелію ниркових канальців), зменшенням маси ураженого органу, з наступним розвитком гострої чи хронічної гепатоцелюлярної печінкової недостатності, гепаторенального синдрому, гострої чи хронічної ниркової недостатності. На сьогоднішній день існує ряд запропонованих фармакологічних засобів із гепато- та нефропротекторними властивостями, які рекомендуються для практичного застосування.

15 Діагностичним прототипом, що пропонується, є застосування кверцетину, який, за даними [Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Демин Е.М., Матвеева Н.С. и др. Дигидрокверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптозу // Биохимия.-2009, Т.74, вып. 3. - С.372-379; Горошко О.М., Заморський І.І., Геруш О.В. Подовження тривалості життя та профілактика морфологічних змін у нирках при моделюванні гострої ниркової недостатності за допомогою препаратів кверцетину // Буковинський медичний вісник.-2009. - №4, Т.13. - С 80-84] має потужний ефект, що спрямований на захист гепатоцитів на клітин нирок від апоптозу. Наведений прототип моделі має ряд недоліків, а саме: недостатньо висока ефективність антиапоптичної терапії при лікуванні медикаментозних уражень печінки та нирок. Так рівень патогенно індукованого апоптозу, який вимірювався методом проточної цитометрії шляхом визначення за субдиплоїдним піком фрагментації ядерної ДНК клітин печінки та кіркової речовини нирок, 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., Ни 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., Schawaldner 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 медикаментозного гепатиту, спричиненого рифампіцином та ізоніазидом знижувався лише на 15,92 % ($p > 0,05$ у порівнянні з тваринами, які не отримували лікування) у клітинах печінки та на 27,46 % у клітинах кіркової речовини нирок ($p < 0,05$).

40 В основу корисної моделі "Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу клітин печінки та нирок при медикаментозних ураженнях рифампіцином та ізоніазидом" поставлена задача розробити ефективний метод зменшення рівня апоптозу клітин печінки та кіркової речовини нирок при гострих і хронічних токсичних ураженнях печінки протитуберкульозними препаратами рифампіцином та ізоніазидом у дорослих та дітей, шляхом введення лікарських засобів.

45 Поставлена задача вирішується тим, що передбачає введення вітчизняного гепатопротектору "Тіотриазолін" із розрахунку середньо терапевтичної лікувальної дози ED_{50} протягом чотирьох тижнів і більше.

Спосіб здійснюють таким чином.

50 Проводиться введення з лікувальною метою вітчизняного гепатопротектору "Тіотриазолін" із розрахунку середньо терапевтичної лікувальної дози ED_{50} протягом чотирьох тижнів і більше. Застосування даного препарату дозволяє зменшити рівень фрагментації ДНК ядер клітин печінки та нирок, як показника патогенно індукованого апоптозу, що підтверджується методом проточної цитометрії.

55 Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу клітин печінки та нирок при їх токсичному ураженні рифампіцином та ізоніазидом, який передбачає введення вітчизняного гепатопротектору "Тіотриазолін" із розрахунку середньотерапевтичної лікувальної дози ED_{50} протягом чотирьох тижнів і є більш ефективним методом зменшення загибелі клітин печінки та нирок шляхом апоптозу при гострих і хронічних ураженнях печінки токсичного ґенезу протитуберкульозними препаратами, що буде корисним для застосування у дорослих та дітей при застосуванні рифампіцину та ізоніазиду.

60 Приклад:

Тридцяти шести статевонезрілим щурам з вихідною масою тіла 60-70 г вводили інтрагастрально металевим зондом з оливою на стандартизованому розчиннику ТВІН-65 ізоніазид (виробництва ЗАТ Фармацевтична фірма "Дарниця" Україна) із розрахунку 50 мг/кг та рифампіцин (ЗАТ НВЦ "Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод", Україна) із розрахунку 86 мг/кг маси тіла протягом 29 днів тричі на тиждень. Дванадцяти щурам паралельно із гепатотоксинами щодня протягом 29 днів інтрагастрально металевим зондом з оливою на стандартизованому розчиннику ТВІН-65 вводили гепатопротектор "Тіотриазолін" (АТ "Галичфарм", корпорація "Артериум") у лікувально-профілактичному режимі із розрахунку ЕД₅₀. 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 (12 щурів), які знаходилися за тих же умов експерименту, щоденно протягом 29 днів вводили гепатопротектор "Квертин" (діюча речовина - кверцетин, ЗАТ НВЦ "Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод", Україна). До контрольної групи увійшло 12 інтактних здорових щурів з ідентичною вихідною масою тіла. Після виведення тварин з експерименту під наркозом здійснювали забір тканини печінки та нирок для визначення фрагментації ДНК методом проточної цитометрії. З цієї метою в стерильних умовах із свіжого матеріалу під капсулою з лівої великої частки печінки та кіркової речовини нирок вирізали шматочок тканини печінки розміром 0,5 см³ та шматочок тканини кіркової речовини нирок розміром 0,5 см³, які негайно промивались стерильним 0,9 % фізіологічним розчином NaCl і поміщались у фосфатно-сольовий буфер рН 7,4 (Sigma) в переносний холодильник з температурою +4/+8 °С для подальшого дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин МПЦ. Суспензії ядер з клітин печінки та кіркової речовини нирок 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 та тканину кіркової речовини нирок подрібнювали на шматочки розміром приблизно 1-2 мм³ з наступною обробкою ДАПІ. Отриману нуклеарну суспензію тканини печінки і нирок 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 та нирок, 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 медикаментозним гепатитом, які не отримували лікування, рівень фрагментації ДНК печінкових клітин становив 4,73±0,59 % проти 2,797±0,279 % у інтактних тварин контрольної групи (p<0,05), клітин кіркової речовини нирок - 8,257±1,087 % проти 5,092±1,203 % у інтактних тварин контрольної групи p<0,05). При введенні піддослідним тваринам з лікувальною метою препарату "Тіотриазолін" рівень фрагментації ядерної ДНК клітин печінки вірогідно зменшувався на 35,94 % і становив 3,033±0,498 % (p<0,05), у клітинах нирок - відповідно на 35,90 %, що склало 5,293±0,368 %. Тоді як при введенні кверцетину показник фрагментації ядерної ДНК клітин печінки зменшувався лише на 15,92 %, що склало 3,977±0,599 % (p<0,05 проти контрольної групи) та не мав статистично достовірної різниці із тваринами, які не отримували лікування, клітин кіркової речовини нирок - був меншим на 27,46 % проти тварин із медикаментозним ураженням нирок (p<0,05), та склав 5,990±0,700 %.

Таким чином, проведене дослідження по визначенню рівня фрагментації ДНК ядер клітин паренхіми печінки та кіркової речовини нирок, як основного показника апоптозу, у піддослідних тварин, які отримували з лікувальною метою вітчизняний гепатопротектор "Тіотриазолін" із розрахунку ЕД₅₀ протягом чотирьох тижнів, показало вірогідне зменшення рівня патогенно індукованого апоптозу у щурів із хронічним медикаментозним ураженням печінки та нирок на тлі введення рифампіцину та ізоніазиду, підтвердженням методом проточної цитометрії, що доводить ефективність даного методу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу клітин печінки та нирок при медикаментозних ураженнях рифампіцином та ізоніазидом, який передбачає введення лікувальних препаратів, який **відрізняється** тим, що хворих лікують вітчизняним гепатопротектором "Тіотриазолін" із розрахунку середньо терапевтичної лікувальної дози ED_{50} протягом чотирьох тижнів і більше.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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