



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84762 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 33/24

A61K 9/00

A61K 33/44

A61K 35/00

A61K 45/00

A61K 47/30

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АКТИВОВАНА ПІНА

1

2

(21) а200612804

(22) 16.05.2005

(24) 25.11.2008

(86) РСТ/JP2005/008906, 16.05.2005

(31) 2005-160403

(32) 29.04.2005

(33) JP

(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 2008 р.

(72) ЯМАМОТО ТОМІЗО

(73) ЯМАМОТО ТОМІЗО, ШІМА ХІРОКІ

(56) JP A 2003-2826 08.01.2003

JP A 2003-002826 06.06.2003

JP A 6-321789 22.11.94

JP A 2003-231638 19.08.2003

(57) 1. Активована піна, виготовлена із натурального або синтетичного каучуку чи синтетичної смоли, яка **відрізняється** тим, що вона містить сполуку цирконію і/або сполуку германію і має закриту комірчасту структуру, а також тим, що зазначена піна використовується таким чином, що вона прямо чи непрямо контактує з тілом людини при введенні фармацевтичного засобу.

2. Активована піна, виготовлена із натурального або синтетичного каучуку чи синтетичної смоли, яка **відрізняється** тим, що вона містить сполуку цирконію і/або сполуку германію і вуглець і має закриту комірчасту структуру, а також тим, що зазначена піна використовується таким чином, що вона прямо чи непрямо контактує з тілом людини при введенні фармацевтичного засобу.

3. Активована піна за п.1 або п.2, яка **відрізняється** тим, що зазначеним фармацевтичним засобом є засіб проти раку.

4. Активована піна за п.3, яка **відрізняється** тим, що зазначеним фармацевтичним засобом є антиканцерогенна речовина із тіла людини.

5. Активована піна за п.4, яка **відрізняється** тим, що зазначеною антиканцерогенною речовиною із тіла людини є інгібітор гістон-деацетилази (HDACI).

6. Активована піна за будь-яким з пп.1-5, яка **відрізняється** тим, що зазначена комірчка утворюється з густиною від 20 до 30 комірок/мм².

Даний винахід стосується активованої піни, виготовленої із натурального або синтетичного каучуку чи синтетичної смоли і здатної полегшувати циркуляцію крові і сприяти поліпшенню фізичного стану та лікуванню таких хвороб, як рак.

Рак простати є типовим віковим раковим захворюванням чоловіків. Частота виникнення цієї хвороби в Японії останніми роками підвищилася у зв'язку із загальним старінням її населення і вестернізацією стилю життя японців. Крім того, тенденція її до зростання була підтверджена сучасними тестами крові з використанням маркерів пухлин (специфічного антигена простати PSA: prostate

specific antigen) і більш узагальненими медичними обстеженнями. Вікова захворюваність (на 100000 населення) на рак простати в Японії становила у 1956р. лише 3,5, у 1990р. піднялася до 8,5, а за статистичними оцінками у 2015р. досягне 20,3.

У Північній Америці захворюваність на рак простати є вражаюче високою і становила в 1990р. 92,4, а третє покоління японців у Сполучених Штатах має захворюваність на рак простати, близьку до рівня цього показника у кавказькій діаспорі Північної Америки. З погляду на ці дані не буде перебільшенням стверджувати, що вестернізація стилю життя, включаючи надмірне споживання жирів,

(13) C2

(11) 84762

(19) UA

має прямий зв'язок зі зростанням захворюваності на рак простати в Японії. Отже, згідно з прогнозами рак простати в 2015р. буде потрібно лікувати у 80000-100000 людей.

Статистичні дослідження, проведені у 1998-2002 роках Національним інститутом раку (National Cancer Institute), показали, що у Сполучених Штатах вікова захворюваність (на 100000 населення) на рак в усіх містах країни складала 469,7. У цьому загальному спектрі ракових захворювань рак простати мав величину захворюваності 76,0 і займав перше місце, а слідом за ним йшли рак молочної залози (73,3), рак легенів або бронхіальний рак (61,0), рак товстої кишки (38,3) і лімфома (21,8), яка, таким чином, займала п'яте місце. Рак простати має таку специфіку, що його ріст індукується андрогеном, і видалення андрогену придушує ріст пухлини. Отже, для придушення росту раку простати часто вдаються до хірургічного видалення яєчок або до застосування антиандрогенної терапії, при якій функціонування яєчок інгібуються фармацевтичним засобом. Але антиандрогенна терапія придушує клінічне прогресування раку простати лише на певний період часу (звичайно на 1-3 роки), після якого пухлина поновлює свій ріст. Гормональна терапія дає десятирічне виживання приблизно 10% хворих або менше, коли метастази поширюються в дистальні органи (часто - в кістку).

У випадку локалізованого раку простати радикальна повна простатектомія (включаючи видалення місцевого лімфовузла в тазі) дає буквально радикальну терапію. Окрім хірургічної терапії, існує широкий вибір засобів від гормональної до променевої терапії, включаючи опромінювання важкими частками і безпосередню імплантацію голчастого радіоактивного матеріалу в простату, і до хіміотерапії з використанням протиракових засобів у відповідності зі ступенем злоякісності і розвитком раку простати, а також наявності його метастаз.

Проблеми, які вирішує даний винахід

Добре відомо, що будь-яка терапія супроводжується ускладненнями і шкідливими побічними ефектами, не даючи при цьому жодних гарантій від рецидивів хвороби. Отже існує нагальна потреба в ефективній терапії, позбавленій шкідливих побічних ефектів. Крім того, існує потреба в засобах профілактики раку простати. Результати проведених нещодавно у Сполучених Штатах широкомасштабних клінічних досліджень з профілактики раку простати показали високу ефективність вживання вітаміну Е в інгібуванні виникнення цієї хвороби. Фактично гістологічні дослідження простати у випадках смерті від інших причин часто ведуть до виявлення так званого латентного раку простати. Латентний рак простати має велику імовірність виникнення і виявляється приблизно у 30% випадків у віковій групі після 50 років, хоча між повідомленнями, в які включені випадки, в яких гістологічний аналіз показав початок розвитку раку, має місце деяка різниця. У віковій групі після 80 років про рак простати повідомляється в 60-70% таких випадків. Отже існує нагальна потреба в розробці процесу для профілактики латентного раку з метою запобігання пе-

ретворенню його на клінічний рак.

З метою вирішення вищезазначених проблем даним винаходом пропонується активована піна, яка не має шкідливих побічних ефектів і є здатною полегшувати циркуляцію крові і сприяти поліпшенню фізичного стану і лікуванню таких хвороб, як рак.

Засоби для вирішення вищезазначених проблем

Даний винахід створений у результаті глибоких досліджень, спрямованих на вирішення вищеприписаних проблем. Зокрема, винаходом пропонується активована піна, виготовлена із натурального або синтетичного каучуку чи синтетичної смоли, яка відрізняється тим, що вона містить сполуку цирконію і/або сполуку германію і має закриту комірчасту структуру, причому зазначена піна використовується таким чином, що вона прямо або непрямо контактує з тілом людини, коли вводиться фармацевтичний засіб.

Активовану піну згідно з винаходом використовують шляхом приведення її в прямий або непрямий контакт з тілом людини, причому її ефективність зростає при здійсненні тертя між піною і тілом. Активована піна за даним винаходом здатна полегшувати циркуляцію крові і сприяти поліпшенню фізичного стану та лікуванню хвороб. Проте механізм її дії не був установлений.

Сполука цирконію і сполука германію в активованій піні збирають інфрачервоні промені, наприклад, від сонця. Ці промені, зіштовхуючись зі стінками численних комірок усередині активованої піни, зазнають багатократне дифузійне відбиття, збираються і, кінець кінцем, випромінюються назовні активованої піни. Ці промені, довжина хвиль яких лежить в інтервалі від 4 до 25мкм, сприятливо впливають на організм людини. Можна припустити, що ці інфрачервоні промені резонують з довжинами хвиль тіла людини, активуючи в ньому молекули води і молекули білків і, таким чином, підсилюючи в результаті екситометаболічного ефекту природну відновну потужність організму. Наслідком цього процесу є полегшення лікування таких хвороб, як рак, гіпертензія, діабет, хвороби серця, ригідність плеча, поперековий біль, алергічні хвороби, а також поліпшення фізичного стану, наприклад, запобігання передчасному старінню або випадінню волос. Крім того, активована піна є придатною до багатократного використання.

Активована піна згідно з винаходом може застосовуватися при введенні фармацевтичного засобу шляхом прямого або непрямого контактування її з тілом людини, підсилюючи бажаний ефект даного фармацевтичного засобу. Крім того, в тих випадках, коли використовується фармацевтичний засіб при великій дозі чинить шкідливу дію, об'єднання його у звичайному застосуванні з активованою піною буде знижувати цю шкідливість завдяки можливості зменшувати його дозу.

Використовуваними в комбінації з активованою піною фармацевтичними засобами можуть бути, наприклад, засоби для введення шляхом ін'єкцій, крізь шкіру, крізь слизову оболонку, назальні та пероральні засоби. Зокрема, такими засобами можуть бути протиракові засоби та антибіо-

тики. У кращому варіанті фармацевтичним засобом є речовина із тіла людини. Під "речовиною із тіла людини" тут мається на увазі речовина, вихідним джерелом якої є тіло людини. Така речовина може бути одержана шляхом екстрагування із тіла людини або шляхом штучного синтезу.

Кращими речовинами із тіла людини є такі, що чинять якомога менший шкідливий ефект, оскільки при використанні в стандартній дозі шкідливий ефект від них буде відсутній. Такими речовинами можуть бути, наприклад, бутират натрію (у подальшому скорочено SB: sodium butyrate) та естер найтріймасляної кислоти, що є наявними в кишечнику людини. Ці речовини є інгібіторами гістон-деацетилази (скорочено HDACI або HDI, у подальшому HDACI), що дезактивує хроматин, і активують хроматин для експресії гена-супресора раку, припиняючи цим клітинний цикл (цикл ділення клітини, тобто життєвий цикл клітини від завершення одного її ділення до наступного її ділення) ракової клітини, тобто діють як протипухлинні засоби. У тих випадках, коли вони є менш токсичними, використовуватися можуть також синтезовані похідні SB та естеру найтріймасляної кислоти. Комбінуючи вживання будь-якої з цих речовин із застосуванням активованої піни за даним винаходом, можна придушувати функціонування онкогена і підвищувати їхню канцеросупресивну дію.

Крім того, речовинами із тіла людини можуть бути різноманітні ядерні фактори транскрипції (активатори та супресори ДНК) і хроматин-реконструктивні речовини, що діють разом із HDACI. Інакше кажучи, ними можуть бути будь-які речовини, що впливають на промоторну ділянку ДНК канцеросупресорного гена таким чином, щоб активувати цей супресорний ген. Ці речовини можуть об'єднуватися також з активованою піною для придушення функції онкогена і, таким чином, підвищення їхньої канцеросупресивної дії.

Комірки усередині піни в кращому варіанті утворюються з густиною 20-30 комірок/мм². У такій структурі густа скупченість великої кількості закритих комірок дає ефект генерування інфрачервоних променів, що сприятливо діють на тіло людини.

Сконструйована таким чином активована піна може мати будь-яку підходящу зовнішню форму, наприклад, невеликого ручного трикутника, постільної білизни на зразок підстилки або покривала, частини або всього ансамблю одягу і т.д. При цьому немає жодних обмежень щодо геометричної форми активованої піни за умови, що вона забезпечує прямий або непрямий контакт цієї піни з тілом людини. У разі потреби забезпечити описані вище ефекти для лікування тієї чи іншої хвороби з локалізацією на частині тіла людини активована піна може мати форму, наприклад, листа завтовшки, приблизно, від 8 мм до 5 см. Якщо піна використовується як матеріал одягу, то її виготовляють у формі листа завтовшки, приблизно, від 0,3 до 5 мм, що полегшує вбудовування її в одяг.

Каучуковим компонентом піни може бути як природний, так і синтетичний каучук. Синтетичними каучуками можуть бути каучукоподібні полімери, наприклад, хлоропреновий каучук (CR), стирол-бутадієновий каучук (SBR),

акрилонітрилбутадієновий каучук (NBR), акрилонітриловий каучук (NRP), бутадієновий каучук (BR), ізопреновий каучук (IR) та різноманітні суміші цих матеріалів.

Синтетичними смоляними компонентами піни можуть бути, наприклад, поліхлорвініл (PVC), поліпропілен (PP) і поліетилен (PE).

Як піноутворювальний агент можуть використовуватися такі добре відомі матеріали, як Celogen OTI (фірми Uniroyal, США) та Unicell (фірми Dongjin, Південна Корея).

Активована піна може містити сполуку цирконію або сполуку германію, або ту й іншу разом. При лікуванні раку бажано використовувати разом як сполуку цирконію, так і сполуку германію, оскільки це підвищує лікувальний ефект.

Цирконій звичайно використовують у формі його комплексної сполуки. Такою комплексною сполукою цирконію може бути, наприклад, комплекс цирконію з фтором, зокрема, гексафторцирконат калію (K₂ZrF₆) та октофторцирконат калію (K₂ZrF₈). Вміст сполуки цирконію в кращому варіанті складає від 10 до 80 масових частин (мас. ч.) від 100 мас.ч. каучукового компонента. При вмісті цирконієвої сполуки нижче зазначеної нижньої межі її ефект погіршується, а вміст її вище зазначеної верхньої межі не є бажаним з економічної точки зору через незначну різницю в отримуваному ефекті лікування.

Що стосується германієвого компонента, то ним у кращому варіанті є мінеральна або комплексна сполука германію. Серед підходящих мінеральних сполук германію можна назвати, наприклад, аргіродит (Ag₈GeS₉) і ренірит ((Cu,Zn)₁₁Fe₄(Ge,As)₂S₁₆). Підходящими комплексними сполуками германію можуть бути, наприклад, комплекси германію з дикарбоновою кислотою або аміном. Вміст сполуки германію в кращому варіанті лежить у межах від 5 до 10 мас.ч. від 100 мас.ч. каучукового компонента. При вмісті германієвої сполуки нижче зазначеної нижньої межі її ефект погіршується, а вміст її вище зазначеної верхньої межі не є бажаним з економічної точки зору через незначну різницю в отримуваному ефекті лікування.

Окрім вищеописаних компонентів активована піна в кращому варіанті містить вуглець. Вуглець підвищує міцність активованої піни і дозволяє збирати більшу кількість інфрачервоного випромінювання, наприклад, від сонця. Вуглець, наприклад, у формі вуглецевої сажі, може бути наявним у піні в гранулярній формі.

Згідно з даним винаходом при введенні фармацевтичного засобу активована піна може використовуватися шляхом приведення її у прямий чи непрямий контакт з тілом людини, підвищуючи цим ефект даного фармацевтичного засобу. Крім того, в тих випадках, коли використовуваний у великих дозах фармацевтичний засіб чинить шкідливий ефект, комбінування його з активованою піною може зменшити цей шкідливий ефект, оскільки фактична доза його при цьому буде зменшеною.

Короткий опис фігур креслення

На Фіг.1 показаний вигляд у поздовжньому розрізі активованої піни згідно з одним із варіантів

здійснення даного винаходу.

На Фіг.2 поданий графік зміни кровотоку, мл/хв./100г.

На Фіг.3 поданий графік зміни об'єму циркулюючої крові.

На Фіг.4 поданий графік зміни швидкості кровотоку.

На Фіг.5 поданий графік зміни поверхневого контактного тиску тіла, гПа (гекто-Паскаль).

На Фіг.6 показані електронні мікрознімки клітин: (а) експериментальної групи, (b) контрольної групи.

На Фіг.7 поданий результат аналізу мікроматриці кДНК у живих клітинах Du145 (клітина раку простати людини).

На Фіг.8 подані таблиці з графіками змін у часі кількості живих клітин Du145 (клітина раку простати людини); позначкою (+) помічена експериментальна група, в котрій використовувалася активована піна згідно з винаходом, а позначкою (-) помічена контрольна група.

На Фіг.9 подані таблиці з графіками змін у часі кількості живих клітин LNCap (клітина раку простати людини); позначкою (+) помічена експериментальна група, в котрій використовувалася активована піна згідно з винаходом, а позначкою (-) помічена контрольна група.

На Фіг.10 подані таблиці з графіками змін у часі кількості живих клітин PC3 (клітина раку простати людини); позначкою (+) помічена експериментальна група, в котрій використовувалася активована піна згідно з винаходом, а позначкою (-) помічена контрольна група.

Символи на фігурах креслення

1 - лист піни

2 - лист покриття

Нижче розглянуто варіанти здійснення винаходу з поясненням на доданих фігурах креслення. На Фіг.1 показаний вигляд у поздовжньому розрізі активованої піни згідно з одним із варіантів здійснення даного винаходу. Тут можна бачити, що активована піна в даному варіанті має шарувату структуру, що складається із листа 1 каучукової піни, покритого з обох сторін листами 2 каучуку. Поданий тут варіант здійснення винаходу не обмежує інших варіантів шаруватої структури, де, наприклад, лист 2 покриває лист 1 каучукової піни тільки з однієї сторони, або де лист 1 піни взагалі не має покриття листом 2.

Лист 1 піни складається, головним чином, із каучуку або синтетичної смоли, містить сполуку цирконію і/або сполуку германію і вуглець і має закриті комірчасту структуру. Закриті комірки цієї структури утворюються шляхом спінювання за допомогою піноутворювача. На поперечному розрізі листа 1 піни можна бачити велику кількість утворених у ньому крихітних комірок. Товщина листа 1 піни в даному випадку становить, прибли-

зно, 1 см і жодним чином не є обмеженою.

Листи 2 покриття закріплені клеєм на обох сторонах листа 1 піни. При цьому кріплення зазначених листів може здійснюватися за допомогою інших засобів, підходящих для створення шаруватої структури з листом 1 піни. Крім того, матеріалом листа 2 покриття є каучук, головним компонентом якого є хлоропреновий каучук (CR), що не містить комірок, але може бути виконаний таким чином, що він буде мати комірки. Крім того, матеріалом листа 2 покриття може бути також інший синтетичний каучук, натуральний каучук або синтетична смола, наприклад, хлорсульфований поліетилен.

Приклад

Далі на прикладі здійснення винаходу описано його специфічні аспекти. Проте розглянутий тут приклад не вносить будь-яких обмежень у даний винахід і не виключає різноманітних його модифікацій і варіантів, що лежать у межах об'єму винаходу.

Спочатку виготовляють лист 1 піни. Для цього готують суміш каучуку або синтетичної смоли з іншими компонентами, наведеними в Таблиці 1, де кількості їх указані в масових частинах відносно 100 мас.ч. каучуку або смоли. Приготовану суміш перемішують, наприклад, роликком. При цьому перемішування може здійснюватися будь-яким іншим способом, що звичайно застосовується в процесах обробки каучуків або синтетичних смол. Приготованій таким чином суміші надають форму листа за допомогою екструдера. Цей лист піддають вулканізації і розтягуванню в нагрітому повітрі. Процес вулканізації здійснюють у дві стадії - первинну і вторинну. У результаті двостадійної вулканізації отримують лист 1 піни з однорідно розподіленими в ньому комірками.

Далі на лист 1 піни з обох його сторін за допомогою клею на основі каучуку або синтетичної смоли накладають листи 2 покриття. Після цього до лицьової сторони одержаної таким чином шаруватої структури прикладають електричну напругу величиною від 200 до 3300 вольт при струмі від 10000 до 800000 ампер протягом часу від 0,1 до 0,3 секунди. При цьому вища величина струму є кращою. Активована піна генерує електромагнітні хвилі і, зокрема, інфрачервоні промені. Припускається, що висока напруга, прикладена до однієї сторони активованої піни, спрямовує електромагнітну хвилю, надаючи їй направленість убік поверхні, до якої була прикладена напруга. У відповідності з цим, контакт даної поверхні з тілом людини уможливорює сконцентроване випромінювання електромагнітних хвиль у площі контакту, підсилюючи цим ефект лікування хвороби, її профілактики і т.п. На цьому процес виготовлення активованої піни завершується.

Таблиця 1

	Приклади					
	1	2	3	4	5	6
Натуральний каучук	100					
Хлоропреновий каучук		100			100	
Хлорсульфонований поліетилен			100			
PVC (поліхлорвініл)				100		
NRP (акрилонітриловий каучук)						100
Рідкий нітриловий каучук						6
Комплексна сполука цирконію	10	20	7	80		30
Циркон (мінерал)		2	20		30	
Комплексна сполука германію		10	10			
Стабілізатор				3		
Оксид цинку	5	5	5		5	5
Оксид магнію	3	3	3		3	
Celogen OTI	10	10	10	10	10	
Стеаринова кислота						3
DOP (пластифікатор)				25		30
Вуглецева сажа	25	20	20		20	
Технологічне масло	30	30	5		30	
Сірка	3					3
Прискорювач вулканізації DM	2					3
Оксид кремнію	12			12		20
Умови вулканізації						
Первинна	130°C×10хв	132°C×10хв	120°C×8хв	160°C×5хв	100°C×10хв	130°C×10хв
Вторинна	160°C×10хв	160°C×10хв	150°C×8хв	100°C×5хв	160°C×10хв	160°C×10хв
Уявна питома вага	0,16	0,21	0,35	0,24	0,22	0,2
Твердість	7	8	10	10	9	9
(Одиниці вимірювань масові частини)						

У розглянутому вище прикладі "Celogen OTI" є піноутворювач, р,р'-оксис-біс(бензолсульфоніл)гідразин (фірми Uniroyal, США). Мінерал "циркон" означає силікат $ZrSiO_4$. Під "прискорювачем вулканізації DM" тут мається на увазі дисульфід дибензотіазолу. Твердість визначали за допомогою приладу для вимірювання твердості каучуку (типу C).

Тест 1

Активовану піну, виготовлену за допомогою описаного вище процесу, піддавали випробуванням, в яких визначали її вплив на поверхневий контактний тиск і кровотік у людини. Нижче описана методика вимірювань поверхневого контактного тиску тіла і кровотоку.

Об'єкт випробувань

Об'єктом випробувань була жінка 50-річного віку.

Методика випробувань

Випробування проводили за допомогою приладу для вимірювань кровотоку і поверхневого контактного тиску тіла (AMI3037-2 фірми AMI Technology). Датчик поверхневого контактного тиску тіла і кровотоку прикладали до верхньої частини стегна, а вимірювання проводили при навколишній температурі 23°C і відносній вологості 55%

у двох видах умов. В умовах першого виду жінка, вибрана як об'єкт випробувань, сиділа протягом 30 хвилин на стільці з укладеною на ньому активованою піною. Після цього у жінки виміряли кровотік, об'єм циркулюючої крові, швидкість кровотоку і поверхневий контактний тиск протягом 10 хвилин. В умовах другого виду жінка, вибрана як об'єкт випробувань, сиділа протягом 30 хвилин на стільці без активованої піни, після чого у неї виміряли кровотік та інші вищезазначені параметри протягом 10 хвилин. Одержані результати подані в Таблиці 2 і на Фіг.2-5. У Таблиці 2 подані середні значення кровотоку та інших параметрів, виміряних протягом 10 хвилин. На Фіг.2-5 показано як змінюються в часі кровотік та інші параметри протягом 10 хвилин. Тут під "кровотоком" мається на увазі кровотік на 100г тканини тіла людини за хвилину, який визначається за кількістю світла, відбитого еритроцитами в капілярних судинах. Використовуваний тут термін "об'єм циркулюючої крові" означає об'єм крові, що циркулює через певну площу поперечного перерізу 100 г тканини тіла людини, а добуток об'єму циркулюючої крові на швидкість кровотоку, таким чином, приблизно дорівнює величині кровотоку.

Результати випробувань

Таблиця 2

	Кровотік	Об'єм циркулюючої крові	Швидкість кровотоку	Поверхневий контактний тиск тіла
	мл/хв/100г			гекта-Па
Умови 1	1,882	172,12	0,406	40,47
Умови 2	1,232	150,53	0,272	42,74

Як можна бачити із Таблиці 2 і Фіг.2-5, застосування активованої піни поліпшує циркуляцію крові і зменшує поверхневий контактний тиск тіла.

Тест 2

Об'єкти випробувань

У випробуваннях використовувалися культури клітинних ліній Du145, PC3 і LNCар раку простати людини. LNCар є гормонально залежною клітиною раку простати, а Du145 і PC3 є гормонально незалежними клітинами раку простати.

Методика випробувань

У культуральні чашки діаметром 10см з поміченими до кожної з них 15мл культурального середовища висівали по 105 кожної з клітинних ліній простати людини (Du145, LNCар і PC3) і проводили культивування цих клітин при температурі 37°C в атмосфері з 5% CO₂ протягом від 7 до 10 днів (препаратний період), після чого проводили випробування. Слід додати, що для випробувань готували відокремлені культури клітин раку простати, висіяні в окремі культуральні чашки. Крім того, під час препаратного періоду активована піна не використовувалася.

З моменту початку випробувань чашки з культурами всіх експериментальних груп поміщали між листами активованої піни, укладеними знизу і зверху кожної із чашок. У контрольній групі культивування проводили без застосування активованої піни. Культуральне середовище заміняли в середньому кожні три дні і, таким чином, кожний вид клітин піддавали субкультивуванню в новій чашці до того, як клітини ставали конфлюентними. Дати субкультивування у різних видів клітин були різними, але збігалися між контрольними й експериментальними групами кожного з видів.

День, що безпосередньо передував початку випробувань, позначали як нульовий (0), а клітини збирали на 1-й, 2-й і 3-й тижні після початку випробувань. Клітини 3-го тижня культивування фіксували і досліджували під електронним мікроскопом (а).

Крім того, із клітин 3-го тижня культивування екстрагували мРНК (інформаційну рибонуклеїнову кислоту). Екстраговану мРНК гібридизували з мікроматрицею 1,2K кДНК людини (фірми Clontech), після чого проводили аналіз отриманих результатів за допомогою програми генного аналізу GeneSpider (фірми Silicon Genetics, м Редвуд, Каліфорнія, США). Експресію гена, відповідального за апоптоз, визначали шляхом кластерного аналізу ANOVA (b).

Результати випробувань

Спостереження за експериментальною групою показали, що проліферація кожного виду клітин раку простати мала такі характеристики.

(а) У зовнішньому вигляді під електронним мі-

кроскопом між експериментальною і контрольною групою 3-го тижня культивування спостерігалася морфологічна відмінність. Вона полягала в тому, що всі ракові клітини, які контактували з активованою піною протягом трьох тижнів, мали більше цитоплазматичних вакуолей, менш видимі внутрішні структури мітохондрій і менш ясну ядерну мембрану (Фіг.6(a)), ніж клітини контрольної групи (Фіг.6(b)). Таким чином, цілком очевидно, що апоптоз виникає в тих клітинах, культивування яких проводилося при наявності активованої піни.

Під "апоптозом" тут мається на увазі генетично програмована смерть клітини, тобто суїцид клітини. Під раковою клітиною слід розуміти таку клітину, яка продовжує проліферацію, оскільки система апоптозу виведена з ладу.

(b) На Фіг.7 як типовий приклад мікроматриці кДНК 3-го тижня культивування наведені результати, отримані з клітинами Du145. Чорним кольором тут позначена підсилена експресія мРНК відносно контрольної групи, тобто активація гена; решічастим штрихуванням показана знижена експресія мРНК відносно експресії в контрольній групі, тобто знижена функція гена; сірим кольором показана незмінена експресія мРНК відносно експресії контрольної групи.

Експериментальна група клітин Du145 показала позитивну регуляцію у FasL (2,3 рази), Fas (1,4 рази), TRADD (1,4 рази), CASP1, 4 і 10 (1,7, 1,2 і 1,7 рази) і DFF40 (1,7 рази) порівняно з контрольною групою. Експериментальна група клітин PC3 показала позитивну регуляцію в CD40 (1,4 рази) і TNF (1,4 рази) порівняно з контрольною групою. Експериментальна група клітин LNCар показала позитивну регуляцію у Fas (1,6 рази), CASP8 (1,6 рази) і CASP3 (1,3 рази) порівняно з контрольною групою. Отже, дані результати свідчать про те, що FasL, Fas, TRADD, CASP1, 4 і 10, DFF40, CD40 і TNF утворюють групу генів, що починає апоптотний ланцюг, а також про те, що апоптоз був полегшений в експериментальній групі, де використовувалася активована піна, порівняно з контрольною групою.

Висновки

Із описаних вище результатів випробувань можна зробити такі висновки. Активована піна ініціює апоптотний ланцюг і полегшує ефект ослаблення функціонування ракових клітин.

Тест 3

У даних випробуваннях з придушення проліферації ракових клітин використовувалися активована піна та SB як інгібітор гістон-деацетилази (HDACI). Ці випробування можуть служити специфічним підтвердженням докорінності змін, які несе з собою запропонований процес у лікування і профілактику раку простати, а також того, що він у

принципі може бути ефективним проти будь-якого виду раку. Нижче HDACI-інпбування описано більш докладно. Ацетилювання лізину в гістоні гістон-ацетилтрансферазою (НАТ) активує ядерний хроматин. Активация ядерного хроматину, у свою чергу, веде до зв'язування ядерного фактора транскрипції, разом з активатором, з промоторною ділянкою ДНК, у результаті чого відбувається експресія структурного гена. Крім того, HDAC (гістон-деацетилаза) викликає деацетилювання лізину зі зворотною дезактивацією хроматину.

HDACI-інгібітор, яким може бути SB, запобігає деацетилюванню гістон-деацетилазою, виключаючи, таким чином, дезактивацію хроматину. Отже, HDACI-інгібітор активує ген-супресор раку і т.п. речовини, функції яких послаблені, підсилюючи цим їхню дію в напрямку придушення проліферації ракових клітин.

Об'єкти випробувань

У випробуваннях використовувалися культури клітинних ліній Du145, PC3 і LNCaP раку простати людини. LNCaP є гормонально залежною клітиною раку простати, а Du145 і PC3 є гормонально незалежними клітинами раку простати.

Методика випробувань

Клітини раку простати всіх видів (Du145, LNCaP і PC3) культивували в концентрації 103клітин/100мкл на 96-лунковому мікропланшеті. На планшет в експериментальній групі додавали 6мкл 0, 1, 2 або 3ммоль SB, і планшет утримували покритим зверху і знизу активованою піною. Культуральне середовище, що містило SB, замінювали кожні два дні. В контрольній групі культивування проводили без застосування активованої піни при додаванні до культури 6мкл 0, 1, 2 або 3ммоль SB. При кількості SB 0ммоль його заміняла така ж сама кількість (6мкл) забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS). Випробування проводили чотирикратно для кожної концентрації.

На 2-й, 5-й і 8-й дні культивування живі клітини визначалися за оптичною густиною (O.D.: optical density) на хвилі 450нм за допомогою набору проліферації клітини Kit II (ХТТ, фірми Roche, м.Мангейм, Германія), в якому віднімалася величина контрольного рівня (650).

У вищезгаданому наборі проліферації клітин (ХТТ) використовується його здатність служити

основою для дегідрогенази і відновлюватися дегідрогеназою на формаган, дозволяючи визначати формагановий барвник, утворений стандартною сумішшю ХТТ1 і мітохондріальну дегідрогеназу активність для кількісної оцінки виживаності клітин. Таким чином, кількість формагану відповідає кількості живих клітин.

Результати випробувань

Активована піна давала значне придушення проліферації всіх видів клітин раку простати людини безвідносно від їхньої гормональної залежності при наявності навіть низької концентрації SB (1ммоль) порівняно з тим, що спостерігається за високої концентрації (3ммоль) SB без активованої піни (Фіг.8-10). Інакше кажучи, активована піна, діючи разом з бутиратом натрію, значно придушує проліферацію клітин раку простати людини.

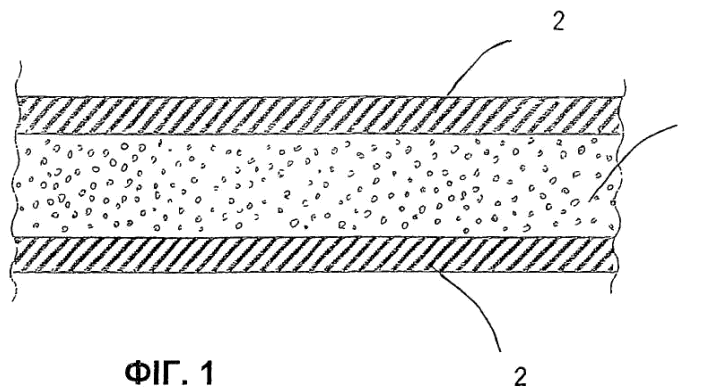
Висновки

Описані вище результати випробувань дозволяють зробити такі висновки. Як показано на Фіг.8-10, активована піна може використовуватися одночасно з HDACI для підвищення супресивної дії HDACI на проліферацію клітин раку простати людини. У принципі даний процес демонструє свою здатність до ефективної терапії будь-якого виду раку. Крім того, бутират натрію є речовиною, наявною в кишечнику людини і не викликає алергічної реакції. Отже, його 1ммоль концентрація, яка продемонструвала свою ефективність у даних випробуваннях, є вкрай низькотоксичною для живого організму і не дає шкідливих ефектів, подібних алергії.

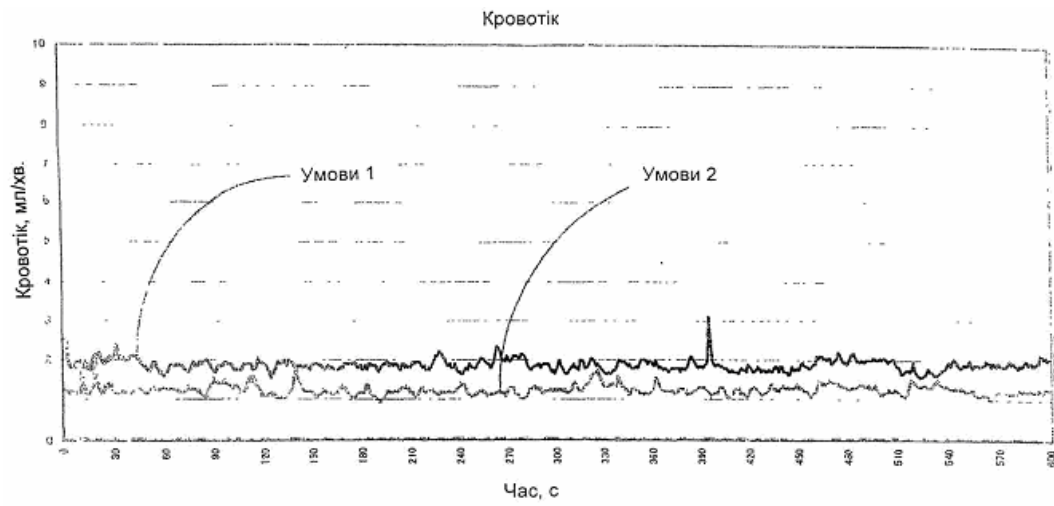
Крім того, надлишок HDAC, діючи разом з фактором реконструювання хроматину і т.п., метилує цитозин і придушує проліферацію ракових клітин.

Застосування

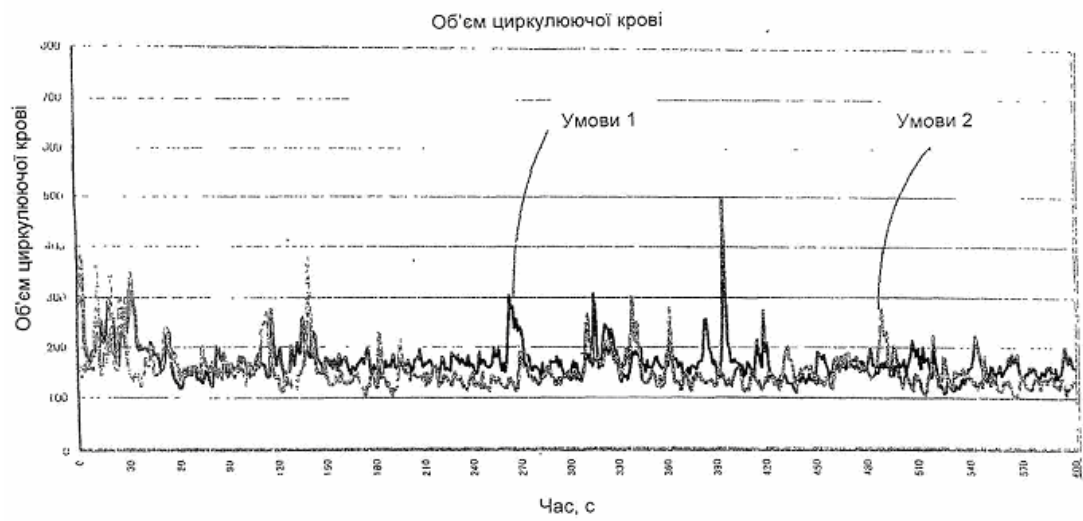
Активована піна за даним винаходом може використовуватися шляхом прямого або непрямого контактування з тілом людини при введенні фармацевтичних засобів для підвищення корисного ефекту введеного фармацевтичного засобу. Крім того, фармацевтичний засіб, який у великій дозі може чинити шкідливий ефект, знижує свою шкідливість при застосуванні його в комбінації з активованою піною, оскільки при цьому його доза може бути знижена.



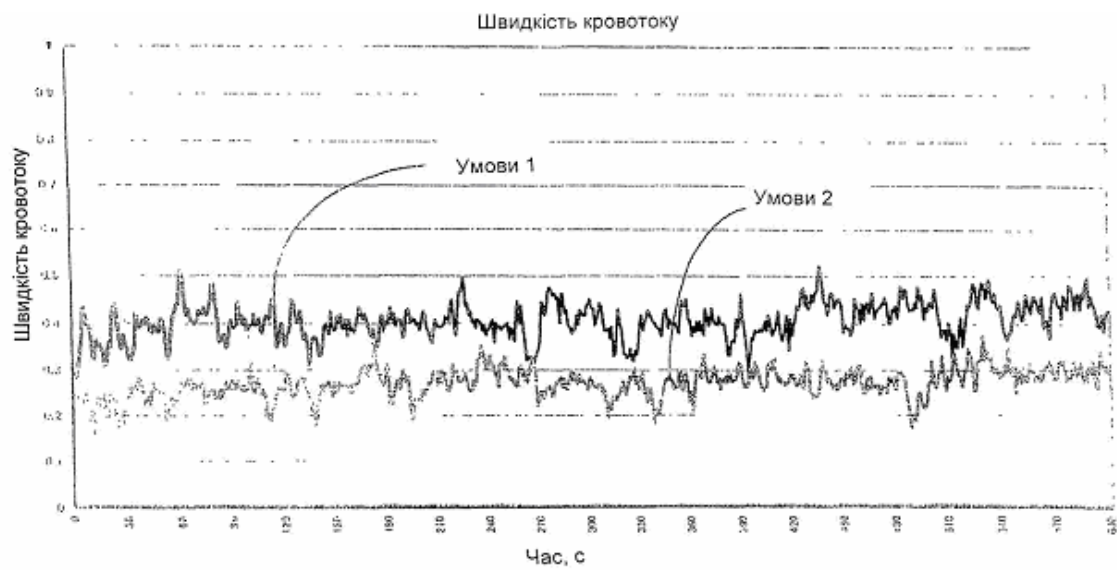
ФІГ. 1



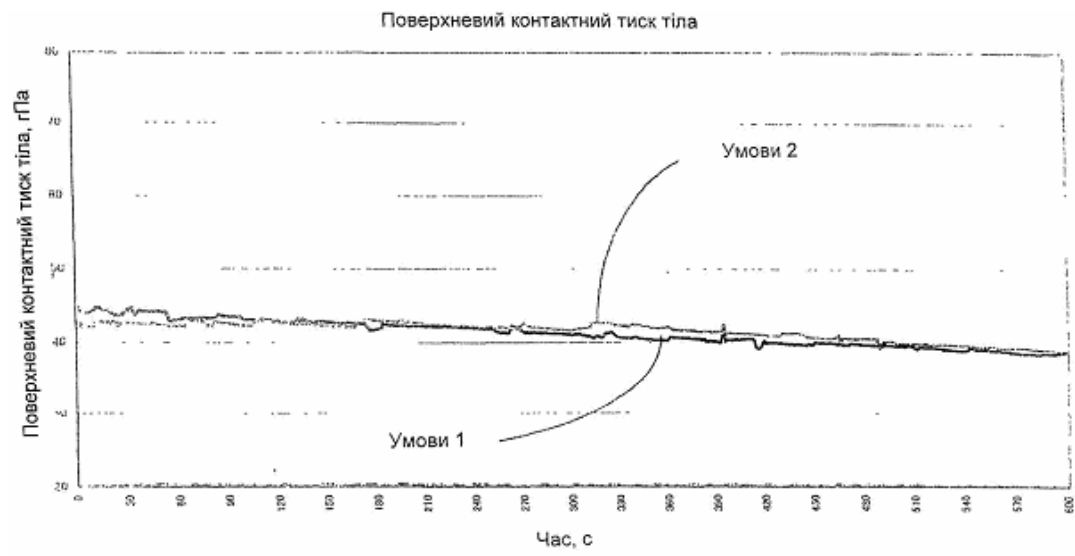
ФІГ. 2



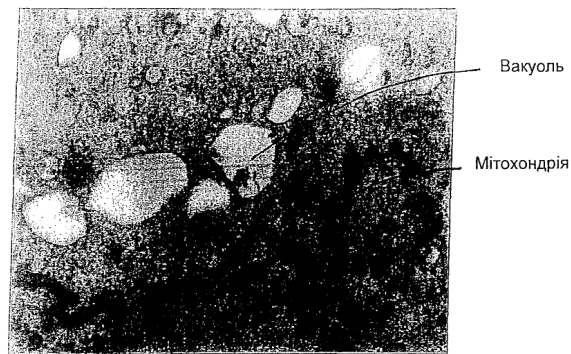
ФІГ. 3



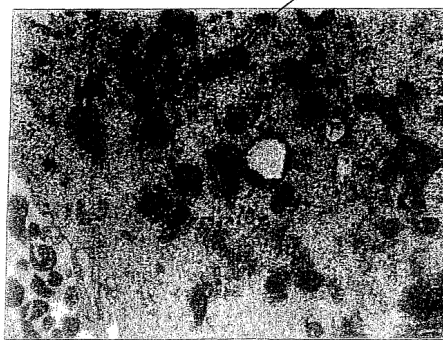
ФІГ. 4



ФІГ. 5

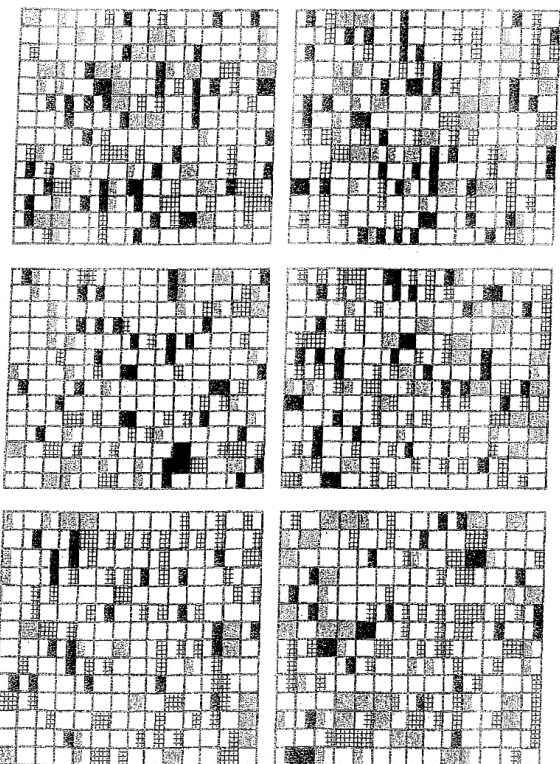


a) Мітохондрія



b)

ФІГ. 6



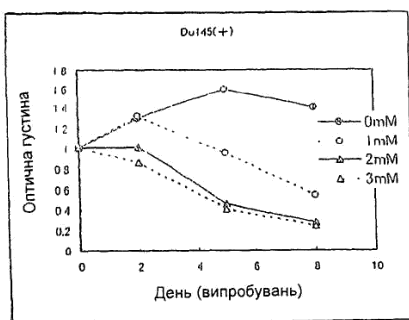
Du145 3 тиждень

ФІГ. 7

Du145

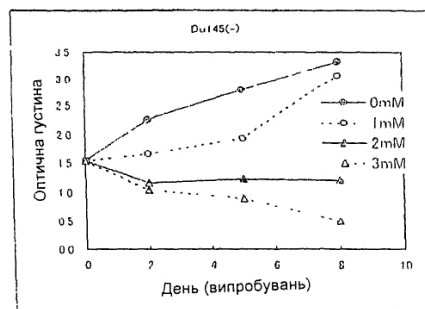
(+) (+)

		0 День	2 День	5 День	8 День
0mM		1.088	1.248	1.308	1.197
		0.963	1.354	1.666	1.486
		0.848	1.289	1.647	1.524
		1.152	1.772	1.386	
1mM	Середнє	1.013	1.297	1.598	1.398
	STDEV	0.135	0.053	0.201	0.146
		1.088	1.041	1.053	0.567
		0.963	1.456	0.917	0.545
2mM	Середнє	1.013	1.318	0.959	0.548
	STDEV	0.135	0.227	0.074	0.013
		1.088	0.735	0.513	0.287
		0.963	1.143	0.474	0.268
3mM	Середнє	1.013	1.019	0.461	0.280
	STDEV	0.135	0.195	0.041	0.008
		1.088	0.679	0.400	0.242
		0.963	0.908	0.425	0.256



(-) (-)

		0 День	2 День	5 День	8 День
0mM		1.448	1.912	2.685	3.319
		1.579	2.181	2.695	3.375
		1.575	2.552	2.883	3.521
		1.532	2.408	2.832	3.082
1mM	Середнє	1.534	2.263	2.774	3.324
	STDEV	0.061	0.280	0.099	0.183
		1.448	1.851	1.829	3.076
		1.579	1.571	2.104	2.841
2mM	Середнє	1.534	1.668	1.929	3.057
	STDEV	0.061	0.143	0.129	0.152
		1.448	1.090	1.136	1.208
		1.579	1.308	1.164	1.286
3mM	Середнє	1.534	1.172	1.232	1.221
	STDEV	0.061	0.100	0.105	0.056
		1.448	1.129	0.834	0.497
		1.579	1.029	0.935	0.421

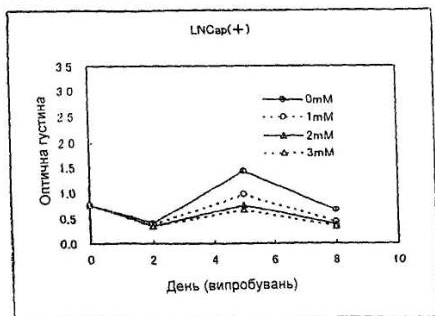


ФІГ. 8

LNCap

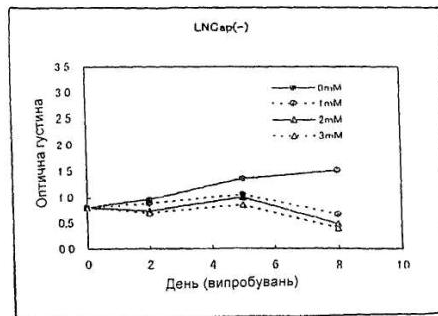
(+) (+)

		0 День	2 День	5 День	8 День
0mM		0.745	0.392	1.197	0.648
		0.841	0.412	1.662	0.690
		0.775	0.417	1.524	0.657
		0.763	0.421	1.328	0.687
1mM	Середнє	0.781	0.411	1.428	0.671
	STDEV	0.042	0.013	0.206	0.021
		0.745	0.394	0.980	0.429
		0.841	0.354	1.097	0.433
2mM	Середнє	0.781	0.382	0.977	0.436
	STDEV	0.042	0.020	0.096	0.005
		0.745	0.360	0.858	0.380
		0.841	0.330	0.739	0.383
3mM	Середнє	0.781	0.344	0.767	0.377
	STDEV	0.042	0.014	0.085	0.010
		0.745	0.340	0.691	0.344
		0.841	0.358	0.643	0.344



(-) (-)

		0 День	2 День	5 День	8 День
0mM		0.778	0.855	1.419	1.691
		0.836	1.059	1.357	1.592
		0.830	1.012	1.379	1.567
		0.731	0.914	1.318	1.236
1mM	Середнє	0.794	0.960	1.368	1.522
	STDEV	0.049	0.092	0.042	0.198
		0.778	0.840	1.060	0.726
		0.836	0.906	1.076	0.669
2mM	Середнє	0.794	0.871	1.056	0.672
	STDEV	0.049	0.027	0.025	0.039
		0.778	0.728	0.977	0.427
		0.836	0.763	0.985	0.465
3mM	Середнє	0.794	0.724	0.999	0.483
	STDEV	0.049	0.034	0.042	0.047
		0.778	0.728	0.876	0.396
		0.836	0.658	0.814	0.429



ФІГ. 9

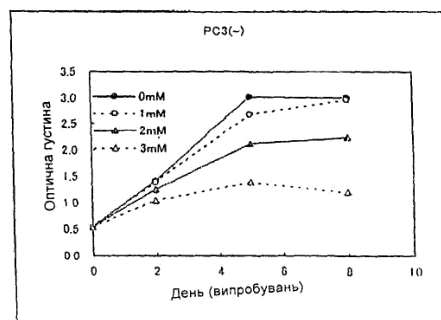
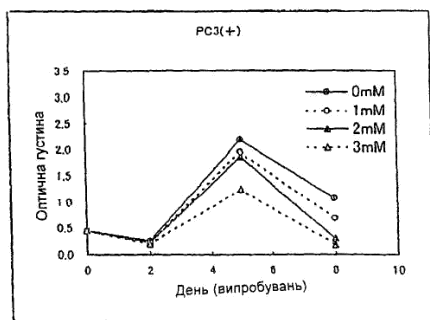
PC3

(+)

		0 День	2 День	5 День	8 День
0mM		0.407	0.275	2.777	1.289
		0.497	0.256	2.662	1.023
		0.450	0.273	0.277	1.056
		0.428	0.253	3.034	0.905
	Середнє STDEV	0.446 0.039	0.264 0.011	2.188 1.283	1.068 0.161
1mM		0.407	0.196	0.232	0.583
		0.497	0.247	2.481	0.659
		0.450	0.242	2.457	0.677
		0.428	0.282	2.613	0.828
	Середнє STDEV	0.446 0.039	0.242 0.035	1.946 1.145	0.687 0.103
2mM		0.407	0.232	1.795	0.258
		0.497	0.245	1.891	0.325
		0.450	0.223	2.110	0.317
		0.428	0.192	1.624	0.312
	Середнє STDEV	0.446 0.039	0.223 0.023	1.855 0.203	0.303 0.030
3mM		0.407	0.197	1.171	0.176
		0.497	0.201	1.164	0.153
		0.450	0.195	1.363	0.200
		0.428	0.174	1.233	0.196
	Середнє STDEV	0.446 0.039	0.192 0.012	1.233 0.092	0.181 0.022

(-)

		0 День	2 День	5 День	8 День
0mM		0.567	1.267	2.816	2.900
		0.485	1.579	3.094	3.010
		0.543	1.480	3.122	2.889
		0.565	1.323	3.040	3.211
	Середнє STDEV	0.540 0.038	1.412 0.143	3.018 0.139	3.003 0.149
1mM		0.567	1.251	2.617	2.820
		0.485	1.566	2.680	3.002
		0.543	1.393	2.701	3.000
		0.565	1.325	2.700	3.034
	Середнє STDEV	0.540 0.038	1.384 0.135	2.675 0.040	2.964 0.097
2mM		0.567	1.109	1.942	1.846
		0.485	1.280	2.073	2.564
		0.543	1.211	2.205	2.398
		0.565	1.376	2.239	2.129
	Середнє STDEV	0.540 0.038	1.244 0.113	2.115 0.136	2.234 0.315
3mM		0.567	0.819	1.374	1.242
		0.485	1.066	1.172	1.366
		0.543	1.108	1.606	1.172
		0.565	1.154	1.371	0.994
	Середнє STDEV	0.540 0.038	1.037 0.150	1.381 0.177	1.194 0.155



ФІГ. 10