



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109685** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61K 38/00
A61P 9/12 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 03406	(72) Винахідник(и): Дорофєєва Наталя Олександрівна (UA), Коцюруба Анатолій Вікторович (UA), Могильницька Лілія Анатоліївна (UA), Малина Альона Едуардівна (UA), Корнелюк Олександр Іванович (UA), Сагач Вадим Федорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.04.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.08.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.08.2016, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ НАНУ, вул. Богомольця, 4, м. Київ-24, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ВІДМІНИ ОКСИДАТИВНОГО І НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ ПРИ АРТЕРІАЛЬНІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ

(57) Реферат:

Спосіб відміни оксидативного і нітрозативного стресу при артеріальній гіпертензії базується на введенні органічної сполуки. В ньому вводиться внутрішньовенно одноразово рекомбінантний пептид ендотеліальний моноцитактивуючий фактор II (EMAP II) у концентрації 2,8 мкг/кг.

UA 109685 U

Корисна модель належить до медицини і кардіології і може бути використана для лікування і профілактики артеріальної гіпертензії.

Останнім часом багато авторів пов'язують причину виникнення артеріальної гіпертензії з розвитком оксидативного і нітрозативного стресу [1,2]. Він сприяє індукції роз'єданого стану конститутивних NO-синтаз (eNOS і/чи nNOS), яка супроводжується зниженням синтезу оксиду азоту (NO) та порушенням тонусу судин. Оксидативний і нітрозативний стрес сприяє розвитку мітохондріальної дисфункції: відкриванню мітохондріальної пори, роз'єднанню процесу окиснення і фосфорилювання, зниженню використання кисню для утворення аденозинтрифосфату (АТФ) і збільшенню використання кисню для утворення активних форм кисню [3]. Це призводить до формування порочного кола, яке може бути одним із механізмів, підтримуючих енергодефіцит при гіпертензії. Відомо, якщо рівень енергії, що утворюється, зменшується, це перш за все обмежує функціональні можливості серця, в першу чергу, відбувається зниження показників діастолічної функції серця і порушення розслаблення лівого шлуночка, що ми спостерігаємо при артеріальній гіпертензії. Але вже ці зміни призводять до зниження адаптаційних можливостей серця.

Наші дослідження показали значне збільшення маркерів оксидативного і нітрозативного стресу в серці, мітохондріях і аорті спонтанно гіпертензивних щурів [4], що в свою чергу призводило до розвитку мітохондріальної дисфункції і порушення функціонального стану серця і судин при артеріальній гіпертензії. Нами виявлено зменшення ступеня спряження процесу окиснення і фосфорилювання мітохондрій серця у спонтанно гіпертензивних щурів, зниження мембранного потенціалу мітохондрій і збільшення чутливості мітохондріальної пори до індуктора її відкривання Ca^{2+} в поєднанні із значними функціональними порушеннями серця і судин [4].

Тому фармакологічні підходи, які здатні зменшувати розвиток оксидативного і нітрозативного стресу, тим самим запобігаючи розвитку мітохондріальних дисфункцій і функціональних порушень серця і судин, мають значний терапевтичний інтерес.

Для запобігання оксидативного і нітрозативного стресу використовують деякі речовини, такі як аскорбінова кислота, фолієва кислота, токоферол, ресвератрол, BH_4 , коензим Q_{10} та інші [2].

Як прототип виступає використання аскорбінової кислоти, яка призначається для зменшення показників оксидативного і нітрозативного стресу при гіпертензії [5]. Аскорбінова кислота відновлює окисні альфа-токоферольні радикали, а також зв'язує супероксид-іони та активні радикали. Проведені дослідження ефективності тижневої С-вітамінзбагаченої дієти на гемодинамічні функції та окисний стрес у спонтанно гіпертензивних щурів показали, що призначення великих доз вітаміну С у короткий термін може змінити показники, які вказують на підвищене утворення реактивних форм кисню (відношення кількості радикалів аскорбінової кислоти до кількості аскорбінової кислоти, активність НАД(Ф)Н-оксидази, значення електронної спектроскопії реактивних видів кисню), але при цьому не знижується артеріальний тиск і не підвищуються антиоксидантні властивості плазми [5].

Даний спосіб використання хімічної сполуки для зниження оксидативного і нітрозативного стресу є найбільш близьким до запропонованої корисної моделі, оскільки це також органічна сполука, яка вводиться в невеликих дозах. Недоліком даного способу є більш тривала терапія per os впродовж 7 днів в концентрації 5мг/кг, лише короточасне відновлення редокс-статусу клітин, а також відсутність позитивної дії на зниження артеріального тиску[5].

Задачею корисної моделі, що заявляється, є розробка способу відміни оксидативного і нітрозативного стресу при артеріальній гіпертензії шляхом застосування ендотеліального моноцитактивуючого фактора II (EMAP II).

Технічним результатом корисної моделі є покращення функціонального стану серця і судин, профілактика і лікування артеріальної гіпертензії.

Запропонований спосіб дозволяє унаслідок зменшення оксидативного і нітрозативного стресу зменшити мітохондріальну дисфункцію, покращити функціональний стан серця у щурів зі спонтанною гіпертензією.

В способі, що заявляється, ендотеліальний моноцитактивуючий фактор II (EMAP II) вводили одноразово внутрішньовенно та через 30 хв готували проби для визначення біохімічних показників.

Приклад.

Дослідження проводили на щурах-самцях віком 6 міс. лінії Вістар та зі спонтанною гіпертензією. Всі експериментальні процедури виконано, згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС). Щурів наркотизували за допомогою уретану (1,25 г/кг, внутрішньоочеревино). Застосовували Ендотеліальний моноцитактивуючий поліпептид II (EMAP II), отриманий у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту

молекулярної біології і генетики НАН України (керівник - член-кор. НАН України А. І. Корнелюк) методом бактеріальної експресії. Ендотеліальний моноцитарноактивуючий поліпептид ІІ (ЕМАР ІІ) був експресований в бактеріальній системі клітин *E.coli* в штамі BL21(DE3)pLysE, очищений методом металхелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA агарозою. Ступінь чистоти отриманого рекомбінантного цитокину ЕМАР ІІ (98,5 %) визначали методом гел-електрофорезу в денатуруючих умовах за Леммлі. ЕМАР ІІ має у своєму складі 168 амінокислотних залишки і молекулярну вагу 18535 Да. [6]. ЕМАР ІІ вводили одноразово (внутрішньовенно по 10 мкл розчину, що містив 0,85 мкг цього фактора в 0,5 мл 0,9 %-го NaCl) Після введення ЕМАР ІІ через 30 хв тварин декапітували, відбирали серце та аорту і на холоді готували їх гомогенати для визначення біохімічних показників. У цільних свіжоприготовлених гомогенатах серця й аорти щурів визначали біохімічні показники, які тестують наявність комбінованого окисного стресу та (надлишкового синтезу $*O_2^-NO$ і пероксинітриту) і характеризують причини його виникнення. Показники окисдативного стресу (швидкість генерації супероксидного ($*O_2^-$) і гідроксильного ($*OH$) радикалів, пули стабільного пероксиду водню (H_2O_2), ейкозаноїдів тромбоксану B_2 (TxB_2) та пептидолейкотрієну C_4 (LTC_4), сечової кислоти й маркера перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) дієнових кон'югатів (ДК) визначали як описано раніше [3]. Визначали показники нітрозативного стресу кальцій-залежну активність cNOS, як суму ендотеліальної (eNOS) і нейрональної (nNOS) NOS, кальцій-незалежну активність iNOS, НАДН-залежну активність нітратредуктази, пули стабільних метаболітів NO - нітрит ($N O_2^-$) - і нітрат (NO_3^-) - аніонів, низькомолекулярних (НМНТ) і високомолекулярних (ВМНТ) нітрозотіолів, вміст регулятора активності cNOS сірководню (H_2S) [3]. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), SDUDENT (MS Excell) та Origin 6.0 ("Microcall Inc. ", США).

Короточасне введення ЕМАР ІІ повністю нормалізувало швидкість генерації $*O_2^-$ в серці та аорті щурів зі спонтанною гіпертензією, причому, якщо в серці (див. фіг. 1, на якому 1 - швидкість генерації $*O_2^-$, 2 - швидкість генерації $*OH$, 3 - Вміст H_2O_2 , 4-вміст TxB_2 , 5. - вміст LTC_4 , 6- вміст продуктів деградації АТФ і ГТФ, 7- вміст ДК, $*P<0,05$, $**P<0,01$ відносно контрольної групи, $^{##}P<0,05$, $^{###}P<0,01$ відносно SHR).

В аорті на короточасну дію ЕМАР ІІ відреагувала швидким зниженням активності циклооксигеназа (про що свідчить зниження пулів тромбоксану B_2) і ксантинооксидаза (про що свідчить зниження пулів сечової кислоти). В аорті щурів зі спонтанною гіпертензією швидкість генерації $*OH$ за дії фактора швидко знижувалася, як і пули H_2O_2 . Це свідчить про те, що за гіпертензії в аорті джерелом токсичного $*OH$ може бути якраз класична реакція Фентона, що потребує не лише наявності іонів Fe^{2+} , але і активності супероксиддисмутази для утворення H_2O_2 . Швидке зниження пулів останнього в аорті за дії фактора і щурів зі спонтанною гіпертензією підтверджує це припущення.

Причиною інгібування нітрозативного стресу за короточасної дії ЕМАР ІІ в серці щурів зі спонтанною гіпертензією може бути зафіксоване нами інгібування декомпозиції нітрозоглутатіону (про що свідчить підвищення пулів низькомолекулярних (НМНТ) нітрозотіолів). На фіг. 2 представлені показники нітрозативного стресу в серці нормотензивних і гіпертензивних щурів за короточасної дії ЕМАР ІІ (де 1- активність cNOS, 2- активність iNOS, 3- нітратредуктазна активність, 4 - вміст NO_2^- , 5 - вміст NO_3^- 6 - вміст НМНТ, 7 - Вміст ВМНТ, 8 - вміст H_2S , $*P<0,05$, $**P<0,01$ відносно контрольної групи, $P<0,05$, $P<0,01$ відносно SHR).

Водночас в аорті спостерігалось інгібування утворення надлишкового NO de novo (про що свідчить зниження активності iNOS) завдяки реутилізації (знижується активність нітратредуктази), але не внаслідок декомпозиції нітрозоглутатіону (пули НМНТ підвищуються). Одночасне зниження і генерації $*O_2^-$ (див. фіг. 1), і надлишкового NO (див. фіг. 2) свідчить про швидке інгібування за короточасної дії ЕМАР ІІ і окисдативного, і нітрозативного компонентів окисного стресу в серці й аорті щурів зі спонтанною гіпертензією. При цьому створюються умови для швидкого відновлення конститутивного de novo синтезу NO (на це вказує зростання активності cNOS і пулів нітрит-аніону (див. фіг. 2) внаслідок відміни неспряження cNOS, що корелює з покращенням функціональних показників серця. Отже, ЕМАР ІІ виявився потужним "відновлювачем" редокс-статусу клітин, як наслідок, короточасним "ліквідатором" кардіальної й ендотеліальної дисфункції за гіпертензії.

Основною перевагою даного способу шляхом введення ендотеліального моноцитарноактивуючого фактора ІІ перед іншими є дія після одноразового внутрішньовенного введення, значне зниження маркерів окисдативного і нітрозативного стресу, стимуляція скоротливої активності міокарда, насосної функції серця, поліпшення процесу релаксації лівого шлуночка.

Джерела інформації:

1. Li H, Horke S, Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. // Trends Pharmacol Sci. 2013 Jun;34(6):313-9.

2. І.С. Чекман, Н.О. Дацюк Роль перекисного окиснення ліпідів у патогенезі артеріальної гіпертензії // Серце і судини.-2008. - № 4. - С. 110-115.

3. А.В. Коцюрба, Н.О. Дорофеева, В.Ф. Сагач Неспряження конститутивних NO-синтаз викликає окисний стрес та порушення кардіогемодинаміки при гіпертензії (частина I) // Фізіологічний журнал. - 2015. - № 3. - С. 3-10.

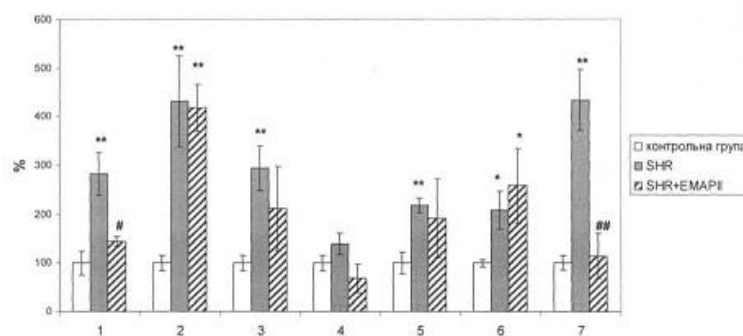
4. Дорофеева Н.О., Гошовська Ю.В., Сагач В.Ф. Мембранний потенціал мітохондрій серця і швидкість споживання кисню у щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією//Фізіологічний журнал. - 2011. - Т. 57, № 3. - С. 3-9.

5. Sicard P., Oudot Аю, Guiland J. et al. Dissociation between vascular oxidative stress and cardiovascular function in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats // Vascular Pharmacology. - 2006. - V. 45. - P. 112-121.

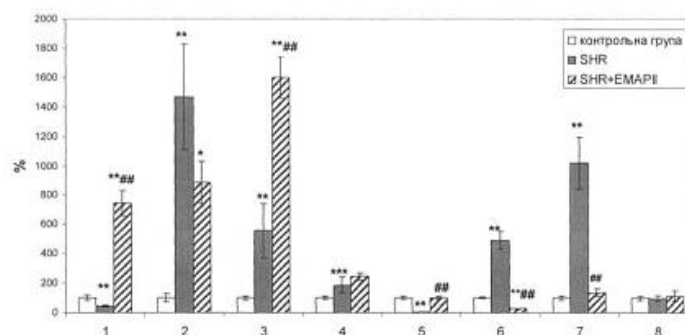
6. А. Л. Дубровский, Дж. Браун, А. И. Корнелюк, Дж. К. Мюррей, Г. Х. Мацука Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина ЕМАР-2 и цитокиноподобного домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. - 2000. - 16, № 3. - С. 229-235.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб відміни оксидативного і нітрозативного стресу при артеріальній гіпертензії, що базується на введенні органічної сполуки, який **відрізняється** тим, що в ньому вводиться внутрішньовенно одноразово рекомбінантний пептид ендотеліальний моноцитактивуючий фактор ІІ (ЕМАР ІІ) у концентрації 2,8 мкг/кг.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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