



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **17225** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61K 38/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС****ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ АПОПТОЗУ ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИН ПРИ БРОНХІАЛЬНІЙ АСТМІ**

1

2

(21) u200603229

(22) 27.03.2006

(24) 15.09.2006

(46) 15.09.2006, Бюл. № 9, 2006 р.

(72) Ястремська Ірина Анатоліївна, Кайдашев Ігор Петрович

(73) Ястремська Ірина Анатоліївна, Кайдашев Ігор Петрович

(57) 1. Спосіб корекції апоптозу лімфоїдних клітин

при бронхіальній астмі, який включає активацію апоптозу та його оцінку, який **відрізняється** тим, що активацію апоптозу здійснюють антигістамінними препаратами.

2. Спосіб корекції апоптозу лімфоїдних клітин при бронхіальній астмі за п. 1, який **відрізняється** там, що як антигістамінні препарати використовують, наприклад, дезлоратадин.

Корисна модель стосується галузей біології і медицини та може бути використана для корекції апоптозу лімфоїдних клітин при патологіях, що супроводжуються порушеннями перебігу процесів програмованої загибелі клітин, в тому числі при atopічній бронхіальній астмі.

Апоптоз, або програмована загибель клітини, є універсальний природний процес, що представляє собою основний компонент ембріогенезу, морфогенезу та росту тканин. Встановлена зведена роль апоптозу в розвитку багатьох патологічних процесів та станів, таких, як злоякісні новоутворення, синдром набутого імунodefіциту, деякі нейродегенеративні та аутоімунні захворювання, інфекційні, алергічні процеси та ін. [Кайдашев І.П. Апоптоз - как общебиологический процесс // Проблемы экологии и медицины. - 1998. - Т.2, №5. - С. 9-13; Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии. Под ред. Б.Б. Мороза. - М.: Медицина, 2001. - С. 13-56.].

Усвідомлення ролі апоптозу в підтримці постійної чисельності клітинних популяцій, а також формоутворення та видалення дефектних клітин (гомеостазу організму), інтенсифікувало пошук фармакологічних речовин, здатних впливати на апоптоз [Ковальчук Л.В., Павлюк А.С., Каспаров А.А., Щигленко Н.А. и соавт. Анализ фармакологических средств на модели апоптоза лимфоцитов человека in vitro в норме и при иммунопатологии // Аллергология и иммунология. - 2000. - Т. 1, №2-024-30.].

Відомі способи індукції апоптозу лімфоїдних

клітин за допомогою специфічної імунотерапії [Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Макаров А.И. Апоптоз лимфоцитов - один из механизмов специфической иммунотерапии atopических заболеваний // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, - 1998. - Т.125. - №4. - С.434-436]. В клінічній практиці застосовують глюкокортикостероїди [Бойчук С.В., Мустафин І.Г., Фассахов Р.С., Терещенко Д.В. Спонтанный и глюкокортикоид - индуцированный апоптоз лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой: роль митохондрий и CD95 (APO-1) // Аллергология. - 2002. - №1. С. 13-20], але вони мають небажані побічні ефекти.

Найбільш близьким до запропонованого по функціональному призначенню та технічному результату є спосіб індукції апоптозу моноклональних периферійної крові, шляхом використання моноклональних антитіл до HLA - A, B, C, HLA-DR та CD95 молекул, який прийнято за прототип [Пат. UA №60629 А, МКВ 7 А61В5/00, А61К39/00, опубл. Бюл. №10, 2003].

Для здійснення цього способу використовували моноклональні антитіла периферійної крові хворих на atopічну алергію та здорових донорів. Суспензії клітин готували шляхом виділення моноклеарів з периферійної венозної крові центрифугуванням в одноступеневому градієнті щільності фіколоворографіні.

Для стимуляції апоптозу використовували моноклональні антитіла (мкАТ) анти- HLA - A, B, C, анти - HLA-DR та CD95. мкАТ вносили у середовище культивування в дозі 10μg на 10⁶ клітин. Клітинну суспензію культивували в трьох серіях: 1

(19) **UA** (11) **17225** (13) **U**

серія - 10% ембріональної сироватки телят, 2 серія - з 10% аутологічної сироватки, 3 серія - до МНПК донорів додавали 10% сироватки хворих на atopію, 4 серія - до МНПК хворих на atopію додавали 10% сироватки донорів. Культивування здійснювали 24 год. при 37°C.

З метою комплексної оцінки процесів апоптозу використовували забарвлення за методом Май-Грюнвальд-Романовський-Гімза (цитологічний барвник) та Hoechst 33342 (флуоресцентний барвник). Підраховували МНПК, які мали морфологічні ознаки апоптозу: конденсація та фрагментація хроматину. Флуоресценцію реєстрували за допомогою мікроскопа Люма Р-8 (Ломо, Росія).

Недоліком відомого способу є:

1. корекція апоптозу здійснюється *in vitro*, що не дає змогу проводити інтерпретацію результатів стосовно цілісного організму;

2. проводиться корекція апоптозу лише однієї лімфоїдної субпопуляції (мононуклеарів периферійної крові);

В основу корисної моделі поставлено завдання створити такий спосіб корекції апоптозу лімфоїдних клітин шляхом удосконалення відомого, який дозволяє здійснювати корекцію апоптозу всіх субпопуляцій лімфоїдних клітин в умовах *in vivo*, використовуючи антигістамінні препарати, з метою модулювання імунної системи хворих на бронхіальну астму та забезпечити більш достовірну комплексну оцінку процесів апоптозу на різних стадіях.

Ця задача вирішується наступним чином:

у способі корекції апоптозу лімфоїдних клітин при бронхіальній астмі, що включає активацію апоптозу та його оцінку, згідно корисної моделі, активація апоптозу здійснюється антигістамінними препаратами. В якості антигістамінного препарату використовується, наприклад, дезлоратадин.

Загальними ознаками способу, що заявляється, і прототипу є:

1. активація апоптозу лімфоїдних клітин;
2. оцінка апоптозу.

Відмітною ознакою є те, що активація апоптозу здійснюється антигістамінними препаратами, наприклад, дезлоратадином

Спосіб пояснюється конкретним прикладом його здійснення.

Корекція апоптозу здійснюється *in vivo* з наступним виділенням лімфоїдних клітин (мононуклеарів периферійної крові, тимоцитів, спленоцитів та лімфоцитів) та подальшою комплексною оцінкою апоптозу морфологічним та цитофлуорометричними методами. Цитофлуорометричний аналіз здійснюють з використанням флуоресцентних барвників анексину V та пропідіуму йодиду.

Експериментальні дослідження були проведені на самцях щурів лінії Вістар. У піддослідних тварин була відтворена експериментальна модель бронхіальної астми. Щури були сенсibilізовані внутрішньобрюшинним введенням 0,5мг овалбумину/10мг гідроокису алюмінію в 0,9% стерильному фізіологічному розчині. На 12, 14, 16, та 18 день всі групи були аероалергізовані овалбуміном в дозі 10мг/мл в об'ємі 700см³ з діаметром часточок 10мкм при максимальному розпиленні рідини

0,4мл/хв. протягом 15хв. 3 рази з інтервалом 30хв. за допомогою інгалятора ультразвукового "Муссон-2" [ФГУП "Алмаз", г. Ростов-на-Дону, Росія]. Через 24 години після останнього впливу аерозолі у щурів спостерігались ознаки бронхіальної астми.

Корекцію апоптозу лімфоїдних клітин здійснювали шляхом застосування дезлоратадину ["Epius" \ Шерінг-Плау, США] в дозі 0,07мг/кг маси та фамотидину [КМП, Україна] в дозі 0,6мг/кг маси тіла тварини. Препарати вводили перорально з інтервалом 24 години протягом 10 днів з моменту появи проявів бронхіальної астми. Контрольну групу складали інтактні щури.

У експериментальних тварин після забою під тіопенталовим наркозом забирали тимус, селезінку, периферичні лімфатичні вузли та кров з правої шлуночка серця з подальшим отриманням суспензії клітин. Суспензію мононуклеарів периферійної крові (МНПК) отримували шляхом інкубації гепаринізованої крові при 37°C протягом 1,5 години. Далі відбирали плазму в пробірки, клітини осаджували центрифугуванням при 1500об/хв протягом 5 хвилин із наступною відмивкою фізіологічним розчином та подальшим ресуспендуванням. Суспензії тимоцитів, спленоцитів та лімфоцитів готували за стандартними методиками. Загальну кількість клітин у суспензії підраховували в камері Горяєва. Життєздатність клітин визначали в тесті з трипановим синім.

Методом проточної лазерної цитофлуорометрії (ПЛЦ) визначали експресію апоптотичних маркерів лімфоїдних клітин за допомогою анексину V міченого FITC [виробництва Caltag, США], а також за допомогою флуоресцентного барвника пропідіума йодиду (двохкольорове забарвлення).

Оцінка кінцевих стадій апоптозу (гіперхромність ядер, конденсація й фрагментація хроматину) включала морфологічний метод - забарвлення цитоцентрифужних препаратів за Май-Грюнвальдом-Романовським-Гімзою (МГРГ). Підрахунок клітин проводили за допомогою біокулярного мікроскопу "Биолам РП", [Ломо, Росія]. Комплексна оцінка апоптозу включала відсотковий вміст клітин, що знаходяться в стадії апоптозу. Статистичну оцінку отриманих результатів експерименту проводили за допомогою програми "STATISTICA", використовуючи непараметричні методи статистичних пакетів.

Дослідження, здійснені запропонованим способом, показали наступні результати.

При розвитку алергічного запалення відмічались зміни апоптотичного процесу всіх субпопуляцій лімфоїдних клітин: спостерігали вірогідне збільшення % клітин на ранній стадії та зменшення % клітин на пізній стадії апоптозу. Таким чином, при atopічній бронхіальній астмі збільшувався відсоток клітин, що вступають в апоптоз, але безпосередньо процес програмованої загибелі уповільнювався. Дезлоратадин (Epius) призвів до зменшення % клітин початкової стадії апоптозу до нормальних показників, та вірогідного збільшення % клітин на пізній стадії. Фамотидин зменшив % клітин початкової стадії апоптозу навіть нижче показників в інтактній групі, вірогідно збільшився % клітин на

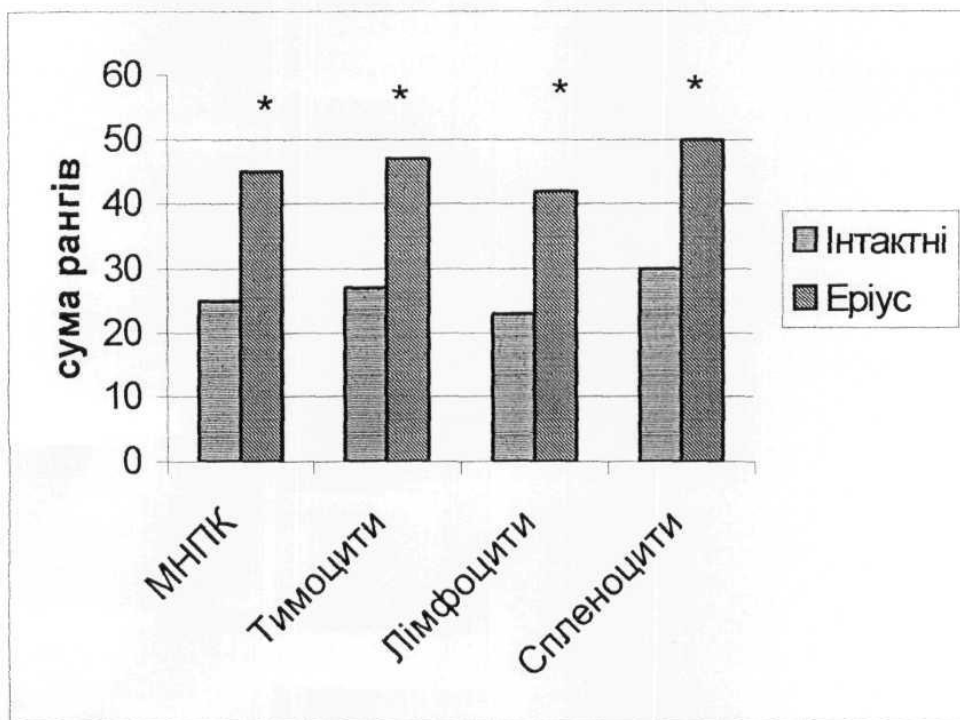
пізній стадії апоптозу.

На діаграмі (Фіг.1) показана індукція апоптозу лімфоїдних клітин після лікування H1-блокатором гістаміну дезлоратадином при бронхіальній астмі.

Зокрема: * - вірогідність відмін при порівнянні з апоптозом при бронхіальній астмі, $p \leq 0,05$.

Результати досліджень дозволяють зробити

висновок про здатність H1- та H2-блокаторів корегувати перебіг апоптотичного процесу всіх субклітинних популяцій лімфоїдних клітин при atopічній бронхіальній астмі. Дія дезлоратадину на апоптоз виявилася більш оптимальною в аспекті регуляції імунологічних процесів.



Фіг. 1