



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 76646

(13) C2

(51) МПК (2006)

G01N 33/15

G01N 1/00

G01N 21/25

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

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ РЕПАРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

1

(21) a200500028

(22) 04.01.2005

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Березнякова Марина Євгенівна, Тюпка Тетяна
Іванівна, Кононенко Надія Миколаївна(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ(56) SU A1 1772748 30.10.92.SU 875282
23.10.81.SU A1 1816989 23.05.93.Зашихин А.Л.,
Селин Я., Агафонов Ю.В. Реактивная перестройка
гладкой мышечной ткани при применении
крупнофракционного облучения рака прямой
кишки. Архив патологии. 1999.- №1, С.26-30.(57) Спосіб оцінки репаративної активності
лікарських засобів у дослідках in vitro, що включає

2

дослідження гістологічних зрізів тканин, який
відрізняється тим, що визначають показники РНК
та ДНК за оптичною щільністю цитоплазми та ядра
відповідно, а репаративну активність оцінюють за
виразом:

$$A_p = \frac{РНК / ДНК_d - РНК / ДНК_k}{РНК / ДНК_d} \cdot 100\%,$$

де A_p - репаративна активність;РНК / ДНК_d - співвідношення оптичної щільності
цитоплазми до ядра у дослідній групі;РНК / ДНК_k - співвідношення оптичної щільності
цитоплазми до ядра у контрольній групі.

Винахід відноситься до фармації та медицини,
зокрема лабораторної діагностики, а саме до
способів оцінки репаративної активності
лікарських засобів при проведенні доклінічних
досліджень.

Травматичні пошкодження з порушенням
цілісності шкіри, такі як опікові травми, інфіковані
рани та виразки різного генезу є найчастішими і
розповсюдженішими видами патологій. У зв'язку з
цим, увага дослідників постійно спрямована на
створювання нових ефективних та нешкідливих
для організму лікарських засобів, які мають
високу репаративну активність.

Відомий планіметричний спосіб оцінки
репаративної активності лікарських засобів за
визначенням змін площі пошкоджених тканин у
динаміці [Доклінічні дослідження лікарських
засобів (методичні рекомендації) за ред. член-кор.
АМН України О.В. Стефанова - К.: Авіцена, 2001р.,
- С.296-297; Фенчин К.М. Заживление ран. - К.:
Здоров'я, 1979. - С.66-67]. Метод полягає в тому,
що площу рани визначають за допомогою
прозорої плівки, на яку наносять контури рани у
різні строки дослідження. Після нанесення плівки

на міліметровий папір визначають площу рани.
Репаративну активність визначають за формулою:

$$A_p = \frac{S_0 - S_t}{S_0} \cdot 100\%,$$

де A_p - репаративна активність; S_0 - початкова площа рани, мм²; S_t - площа рани в день вимірювання t , мм²; t - кількість днів між вимірами.

До недоліків зазначеного способу можна
віднести неможливість його використання для
оцінки репаративної активності лікарських засобів,
які використовують у разі пошкодження тканин
внутрішніх органів, наприклад при виразці шлунку,
ерозії шийки матки та ін.

Відомий також ранотензіометричний спосіб
оцінки репаративної активності лікарських засобів
[Фенчин К.М. Заживление ран. - К.: Здоров'я, 1979.
- С.95-98], який полягає у визначенні міцності
рубця, що виникає при загоєнні післяопераційних
лінійних ран, на які накладені хірургічні шви.
Дослідження проводять за допомогою

(13) C2

(11) 76646

(19) UA

спеціального пристрою -ранотензіометру. Визначають репаративну активності за формулою:

$$A_p = \frac{M_{оп} \cdot 100\%}{M_k} - 100\%,$$

де A_p - репаративна активність;

$M_{оп}$ - міцність шва рани при розриві у дослідній групі;

M_k - міцність шва рани при розриві у контрольній групі.

Недоліком цього способу є обмеженість його використання (тільки при лінійних післяопераційних ранах).

За прототип обраний спосіб оцінки репаративної активності лікарських засобів за цитологічними показниками [Фенчин К.М. Заживление ран. - К.: Здоров'я, 1979. - С.83-85] спосіб передбачає виготовлення гістологічних зрізів пошкодженої тканини за загальноприйнятими методиками та визначення абсолютної та відносної (%) кількості різних цитологічних елементів (фібробластів, макрофагів, нейтрофілів, ендотеліоцитів, тучних клітин) за допомогою мікроскопу у 30 полях зору при збільшенні $\times 600$. Цитологічне дослідження ран у динаміці загоювання (швидкість появи, досягнення максимальної концентрації, зниження активності або повного зникнення у рані окремих клітин) дає об'єктивну інформацію про перебіг процесів репаративної регенерації. Зазначений спосіб можна використовувати як допоміжний для оцінки репаративної активності лікарських засобів. Цей спосіб має значення тільки у разі багаторазового підрахування клітин у різні терміни загоювання, тобто у динаміці ранового процесу.

Завданням винаходу є створення нового способу оцінки репаративної активності лікарських засобів, який завдяки використанню в якості критерію досліджуваної активності відношення показників РНК та ДНК дозволяє достовірно та об'єктивно оцінювати ступінь репаративної активності.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі оцінки репаративної активності лікарських засобів у дослідних *in vitro*, що включає дослідження гістологічних зрізів тканин, згідно з винаходом визначають показники РНК та ДНК за оптичною щільністю цитоплазми та ядра відповідно, а репаративну активність оцінюють за виразом:

$$A_p = \frac{РНК/ДНК_д - РНК/ДНК_к}{РНК/ДНК_д} \cdot 100\%,$$

де A_p - репаративна активність;

$РНК/ДНК_д$ - співвідношення оптичної щільності цитоплазми до ядра у дослідній групі;

$РНК/ДНК_к$ - співвідношення оптичної щільності цитоплазми до ядра у контрольній групі.

Використання показників РНК та ДНК для оцінки ступеня репаративної активності лікарського засобу обумовлене наявністю лінійної залежності між кількістю нуклеїнових кислот і

активністю синтезу білка. Чим більш виражений репаративний процес, тим більша кількість нуклеїнових кислот і тим активніший синтез білка, необхідного для рубцювання (загоєння) рани.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Шматочки пошкодженої тканини фіксують у 10% розчині формаліну протягом 3 діб. Виготовлення зрізів товщиною 5мкм проводять за допомогою мікротому. Оптичну щільність ядра (ДНК) і цитоплазми (РНК) при фарбуванні за Ейнарсоном вимірюють у синьому діапазоні спектру за допомогою спектрофотометру.

Відношення оптичної щільності цитоплазми до оптичної щільності ядра (РНК/ДНК) віддзеркалює білоксинтетичну функцію клітин.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1.

Оцінку репаративної активності за заявленим способом відомих репаративних засобів вивчали на моделі різаних ран. Моделювання різаних ран проводили на 40 білих нелінійних щурах масою 190-200г, які знаходилися на стандартному водно-харчовому раціоні віварію. Усі больові процедури проводили під барбаміловим наркозом (60 мг/кг маси тварини). Тварин розподілили на 4 групи: 1 - нелікований контроль 2 - тварини, яким наносили лінімент бальзамічний за Вишневським; 3 - тварини, яким наносили на рани 10% ксероформну мазь на вазеліновій основі; 4 - тварини, яких лікували маззю "Левоміколь".

На 5 добу експерименту, після евтаназії тварин, вирізали шматочки пошкодженої шкіри і фіксували їх у 10% розчині нейтрального формаліну протягом 3 діб. Гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм виготовляли за допомогою мікротому і забарвлювали за Ейнарсоном. Вивчення мікропрепаратів проводили на мікроскопі Olympus Soft (Version 4.1.). За допомогою спектрофотометру у синьому діапазоні спектру виміряли оптичну щільність клітинних структур: ядра (ДНК) і цитоплазми (РНК). Репаративну активність лікарських засобів визначали за формулою:

$$A_p = \frac{РНК/ДНК_д - РНК/ДНК_к}{РНК/ДНК_д} \cdot 100\%,$$

де A_p - репаративна активність;

$РНК/ДНК_д$ - співвідношення оптичної щільності цитоплазми до ядра у дослідній групі;

$РНК/ДНК_к$ - співвідношення оптичної щільності цитоплазми до ядра у контрольній групі.

Отримані результати експерименту надані у Табл.1.

Результати експерименту свідчать, що серед використаних ранозагоюючих лікарських засобів найбільшу репаративну активність має мазь "Левоміколь". Її репаративна активність (43,2%) в 9,4 рази більше, чим у лініменту бальзамічного за Вишневським (4,6%) і в 1,8 рази більше, чим у групі тварин, яку лікували 10% ксероформною маззю (24,6%).

Таблиця 1

Оцінка репаративної активності відомих лікарських засобів за заявленим способом

Об'єкт дослідження	Оптична щільність клітинних структур, од. опт. щільн.		РНК/ДНК, відн. од.	Репаративна активність, %
	Ядро (ДНК)	Цитоплазма (РНК)		
Контроль	0,139±0,007	0,116±0,005	0,83	-
Лінімент бальзамічний за Вишневським	0,269±0,012*	0,235±0,010*	0,87	4,6
10% ксероформна мазь	0,119±0,008*	0,131±0,010*	1,10	24,6
Мазь "Левоміколь"	0,102±0,006*	0,149±0,011*	1,46	43,2

Примітка. * - $p < 0,05$ відносно контролю.

Результати дослідження свідчать, що заявлений спосіб дає об'єктивну оцінку ступеня репаративної активності досліджених відомих лікарських засобів.

Таким чином, заявлено новий спосіб оцінки репаративної активності лікарських засобів, який може бути використаний при пошкодженнях різних тканин будь-якої етіології і локалізації. Зазначений

спосіб не складний у технологічному плані і дає можливість використовувати його при пошкодженнях шкіри (рани, опіки, язви різного генезу), слизових оболонок порожнини рота, шлунку, шийки матки та ін. Цей спосіб можна рекомендувати також для допоміжного вивчення біопсійного матеріалу.