



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54578 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 33/00
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ НЕФРОПАТІЇ НА ФОНІ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ (В ЕКСПЕРИМЕНТІ)

1

2

(21) u201008491

(22) 07.07.2010

(24) 10.11.2010

(46) 10.11.2010, Бюл.№ 21, 2010 р.

(72) БАЛАБАЙ АЛІНА АНАТОЛІЇВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб оцінки ефективності лікування нефропатії на фоні артеріальної гіпертензії (в експерименті) шляхом проведення морфометричного аналізу

структури нирок до та після лікування бісопрололом та тіотриазолом, який відрізняється тим, що визначають площу ниркових тілець, об'ємну та кількісну щільність, площу і фактор форми цитотрабекул та цитоподій подоцитів; об'єм та кількість останніх у одиниці об'єму ниркового тілця до та після лікування протягом 90 діб, отримані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність лікування.

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до фармакології, кардіології та нефрології і може бути використана для покращення результатів лікування нефропатії на фоні артеріальної гіпертензії.

Артеріальна гіпертензія (АГ) вважається однією із найбільш розповсюджених патологій серцево-судинної системи, яка викликає велику частоту тяжких ускладнень з боку органів-мішеней, зокрема нирок. Механізми формування та прогресування гіпертензивної нефропатії залишаються маловивченими, а структурно-функціональний стан нирок часто визначає особливості перебігу та прогнозу захворювання, тому проблема гіпертензивної нефропатії приваблює дедалі більшу увагу дослідників з точки зору перспективності пошуку ренопротекторної фармакотерапії.

Особливої уваги заслуговує проблема оцінки ефективності лікування нефропатії на фоні артеріальної гіпертензії, як одна з найбільш актуальних у нефрології. Недостатня оцінка ефективності проведеної терапії призводить до того, що збільшується частота розвитку хронічної ниркової недостатності, що в цілому погіршує соціально-економічну ситуацію з артеріальної гіпертензії. Враховуючи це, виникає гостра необхідність впровадження ефективного способу оцінки корекції гіпертензивної нефропатії, що може не тільки уповільнити розвиток морфологічних змін у нирках, а й сприятиме адекватності вибору антигіпертензивної терапії.

Актуальним напрямком сучасної медицини та фармації є впровадження в медичну практику нефропротекторів, які усувають порушення клітинного метаболізму та структурно-функціонального стану нирок, попереджаючи розвиток необоротних змін у нирках. Одним із таких напрямків є сумісне застосування антигіпертензивних препаратів з метаболітними лікарськими засобами. Як антигіпертензивний препарат застосовувався β-адреноблокатор бісопролол, який знижує артеріальний тиск, з метаболітичних препаратів цікавим, з нашої точки зору, є тіотриазолін, що проявляє різнобічну фармакологічну активність і широко застосовується в клінічній практиці для лікування різних захворювань [1; 3].

Для оцінки спрямованості та ефективності дії лікарських засобів був застосований електроноскопічний та морфометричний аналіз структури нирок, що дозволило визначити деякі аспекти впливу вивчених препаратів на процеси, які відбуваються у шурів лінії CICAГ до та після лікування.

Найбільш близьким за технічними характеристиками до способу, що заявляється, є спосіб оцінки впливу бісопрололу та тіотриазоліну з метою корекції АГ в експерименті у шурів лінії CICAГ на кардіоміоцити [4]. Експериментальні шури даної лінії є адекватною моделлю, на якій відтворюються усі ознаки і симптоми серцевих та ниркових ускладнень, притаманних АГ людини [5], тому ці експериментальні тварини використовуються у всьому світі для вивчення ефективності антигіпертензивних засобів. Цей спосіб включає проведення

(13) U
(11) 54578
(19) UA

морфометричного аналізу гістохімічних препаратів до та після лікування бісопрололом та тіотриазоліном та оцінюють ефективність препаратів при нормалізації показників.

Однак цей спосіб має певні недоліки: він має низьку інформативність і малу чутливість, потребує тривалого виконання та незручний у використанні, не враховує вплив препаратів на стан нирок, немає морфологічних досліджень ультраструктури нирок за умов лікування бісопрололом та тіотриазоліном для з'ясування їх ефективності.

Задача, яка вирішується способом, що заявляється, полягає у розробці способу корекції нефропатії на фоні артеріальної гіпертензії в експерименті шляхом призначення лікарського метаболітного препарату тіотриазоліну та антигіпертензивного препарату бісопрололу та встановленні показника, що дозволить проконтролювати ефективність корекції гіпертензивної нефропатії та покращити структурно-функціональний стан нирок за умов артеріальної гіпертензії.

Технічний результат, що досягається, полягає у підвищенні ефективності лікування нефропатії на фоні артеріальної гіпертензії.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, шляхом проведення морфометричних досліджень структури нирок до та після лікування бісопрололом та тіотриазоліном, згідно корисної моделі, визначають площу ниркових тілець, об'ємну та кількісну щільність, площу і фактор форми цитотрабекул та цитоподій подоцитів; об'єм та кількість останніх у одиниці об'єму ниркового тільця до та після лікування протягом 90 діб, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність лікування.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Досліди проводять на 45 експериментальних щурах 6-ти місячного віку, які були розподілені на 3 групи: I група - 17 контрольних щурів нормотензивної лінії WKY (Wistar-Kyoto rats), II група - 15 щурів лінії CISAГ (спадково індукована стресом артеріальна гіпертензія), III група - 13 щурів лінії CISAГ, які одержували бісопролол (20 мг/кг) та тіотриазолін (50 мг/кг). Препарати розчиняють у воді, застосовують *per os* протягом 90 діб, додаючи одноразово щоденно до їжі.

Для визначення якості лікування нефропатії на фоні артеріальної гіпертензії тіотриазоліном та бісопрололом на морфологічний стан нирок здійснюють електрономікроскопічне дослідження шматочків тканини нирок. Фіксацію матеріалу проводять розчином 2,5 % глютарового альдегіду на какодилатному буфері з дофіксацією в 1 % розчині осмієвої кислоти. Зневоднюють у спиртах 70 %, 80 %, 90 %, 100 % концентрації та ацетоні. Заливають у суміш епон-аралдит, згідно загальноприйнятій методиці [2]. Напівтонкі та ультратонкі зрізи з отриманих блоків виготовляють на ультратомах LKB III (Швеція) та Reihart (Швеція). Напівтонкі зрізи забарвлюють метиленовим синім, толуюдиновим синім, основним фуксином та методом Nayat. Ультратонкі зрізи контрастують 2 % розчином уранілацетату та цитратом свинцю. Препарати досліджують під електронними мікроскопами ЕВМ-100БР та ПЕМ-125К. Фотодокументування прово-

дять з використанням фотопластинок «для ядерних досліджень». Об'єктами морфометричного аналізу були: площа ниркового тільця (НТ), підрахована на напівтонких зрізах, забарвлених за Nayat, за допомогою напівавтоматичного пристрою обробки графічних зображень. Для морфометричних досліджень ультраструктурних елементів використовують програму «Органела», розроблену на базі лабораторії електронної мікроскопії Інституту проблем патології при НМУ імені О.О.Богомольця. Визначають об'ємну та кількісну щільність, площу і фактор форми цитотрабекул (ЦТ) та цитоподій (ЦП) подоцитів, а також об'єм та кількість останніх у одиниці об'єму ниркового тільця. Отримані дані оцінюють статистично за параметричним коефіцієнтом Ст'юдента та непараметричним методом Колмогорова-Смірнова за допомогою програмного забезпечення Statistica for Windows 6.0 (Microsoft Corporation, USA) і GraphPad Prizm 4 (GraphPad Software Inc., USA). По кожному із показників обчислюють середнє значення та стандартну похибку для кожної з піддослідних тварин. На цій основі одержували об'єднані показники для кожної групи тварин.

Мікроскопічне дослідження нирки гіпертензивних щурів показало, що застосування бісопрололу та тіотриазоліну у щурів III групи протягом 90 діб не запобігає розвитку комплексу патологічних змін у нирковій структурі. Звертає увагу наявність осередкових набрякових змін у стромі нирок. Клубочки варіюють за розміром, розповсюджені гіпертрофовані гломерули з повнокровними капілярами. Це підтверджується і морфометричним аналізом. Встановлено, що, хоча середня площа зрізу клубочків, яка дорівнює $(522,3 \pm 31,0) \times 10^2 \text{ мкм}^2$, і не досягає контрольної величини, вона значуще перебільшує показник у тварин без лікування (табл.). Аналіз розподілу клубочків за цим показником в свою чергу свідчить, що після фармакотерапії бісопрололом та тіотриазоліном в нирках щурів не спостерігається дрібних, атрофованих клубочків, які були характерні для нелікованих тварин, а кількість крупних форм збільшена.

В окремих клубочках виявляються ділянки збільшення об'єму порожнини капсули, виявляються також ознаки її набряку, ущільнення та склерозування. Проте слід відмітити, що прояви перигломерулярного склерозу та явища фіброblastної проліферації значно менші, ніж у тварин до лікування бісопрололом та тіотриазоліном. У стінці каналців спостерігаються ознаки гідропічної дистрофії, в інтерстиції - набрякові зміни, подібні до змін у гіпертензивних щурів до терапії.

При електрономікроскопічному дослідженні структурних компонентів фільтраційного апарату нефрону гіпертензивних щурів 6-місячного віку, які отримували препарат бісопролол та тіотриазолін в якості гіпотензивного лікування протягом 90 діб, виявлено, що ультраструктурна характеристика нирок виявила кращу збереженість структурних компонентів у порівнянні із гіпертензивними щурами до лікування.

Привертає увагу краща збереженість будови подоцитів та їх відростків, хоча і присутні окремі групи клітин із ознаками дистрофічних змін. Подоцити містять велике ядро круглої форми із інвагі-

націями нуклеоплазми та переважанням еухроматину. Цитоплазма нерівномірної електронної щільності, ознаки набряку не спостерігаються, в ній визначаються органели з ознаками активних біосинтетичних процесів. Спостерігається велика кількість дрібних круглих мітохондрій в тілі подоцитів переважно однотипної ультраструктурної будови.

До позитивного впливу бісопрололу та тіотриазоліну на енергетичний апарат подоцитів можна віднести добру збереженість зовнішньої мембрани мітохондрій, появу концентрично розташованих крист, ділянок, де чітко розрізняються кристи та міжкристний простір. Зустрічаються також органели з ознаками набряку та гіпертрофії з локально лізованим матриксом, проте у меншій кількості ніж у експериментальних тварин до лікування. Відмічаються поодинокі зруйновані мітохондрії із просвітленим матриксом, залишками крист і розшаруванням зовнішньої мембрани. Вміст електроннощільного матеріалу по типу мієліноподібного перетворення у подоцитах не виявлений в жодному спостереженні. Ендоплазматична сітка та комплекс Гольджі функціонально активні, про що свідчать їх розширені каналці. Після терапії в подоцитах спостерігається більша, ніж у нелікованих тварин, кількість рибосом та полісом.

Краща збереженість ультраструктурної будови спостерігається і у відростках подоцитів. Цитотрабекули майже не містять органел, цитоподії щільно прилягають основою до гломерулярної базальної мембрани, у фільтраційних щілинах між якими містяться діафрагми.

Зміни цитоподій подоцитів представлені вогнищевим злиттям ніжкових відростків на гломерулярній базальній мембрані, при чому діафрагми у фільтраційних щілинах в таких випадках відсутні. Слід відмітити, що відкладання міозину спостерігається у значно меншій кількості у цитотрабекулах і цитоподіях, ніж у щурів СІСАГ до лікування. Ділянки відшарування цитоподій взагалі не реєструються.

Морфометричний аналіз показав, що площа цитотрабекул та цитоподій в нирках лікованих гіпертензивних щурів дорівнюють $573 \pm 11 \times 10^{-2}$ мкм² та $13,43 \pm 0,48 \times 10^{-2}$ мкм відповідно, і статистично не відрізняються від аналогічних показників в контролі (табл.). Статистично однотипними залишаються і показники об'ємної та кількісної щільностей цитотрабекул і цитоподій (табл.). Тобто, не дивлячись на присутність локальних пошкоджень ультраструктури гломерул, можна припустити, що їх поширеність не настільки значна, щоб позначитися на кількісних показниках.

Таблиця 1

Кількісні показники, що характеризують подоцити у нирках 6-ти місячних щурів з артеріальною гіпертензією та після лікування її бісопрололом (Б) та тіотриазоліном (Т).

	Площа НТ * 10 ⁻² мкм ²	Об'ємна щільність ЦТ, %	Кількісна щільність ЦТ, * 10 ⁻² /мкм ³	Площа ЦТ 10 ⁻² мкм ²	Фактор форми ЦТ
Контроль	608,7±29,1	11,12±1,9	1,35±0,14	585±16*	0,53±0,02
АГ	375,5±37,8*	9,70±1,1	1,31±0,39	657±10	0,58±0,01
Б+Т	522,3±31,0*	10,39±2,42	1,16±0,57	573±11	0,59±0,01*
Контроль	608,7±29,1	3,19±0,39	63,9±8,7	11,51±0,37	0,51±0,01
АГ	375,5±37,8*	4,16±0,23	65,1±7,6	15,32±0,51*	0,43±0,01
Б+Т	522,3±31,0*	3,74±0,35	55,9±5,3	13,43±0,48	0,49±0,01

У гломерулярній базальній мембрані щурів, які отримували бісопролол та тіотриазолін, спостерігаються позитивні зміни після лікування, для неї не характерні ділянки значного потовщення і розшарування структури, яке було притаманне щурам із АГ, спостерігається її нормальна трьошарова будова і товщина, як у нормотензивних щурів.

Структурні особливості гломерулярних гемокapілярів полягають у переважанні судин із збільшеним діаметром просвіту. Вони вистелені стоншеним ендотелієм, при чому зустрічаються як діафрагмовані, так і недіафрагмовані фенестри, що чергуються з вип'ячуваннями цитоплазми у вигляді мікроклазматозних виростів. Клітини мають овальні ядра з переважанням еухроматину, також зустрічаються ядра неправильної форми, яку надають численні інвагінації нуклеарної оболонки, в яких переважає гетерохроматин. У парануклеарній зоні і в периферійних ділянках ендотеліоцитів розташовуються мітохондрії різної форми і величини та гетерогенні за своєю ультраструктурою. Частина мітохондрій містить добре структуровану зовнішню мембрану, чіткі кристи та електроннопрозорий матрикс. Канальці гранулярної

ендоплазматичної сітки і комплексу Гольджі розширені, лізосоми майже не зустрічаються.

Явища набряку, які були характерними для гіпертензивних щурів, не спостерігаються у цій групі спостереження. Варіює і вміст просвіту у різних клубочкових гемосудинах, у деяких капілярах він прозорий, у інших - заповнений дрібнодисперсним матеріалом середньої електронної щільності. Подекуди у просвіті спостерігаються форменні елементи крові, відшарування частин ендотеліоцитів до просвіту капіляру майже не реєструється. Їх кількість незначна, в інших - периферійні зони містять достатню кількість мікропіноцитозних везикул, що є ознакою активного трансендотеліального транспорту речовин.

Таким чином, сумісне застосування бісопрололу та тіотриазоліну здійснює позитивний вплив на фільтраційний апарат клубочка нирок за умов гіпертензивної нефропатії. Запропонований метод досить точний для оцінки ефективності лікування гіпертензивної нефропатії бісопрололом та тіотриазоліном в експерименті і може бути рекомендований для оцінки ефективності лікування іншими лікарськими засобами.

Використана література:

1. Геруш О.В. Тіотриазолін і функціональний стан нирок / О.В. Геруш, І.В. Геруш // «ХИСТ» Все-укр. мед. журн. молодих вчених. - 2005. - №7. - С.87.

2. Карупу В.Я. Электронная микроскопия / В.Я. Карупу // Киев: Вища школа, 1984.-208 с.

3. Мазур И.А. Метаболитотропные препараты / И.А. Мазур, И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев и соавт. // - Запорожье. - 2007. - 309 С;

4. Патент України №41328, А61К33/00, А61К36/00, G01N15/00. Спосіб оцінки ефективності лікування артеріальної гіпертензії (в експерименті) / Р.С. Довгань, Л.О. Стеченко, Т.П. Куфтирева, І.С. Чекман - Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. Опубл.12.05.2009, Бюл. № 9, 2009 р.

5. Zhou X. Analogy oh cardiac and renal complications in essential hypertension and aged SHR- or L-NAME/SHR / X. Zhou, E. D. Frohlich // Medical chemistry. - 2007. – Vol.3-P.61-65.