



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113258** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)

**G01N 23/223** (2006.01)

**A61K 31/00**

**G09B 23/28** (2006.01)

**A61N 5/10** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2016 06455</b>	(72) Винахідник(и): <b>Ільницька Христина Михайлівна (UA), Новіков Володимир Павлович (UA), Склярів Олександр Якович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>13.06.2016</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.01.2017</b>	(73) Власник(и): <b>ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.01.2017, Бюл.№ 2</b>	

## (54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ РАДІОПРОТЕКЦІЇ СЛИЗОВИХ ОБОЛОНОК ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

### (57) Реферат:

Спосіб підвищення радіопротекції слизових оболонок органів травлення у експериментальних тварин, що включає використання радіопротекторної сполуки. Експериментальним тваринам вводять похідне 1,4-нафтохінону-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-аміноіл]бутиратну кислоту у дозі 30 мг/кг внутрішньошлунково, два рази на тиждень протягом двадцяти днів на тлі дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення у щодобовій дозі 1 сГр та при поєднанні впливу низькоінтенсивного рентгенівського опромінення і водно-іммобілізаційного стресу.

UA 113258 U



Корисна модель належить до галузі медицини та біохімії і може використовуватись для корекції терапії захворювань, викликаних радіаційним ураженням.

Хронічне радіаційне опромінення організму людини на сьогоднішній день пов'язане не тільки з наслідками Чорнобильської катастрофи та техногенними аваріями на інших атомних електростанціях (Фукусіма, Японія), а також з застосуванням радіаційної терапії, у першу чергу, хворих з раком, та широким використанням апаратури, що випромінює  $\gamma$ -промені за умов професійної діяльності певної категорії людей, що є фактором ризику розвитку патологічних процесів. Променева терапія останніми роками є однією з базових при лікуванні хворих з різними онкологічними захворюваннями. Її застосовують при лікуванні пацієнтів з локалізацією раку у шлунково-кишковому тракті, сечовидільній системі та малого таза. При застосуванні радіаційної терапії були відзначені чисельні негативні побічні ефекти зі сторони органів травної системи: розвиток виразки шлунка, кровотечі у тонкій кишці, виникнення свища, обструктивних змін. При застосуванні променевої терапії виникають негативні побічні наслідки у вигляді радіаційного ентериту або коліту у 50-70 % хворих [Andreyev J. Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patient./Andreyev J.//Lancet Oncol/-2007.-Vol.8-N 11.P. 1007-1017].

Дія радіаційного опромінення на епітеліоцити слизової оболонки органів травлення, які є надзвичайно чутливими до опромінення, викликає прямий цитотоксичний ефект, пов'язаний з розвитком нітратно-окисативного стресу, що супроводжується порушенням слизового бар'єру, гальмуванням процесів росту та диференціації. Часто радіаційне опромінення поєднується з дією іншого ульцерогенного фактора - стресу, який викликає розвиток деструктивних ушкоджень слизової оболонки органів травлення. Механізм дії стресу обумовлений різким зростанням у крові адреналіну, який викликає вазоконстрикцію, і, як наслідок, гіпоксію та розвиток ерозій і виразок у слизовій оболонці травних органів на тлі різкого зростання продукції активних радикалів. Домінуючим фактором у механізмі впливу стресу є дія катехоламінів, які, зменшуючи рівень локального кровоплину, призводять до зростання рівня нітратно-окисативних процесів. За умов стресу підвищується синтез прозапальних цитокінів та продукція простагландину  $E_2$ , що призводить до підвищення процесів ліпопероксидації, продукції активних радикалів нітрогену оксиду, порушення цілісності мембран клітин та кровоносних судин, інфільтрації слизової оболонки нейтрофілами. Вплив стресу на тлі радіаційного опромінення часто спостерігався у ліквідаторів Чорнобильської катастрофи, і на сьогоднішній день їх одночасний вплив обумовлений виконанням професійної діяльності людини та впливом ряду факторів, що оточують людину.

Важливу роль у регуляції нормального функціонування органів травної системи, як за умов норми, так і при патології, відіграють: система NO-синтаза / нітрогену оксиду (NO), процеси ліпопероксидації та ензими антиоксидантного захисту. За фізіологічних умов постійно здійснюється експресія конститутивних форм NO-синтази (NOS) системи - NOS-нейрональної (nNOS) та ендотеліальної (eNOS). NO регулює процеси секреції, моторику, всмоктування, кровоплин, бере участь у підтриманні структури та функції слизового бар'єру, процесах міжклітинної інтеграції, передачі інформації у неадренергічних нехолінергічних нейронах. За умов розвитку дії радіаційного опромінення та виразкових ушкоджень, зокрема зумовлених дією стресових чинників, відзначається різке зростання експресії індукційної NO-синтази (iNOS) та, як наслідок, підвищення продукції NO. Найближчим аналогом запропонованого способу вибрано спосіб зниження радіаційного ураження організму та зниження нітратно-окисативних процесів шляхом застосування лікопіну - біологічно активної речовини, отриманої з томатів [Islamian P.J. Lycopene as a carotenoid provides radioprotectant and antioxidant effects by quenching radiation-induced free radical singlet oxygen: an overview./ Islamian P.J., Mehrali H. //Cell J.-2015. -Vol. 16. -N 4. -P. 386-391]. Останній проявляв протизапальну та радіопротекторну дію на слизову оболонку органів травлення у експериментальних тварин шляхом зниження рівня окисативного стресу. Недоліком цього способу є недостатній цитопротекторний вплив застосовуваної сполуки та не визначена її дія на систему NO-синтаза - NO у слизових оболонках органів травлення за умов дії стресу на тлі низькоінтенсивного рентгенівського опромінення.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу підвищення радіопротекції слизових оболонок органів травлення у експериментальних тварин шляхом зниження рівня нітратно-окисативних процесів за умов дії стресу та низькоінтенсивного рентгенівського опромінення із застосуванням протизапальної сполуки, яка проявляє як протизапальну, так і радіопротекторну дію.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб підвищення радіопротекції слизових оболонок органів травлення у експериментальних тварин, що включає використання

радіопротекторної сполуки, згідно з корисною моделлю, експериментальним тваринам вводять похідне 1,4-нафтохінону-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-аміноіл]бутиратну кислоту у дозі 30 мг/кг внутрішньошлунково, два рази на тиждень протягом двадцяти днів на тлі дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення у щодобовій дозі 1 сГр та при поєднанні впливу низькоінтенсивного рентгенівського опромінення і водно-іммобілізаційного стресу.

Корисну модель виконують наступним чином.

Експериментальним тваринам (щурам), з дотриманням міжнародних вимог щодо проведення дослідів, вводять похідний 1,4-нафтохінону-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-аміноіл]бутиратну кислоту, яка сприяє зниженню нітрозоксидативних процесів, в дозі 30 мг/кг перорально два рази на тиждень протягом двадцяти днів на фоні дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення у сумарній дозі 20 сГр та за умов поєданого впливу низькоінтенсивного рентгенівського опромінення та водно-іммобілізаційного стресу, викликаного 5-годинним знаходженням фіксованих у боксах тварин (щурів) у воді.

Для створення та підтвердження ефективності пропонованого способу були проведені експериментальні дослідження. Тварини були розділені на 4 групи (нелінійні щури, по 8 особин в кожній групі): перша група - тварини контрольної групи, друга група - тварини, яких упродовж 20 діб опромінювали у щодобовій дозі 1 сГр на апараті РУМ-17 (сумарна доза становила 20 сГр) [Дацюк Л.О. Ефект введення неселективного інгібітора NO-синтази за умов низькоінтенсивного рентгенівського опромінення /Л.О. Дацюк, Ю.В. Перетятко, У.В. Старенко [та ін.] // Біологічні студії. -2009. - Т.3. - № 3. - С.51-58]; третя група - тварини, яких піддавали дії водно-іммобілізаційного стресу (BIC) протягом п'яти годин [Fomenko I. Effects of conventional and hydrogen sulfide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rats with stress-induced and epinephrine-induced gastric damage /I. Fomenko, A. Sklyarov, T. Bondarchuk [et al.] //Stress.-2014. - Vol. 17. -№ 6. -Р. 528-537] на 20-й день після закінчення дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення у сумарній дозі 20 сГр; четверта група - тварини, яким два рази на тиждень внутрішньошлунково вводили у дозі 30 мг/кг на тлі опромінення протягом двадцяти днів похідний 1,4-нафтохінону-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-аміноіл]бутиратну кислоту; п'ята група - тварини, яких піддавали дії BIC на тлі дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення (сумарна доза 20 сГр) та введення похідного 1,4-нафтохінону. На двадцяті добу експерименту тварин декапітували під тиопенталовим наркозом, розкривали черевну порожнину, розрізали шлунок, тонку та товсту кишки, промивали їх фізіологічним розчином і проводили макроскопічну оцінку ступеня ушкодження.

Для оцінки стану NO-синтазної (NOS) системи в гомогенатах слизових оболонок органів травлення (шлунка, тонкої та товстої кишки) визначали активність NO-синтаз [Раваева М.Ю., Чуян Е.Н. Изменения активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения. Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия".- 2011. -Том 24(63). - № 4. -С. 201-210], аргінази [Geyer J.W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates //Anal. Biochem. -1971. - Vol. 39, № 2.-412-417], вміст нітрит-аніону [Green L.C. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids /L.C. Green, A.W. David//Anal. Biochem. -1982.-Vol. 126. -P. 131-138]. Процеси ліпопероксидації аналізували за вмістом продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) [Тимурбулатов М.А., Селезнев Е.И. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение //Лабораторное дело. -1981. - № 4. -С. 209-211], активність мієлопероксидази [Bradley P.P. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation /Bradley P.P., Christensen R.D., Rothstein G. //Blood. -1982. -№ 60. -P. 618-622], активність ензимів антиоксидантного захисту - супероксиддисмутази (СОД) [Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте /С. Чевари, Т. Андял, Я. Штрэнгер //Лабораторное дело. -1991. -№ 10. -С. 9-13] та каталази [Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л. И. Иванова, И.Г. Майорова [та ін.] //Лабораторное дело. -1988. -№ 1. -С. 16-19].

Сумарне рентгенівське опромінення у дозі 20 сГр на 20-й день викликало, порівняно з показниками контрольних тварин, зростання процесів перекисного окислення ліпідів: вміст ТБК-активних продуктів у слизовій оболонці шлунка (СОШ) збільшився на 41 % ( $p<0,05$ ), у слизовій оболонці тонкої кишки (СОТнК) - на 16 % ( $p<0,05$ ), у слизовій оболонці товстої кишки (СОТвК) - на 20 % ( $p<0,05$ ); паралельно зростала у досліджуваних органах: активність мієлопексидози (МПО) - на 46 %, 42 % та на 270 %, відповідно; активність індукційної NO-синтази (iNOS) (на 101 %, 362 % та 94 %, відповідно) та вміст нітрит-аніону (на 41 %, 13 % та 14 %, відповідно).

Активність конститутивної NO-синтази (cNOS) та аргінази достовірно не змінювалась, при цьому активність каталази зростала у всіх органах, активність СОД достовірно зростала тільки у СОШ (Табл. 1).

- 5 Вплив стресу на тлі рентгенівського опромінення призводив до тенденції зростання рівня ТБК-активних сполук у всіх досліджуваних органах, активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази достовірно не змінювались, тоді як активність МПО достовірно зростала у СОШ та СОТнК, у СОТвК - мала тенденцію до зростання, у порівнянні з даними дії рентгенівського опромінення. Слід відзначити, що за умов дії стресу на тлі рентгенівського опромінення виражено зростала активність iNOS, тоді як активність cNOS, вміст нітрит-аніону та активність
- 10 аргінази достовірно не змінювались у порівнянні з показниками при дії рентгенівського опромінення.

Таблиця 1

Вміст ТБК-активних продуктів та активність СОД, каталази та мієлопероксидази у СОШ, СОТнК та СОТвК при дії похідного 1,4-нафтохінону на тлі рентгенівського опромінення та дії стресу

Серії дослідів	Відділи травної системи	ТБК-активні продукти, мкмоль/г·л	Активність СОД, мкмоль НСТ/хв·мг білка	Активність каталази, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв·мг білка	Активність МПО, ум.од.
Тварини контрольної групи	СОШ	209,9±6,36	21,6±2,1	12±2,6	1,36±0,67
	СОТнК	212,7±16,8	20,3±4,1	19,05±1,63	1,68±0,62
	СОТвК	219,1±19,02	18,6±1,5	19,7±2,0	0,96±0,29
Рентгенівське опромінення	СОШ	256,9±14,9*	34,7±1,83 <sup>#</sup>	17,1±4,17	3,18±0,96*
	СОТнК	246,8±10,6*	22,4±1,88	26,4±4,6*	3,87±0,99*
	СОТвК	264±12,1*	20,8±1,6	24,6±3,33*	2,6±0,78*
Рентгенівське опромінення + стрес	СОШ	293,1±14,9	28,5±4,32	25,9±0,65 <sup>#</sup>	7,3±1,2 <sup>#</sup>
	СОТнК	272,6±5,2	23,4±0,25	20,3±2,94	6,65±1,1 <sup>#</sup>
	СОТвК	305,1±14,0	24,2±0,45	26,1±0,45	4,43±0,7 <sup>#</sup>
Рентгенівське опромінення + похідний 1,4 - нафтохінону	СОШ	247,8±27,5	28,6±1,84 <sup>#</sup>	25,4±1,38 <sup>#</sup>	4,83±1,43 <sup>#</sup>
	СОТнК	234,8±13,0	30,9±1,77 <sup>#</sup>	24,4±4,66	7,32±0,81 <sup>#</sup>
	СОТвК	252,8±12,6	18,1±1,22 <sup>#</sup>	32,6±2,63 <sup>#</sup>	3,28±0,68
Рентгенівське опромінення + похідний 1,4 - нафтохінону + стрес	СОШ	253,6±10,0 <sup>^</sup>	27,7±2,17	26,5±1,33	5,0±1,16 <sup>^</sup>
	СОТнК	224,6±19,8 <sup>^</sup>	29,7±1,5 <sup>^</sup>	18,4±1,94	5,48±0,74
	СОТвК	272,8±10,9 <sup>^</sup>	21,7±2,54	28,8±3,78	3,58±0,56

Примітка: \* - у порівнянні з контролем; <sup>#</sup> - у порівнянні з показниками за умов рентгенівського опромінення;

<sup>^</sup> - у порівнянні з показниками за умов рентгенівського опромінення та стресу.

- 15 Дія похідного 1,4-нафтохінону на тлі опромінення (Табл. 2) знижувала активність iNOS на 48 % (p<0,05) у СОШ, на 77 % (p<0,05) у СОТнК та 25 % (p<0,05) у СОТвК; викликала тенденцію до зниження вмісту ТБК-активних продуктів у СОШ та СОТнК, тоді як у СОТвК їх вміст зменшувався на 17 %, та тенденція до зростання активності МПО у всіх органах, активність каталази у СОШ зростала на 49 %, у СОТнК - достовірно не змінювалась, у СОТвК - підвищувалась на 33 %. Активність СОД у СОШ та СОТвК мала тенденцію до зниження, тоді як
- 20 у СОТнК зростала на 38 %.

Таблиця 2

Активність ізоформ NO-синтази, аргінази та вміст нітрит-аніону у СОШ, СОТнК та СОТвК при дії похідного 1,4-нафтохінону на тлі рентгенівського опромінення та дії стресу

Серії дослідів	Відділи травної системи	Активність iNOS, нмоль/хв·мл	Активність cNOS, нмоль/хв·мл	Активність аргінази, мкмоль/хв·мг білка	Вміст нітрит-аніону, мкмоль/л
Тварини контрольної групи	СОШ	124,7±27,1	536±62,5	0,24±0,02	15±1,5
	СОТнК	55,4±15,7	661,4±29,7	0,27±0,02	17,8±1,2
	СОТвК	63,1±26,7	602±102,1	0,24±0,02	17,6±1,2
Рентгенівське опромінення	СОШ	251,1±28,7*	624,5±48,1	0,19±0,01	21,2±0,64*
	СОТнК	200,3±39,9*	610,2±57,5	0,22±0,02	20,2±1,3*
	СОТвК	119,2±13,1	649,9±47,5	0,26±0,03	20,1±1,3*
Рентгенівське опромінення + стрес	СОШ	286,8±14,4	580,4±40,3	0,18±0,01	22,6±1,2
	СОТнК	366,9±12,1#	637,4±34,6	0,19±0,03	21,5±0,5
	СОТвК	318,8±24,4#	575,2±12,5	0,21±0,02	21,1±0,8
Рентгенівське опромінення + похідний 1,4-нафтохінону	СОШ	129,7±11,7#	553,9±47,2	0,21±0,02	18,8±0,9
	СОТнК	45,2±21,4#	555,4±53,1	0,28±0,04	19,2±1,22
	СОТвК	87±15,7#	693,2±37,7	0,28±0,03	19,7±1,0
Рентгенівське опромінення + похідний 1,4 - нафтохінону + Стрес	СОШ	102,1±37,4 <sup>^</sup>	592,7±58,3	0,22±0,03	18,1±0,9
	СОТнК	113,1±11,9 <sup>^</sup>	597,8±53,7	0,21±0,03	19,8±1,04
	СОТвК	114,9±11,2 <sup>^</sup>	589,4±78,8	0,24±0,02	18,8±0,75

Примітка: \* - у порівнянні з контролем; # - у порівнянні з показниками за умов рентгенівського опромінення; <sup>^</sup> - у порівнянні з показниками за умов рентгенівського опромінення та стресу.

Отже, застосування похідного 1,4-нафтохінону як на тлі впливу рентгенівського опромінення, так і за умов поєднаного впливу низькоінтенсивного рентгенівського опромінення та водно-іммобілізаційного стресу виявило його антиоксидантну та радіопротекторну дію.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб підвищення радіопротекції слизових оболонок органів травлення у експериментальних тварин, що включає використання радіопротекторної сполуки, який **відрізняється** тим, що експериментальним тваринам вводять похідне 1,4-нафтохінону-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідроксифеніл)-1,4-діоксо-1,4-дигідронафтален-2-аміноіл]бутиратну кислоту у дозі 30 мг/кг внутрішньошлунково, два рази на тиждень протягом двадцяти днів на тлі дії низькоінтенсивного рентгенівського опромінення у щодобовій дозі 1 сГр та при поєднанні впливу низькоінтенсивного рентгенівського опромінення і водно-іммобілізаційного стресу.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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