



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **98023** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 31/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2014 12692	(72) Винахідник(и):	Струтинський Руслан Борисович (UA), Мойбенко Олексій Олексійович (UA), Нагібін Василь Сергійович (UA), Ягупольський Юрій Львович (UA)
(22) Дата подання заявки:	26.11.2014	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ НАНУ, вул. Богомольця, 4, м. Київ-24, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.04.2015		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.04.2015, Бюл.№ 7		

(54) СПОСІБ ПОПЕРЕДЖЕННЯ АПОПТОЗУ ТА НЕКРОЗУ ЗА АНОКСІЇ-РЕОКСИГЕНАЦІЇ ІЗОЛЬОВАНИХ НЕОНАТАЛЬНИХ КАРДІОМІОЦИТІВ

(57) Реферат:

Спосіб попередження апоптозу та некрозу за аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів включає відкривання АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран. В середовище інкубації вводять новий вітчизняний фторвмісний активатор вищезазначених каналів флокалін в дозі 5 мкмоль/л за дві хвилини до аноксії, що призводить до розвитку кардіопротекторних реакцій, які полягають у значному зменшенні процесів некрозу та повному запобіганні загибелі клітин через апоптоз.

UA 98023 U

Корисна модель належить до фізіології, патологічної фізіології та медицини, а саме до кардіології. Вона може бути застосована для попередження та лікування захворювань серця ішемічної природи.

Відомі способи попередження загибелі кардіоміоцитів шляхом апоптозу та некрозу 5 основуються на зменшенні перенавантаження матриксу мітохондрій іонами Ca^{2+} та пригніченні утворення вільних радикалів, попередженні відкривання мітохондріальної пори та інгібуванні звільнення цитохрома c, активації білка BCL₂ та інгібуванні білка Вах, що індукуює апоптоз, активації АТФ-чутливих калієвих (K_{ATP}) каналів та інші [1-3].

Найближчим до корисної моделі, що заявляється, є спосіб [4], в якому як лікарський засіб 10 використовують активатор K_{ATP} каналів діазоксид. Недоліком цього способу є висока токсичність останнього та можливі ускладнення, пов'язані зі зменшенням звільнення з панкреатичних β -клітин інсуліну та високою вірогідністю розвитку цукрового діабету.

Задачею корисної моделі, що заявляється, є розробка ефективного способу попередження 15 загибелі клітин шляхом апоптозу та некрозу за аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів шляхом застосування нового вітчизняного фторвмісного активатора K_{ATP} каналів флокаліну [5], перевагою якого порівняно з вищезазначеним способом [4] є менші середньо-ефективні дози, значно менша токсичність та відсутність змін у вуглеводному обміні за їх використання у терапевтичних дозах [5, 6].

Технічним результатом корисної моделі, що заявляється, є розвиток захисних 20 кардіопротекторних механізмів, що полягає у попередженні розвитку таких механізмів загибелі клітин, як апоптоз та некроз за експериментальної аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів.

Суть корисної моделі, що заявляється, полягає в тому, що в ній застосовують новий 25 вітчизняний фторвмісний активатор K_{ATP} каналів флокалін (N-(4-дифторометоксифеніл)-N'-пінаколіл-N''-ціаногунідин) шляхом дослідження його кардіопротекторного ефекту в експериментах з аноксією-реоксигенацією ізольованих неонатальних кардіоміоцитів та встановлюють, що він є потужним кардіопротектором, який зменшує процеси некрозу та повністю запобігає розвитку апоптозу, що був індукований аноксією-реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів.

Отримання кардіопротекторного ефекту відбувається за рахунок відкривання K_{ATP} каналів 30 сарколемальної та мітохондріальної мембран кардіоміоцитів за допомогою нового вітчизняного засобу флокалін.

Даний спосіб реалізується наступним чином. Новий вітчизняний фторвмісний активатор K_{ATP} 35 каналів флокалін вводять в середовище інкубації в дозі 5 мкмоль/л за 2 хв. до початку аноксії.

Приклад. Дослідження такого механізму кардіопротекторної дії нового вітчизняного 40 відкривача K_{ATP} каналів флокаліну, як попередження розвитку апоптозу та некрозу кардіоміоцитів, проводились в експериментах з аноксією (30 хв.) та реоксигенацією (60 хв.) ізольованих неонатальних кардіоміоцитів щурів.

Корисна модель реалізується при введенні в інкубаційне середовище флокаліну в дозі 5 40 мкмоль/л за 2 хв. до початку аноксії.

В експериментах на культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів показано, що при 45 відтворенні експериментальної аноксії протягом 30 хв. та наступної 60-ти хвилинної реоксигенації в культурі кардіоміоцитів відбуваються патологічні процеси, які спричиняють активацію процесів некрозу та апоптозу. Відповідно до цього зменшується співвідношення живих клітин до некротичних та апоптотичних (табл. 1 та 2, фіг. 1). Так кількість живих кардіоміоцитів в серії експериментів з аноксією-реоксигенацією відносно контрольних зменшувалась на $15,88 \pm 1,83$ % ($n=9$, $P<0,05$). Некротичних та апоптотичних збільшувалась у 2,83 рази ($n=9$, $P<0,05$) та на $55,56 \pm 4,85$ % ($n=9$, $P<0,05$) відповідно (див. табл. 2).

Таблиця 1

Вплив флокаліну (5 мкмоль/л) на співвідношення (в %) живих, некротичних та апоптотичних клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії-реоксигенації (A-P), ($M \pm m$)

№	Умови експерименту	Живі клітини	Некротичні клітини	Апоптотичні клітини
1	Контроль, ($n=8$)	$88,04 \pm 0,96$	$5,75 \pm 0,81$	$6,21 \pm 0,48$
2	Аноксія-реоксигенація, ($n=9$)	$74,06 \pm 1,97^*$	$16,27 \pm 1,43^*$	$9,66 \pm 1,35^*$
3	Флокалін +A-P, ($n=9$)	$88,13 \pm 0,99^{**}$	$7,90 \pm 0,81^{**}$	$3,97 \pm 0,43^{***}$

Примітки: * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з аноксією-реоксигенацією

Таблиця 2

Розрахункові показники впливу флокаліну (5 мкмоль/л) на співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії-реоксигенації (А-Р), ($M \pm m$), * $P < 0,05$

№	Розрахункові показники	Живі клітини	Некротичні клітини	Апоптотичні клітини
1	А-Р проти контролю	$\downarrow 15,88 \pm 1,83 \%$ *	$\uparrow 2,83$ рази *	$\uparrow 55,56 \pm 4,85 \%$ *
2	Флокалін + А-Р проти контролю	Зміни практично відсутні	$\uparrow 1,37$ рази*	$\downarrow 36,07 \pm 4,02 \%$ *
3	Флокалін + А-Р проти А-Р	$\uparrow 19,0 \pm 1,82 \%$ *	$\downarrow 2,06$ рази*	$\downarrow 2,43$ рази *

Додавання в середовище інкубації флокаліну призводило до зсуву співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин у бік живих, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних експериментів без аноксії-реоксигенації (див. табл. 1, фіг. 1) та був вищим на $19,0 \pm 1,82 \%$ ($n=9$, $P < 0,05$) порівняно до експериментів з відтворенням аноксії-реоксигенації без введення флокаліну (див. табл. 2).

Таким чином, використання останнього запобігає збільшенню загальної смертності клітин під час аноксії-реоксигенації та приводить до зменшення процесів некрозу та апоптозу у 2,06 та 2,43 рази ($n=9$, $P < 0,05$) відповідно (див. табл. 2). Водночас спостерігається деяка зміна у механізмах загибелі клітин (фіг. 2). Зокрема, якщо при введенні флокаліну експериментальна аноксія-реоксигенація посилювала процеси некрозу порівняно з контрольними експериментами (у 1,37 рази), то процеси апоптозу флокалін пригнічував настільки, що кількість апоптотичних кардіоміоцитів була на $36,07 \pm 4,02 \%$ ($n=9$, $P < 0,05$) нижчою, ніж у контрольних експериментах (див. табл. 2). Тобто він повністю запобігав розвитку апоптозу, що був індукований аноксією-реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів (фіг. 2).

Отже, в експериментах на культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів вперше показано, що додавання в середовище інкубації флокаліну в дозі 5 мкмоль/л за дві хвилини до аноксії-реоксигенації спричиняє зсув співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин в бік живих, відсоток яких практично не відрізнявся від контрольних експериментів. Флокалін у два рази зменшував процеси некрозу та повністю запобігав розвитку апоптозу, що був індукований аноксією-реоксигенацією неонатальних кардіоміоцитів.

Таким чином, опираючись на попередження загибелі кардіоміоцитів шляхом апоптозу та некрозу при відкриванні K_{ATP} каналів клітинних мембран за допомогою флокаліну в експериментах з аноксією-реоксигенацією ізольованих неонатальних кардіоміоцитів слід вважати, що даний спосіб можна успішно використовувати для попередження /або лікування/ захворювань ішемічної природи.

Джерела інформації:

1. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца // Под редакцией Мойбенко А.А. Наукова думка, Київ. - 2008, 518 с.

2. Alizadeh AM, Faghihi M, Khor V, Sohanaki H, Pourkhalili K, Mohammadghasemi F, Mohsenikia M. Oxytocin protects cardiomyocytes from apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat heart: role of mitochondrial ATP-dependent potassium channel and permeability transition pore. // Peptides. 2012. - 36. - № 1-P. 71-77.

3. Liu D., Lu C., Wan R., Auyeung W.W., Mattson M.P. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. - 2002. - 22, № 4. - P. 431-443.

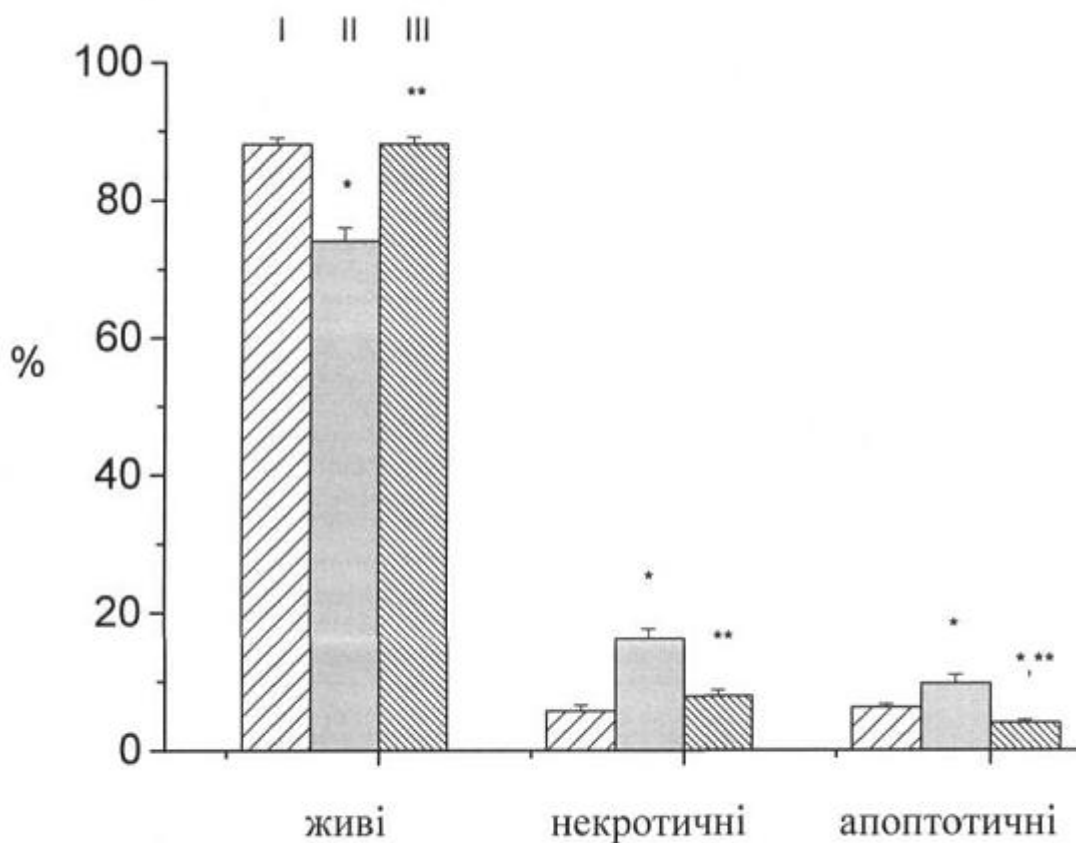
4. Нагібін В.С., Досенко В.Є., Пивовар С.М., Мойбенко О.О., Ягупольський Л.М. Фторований аналог діазоксиду попереджає апоптоз неонатальних кардіоміоцитів під час аноксії-реоксигенації // Фізіол. журн. - 2004. - 50, № 3, С. 3-8.

5. Струтинський Р., Мохорт М., Ягупольський Л., Мойбенко О. Флокалін - новий вітчизняний кардіопротектор // Вісник фармакології та фармації. - 2010. - № 3. - С. 44-56.

6. Струтинський Р.Б., Ровенець Р.А., Нецерет О.П., Мойбенко О.О. Вплив нового активатора аденозинтрифосфатчутливих калієвих каналів флокаліну на зміни вмісту цукру в крові в експерименті // Фізіол. журн. - 2010. - Т.56, № 6. - С. 38-47.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб попередження апоптозу та некрозу за аноксії-реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів, що включає відкривання АТФ-чутливих калієвих каналів клітинних мембран, який **відрізняється** тим, що в середовище інкубації вводять новий вітчизняний фторвмісний активатор вищезазначених каналів флокалін в дозі 5 мкмоль/л за дві хвилини до аноксії, що приводить до розвитку кардіопротекторних реакцій, які полягають у значному зменшенні процесів некрозу та повному запобіганні загибелі клітин через апоптоз.



Фіг. 1

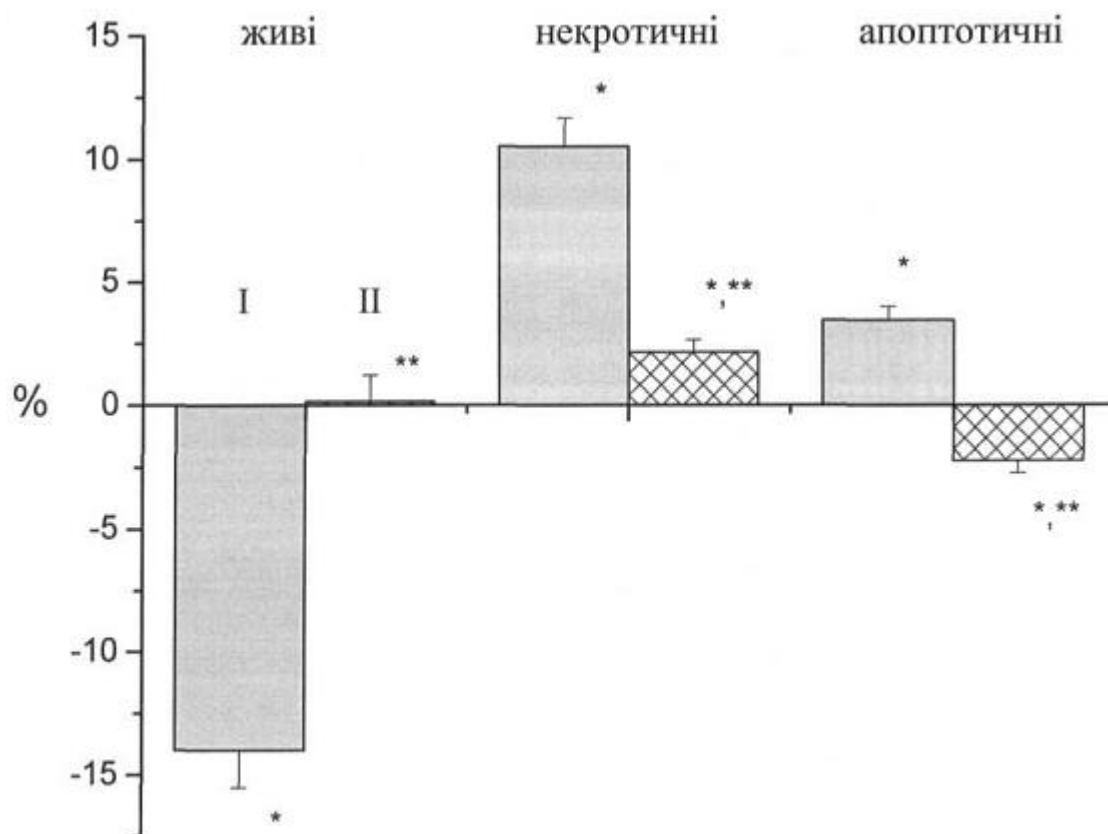


Fig. 2

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601