



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101746** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/00
G01N 33/49 (2006.01)
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 03618	(72) Винахідник(и): Поготова Гуля Аманмурадівна (UA), Горчакова Надія Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.04.2015	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2015	УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2015, Бюл.№ 18	бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ МЕТАБОЛІТОТРОПНИХ ЗАСОБІВ НА ОСМОТИЧНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ В КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ДИХЛОРЕТАНОВОМУ ГЕПАТИТІ

(57) Реферат:

Спосіб визначення впливу метаболітотропних засобів на осмотичну резистентність еритроцитів в крові щурів при дихлоретановому гепатиті, що включає дослідження крові, причому моделюють токсичний гепатит, на 5 день експерименту введення дихлоретану припиняють і протягом 10 днів тваринам вводять внутрішньошлунково селеназу в дозі 50 мг/кг, а інші препарати - в дозі 100 мг/кг, визначають осмотичну резистентність еритроцитів на 20-й день, отримані результати порівнюють з контролем і при зміні показників визначають вплив метаболітотропних препаратів на осмотичну резистентність еритроцитів крові.

UA 101746 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, точніше до фармакології, і може бути використана для визначення впливу метаболітотропних засобів на осмотичну резистентність еритроцитів в крові щурів при дихлоретановому гепатиті.

За даними літератури та власних досліджень встановлено, що такі препарати як селеназа, препарат омега - епадол-нео, адеметіонін, детоксил (базовий засіб - екстракт артишоку), лівонорм (базовий засіб - екстракт розторопші плямистої) мають антиоксидантні властивості [3, 4, 6, 8, 9, 17, 18]. Ця дія проявлялася стосовно показників прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в печінці і міокарді, а у селенази та адеметіоніну також в тканинах головного мозку [13, 14]. Результати проведених досліджень опосередковано вказують на наявність у досліджуваних речовин мембранопротекторної дії, тому слід оцінити їх вплив на структурну цілісність клітин. Структура і проникність біологічних мембран взаємопов'язана з метаболізмом і функцією життєво важливих органів [21]. Стан мембран клітин висвітлює регуляцію гомеостазу. Інтегральним показником мембранних процесів є осмотична резистентність еритроцитів, а зміни проникності мембрани клітини життєво важливих органів узгоджуються зі змінами проникності мембран еритроцитів [5, 7, 10, 15].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є фармакологічної детоксакації, який дозволяє безпосередньо діяти на токсичну речовину або її рецептори і ліквідувати ряд токсичних ефектів (5).

Задача, яку вирішує спосіб, що заявляється, полягає у вивченні впливу епадолу-нео, селенази, адеметіоніну, детоксилу і лівонорму на осмотичну резистентність еритроцитів периферичної крові щурів при дихлоретановому гепатиті.

Технічний результат при вирішенні задачі полягає в захисті еритроцитів крові щурів при дихлоретановому гепатиті.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який включає дослідження крові, згідно з корисною моделлю, моделюють токсичний гепатит, на 5 день експерименту введення дихлоретану припиняють і протягом 10 днів тваринам вводять внутрішньошлунково селеназу в дозі 50 мг/кг, а інші препарати - в дозі 100 мг/кг, визначають осмотичну резистентність еритроцитів на 20-й день, отримані результати порівнюють з контролем і при зміні показників визначають вплив метаболітотропних препаратів на осмотичну резистентність еритроцитів крові. Спосіб здійснюється наступним чином:

Експериментальні дослідження проведені на 49 нелінійних білих щурах-самцях, масою 180-200 г, отриманих з ГШ "Біомодельсервіс", м. Київ. Утримання тварин та спостереження за ними проводили згідно Методичних рекомендацій ДЕЦ МОЗ України [19]. Моделювання токсичного гепатиту проводили із застосуванням дихлоретану, який вводили щурам внутрішньошлунково за допомогою металевого зонду 1 раз на добу в дозі 500 мг/кг протягом 4 днів в суміші з оливковою олією (1:1). В експерименті визначено, що дихлоретановий гепатит супроводжується розбиттям окислювального стресу [11]. На 5 день експерименту введення дихлоретану припиняли і протягом 10 днів тваринам вводили внутрішньошлунково селеназу в дозі 50 мг/кг, а інші препарати - адеметіонін, епадол-нео, лівонорм, детоксил в дозі 100 мг/кг. Препарати, що погано розчинні в воді, вводили у вигляді суспензії, стабілізованої Твіном-80. Інтактна і контрольна група отримували внутрішньошлунково в аналогічному обсязі воду з Твіном-80. Дослідження по визначенню впливу препаратів на осмотичну резистентність еритроцитів проводили на 20-й день експерименту, коли тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) і швидко забрали кров. Ефективність лікування оцінювали за змінами показників ОРЕ. Еритроцити є найбільш чутливими індикаторами функціонального стану організму та одними з перших змінюють свої фізико-хімічні характеристики під впливом різних несприятливих чинників. Клітинна мембрана еритроцитів здатна відображати особливості функціонального стану мембран інших тканин, особливо тих, що поєднані ембріологічним походженням. Тому дані про зміни проникності мембран еритроцитів можна розглядати як ретроспективний показник загальної клітинної проникності та стану організму в цілому. Відсутність в еритроцитах міжклітинних з'єднань, внутрішньоклітинних компонентів полегшує інтерпретацію отриманих результатів [12]. Проникність клітинних мембран еритроцитів можливо проаналізувати за допомогою інтегрального показника осмотичної резистентності еритроцитів (ОРЕ). Цей параметр широко використовується для оцінки функціонального стану клітини і є інформативним тестом для виявлення навіть незначних початкових порушень в організмі [20]. ОРЕ визначали за рівнем гемолізу еритроцитів у серії забуферених гіпотонічних розчинів натрію хлориду концентрацією від 0,5 % до 0,1 % при рН 7,4 [2]. Найменш стійкі клітини лізуються у 0,5-0,45 % розчинах NaCl, а найстійкіші у 0,35 %-0,1 % розчинах. Найбільш показовим є 0,4 % розчин NaCl, в якому гемолізуються стійкі форми еритроцитів. Ступінь гемолізу досліджували в надосадовій рідині після центрифугування на фотоелектрокалориметрі ФЕК-2 при зеленому

світлофільтрі (540 нм) виражали в відсотках. Ця методика досить точна, об'єктивна, легка у виконанні, а також дозволяє судити не тільки про мінімальну та максимальну резистентність клітин, а й про динаміку гемолізу. Аналіз нормальності розподілу оцінювали за критеріями Колмогорова-Смирнова (Д) і Lilliefors, а також Shapiro-Wilk (W), якому віддавали перевагу. Дані представлені у вигляді середнього і стандартної помилки репрезентативності вибіркового середнього значення. Результати дослідження оброблені з застосуванням статистичного пакета ліцензійної програми "STATISTICA® for Windows 6.0" (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а також "SPSS 16.0", "Microsoft Excel 2003". Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Відомо, що токсичний гепатит може викликати зміни функціонального стану мембран, їх проникності, текучості та здатності до деформації. Встановлено, що у щурів з дихлоретановим гепатитом проявляються зміни з боку OPE. Гемоліз еритроцитів спостерігається в 0,5 % та 0,45 % розчинах NaCl ($13,8 \pm 3,4$ % та $26,8 \pm 2,4$ %) відповідно. Еритроцити здорових щурів за даних умов не лізуються. Ще більший гемоліз еритроцитів спостерігається у 0,4 % розчині NaCl ($81,2 \pm 5,8$ % проти $27,7 \pm 2,8$ % у контролі), а також у 0,35 % розчині ($92,2 \pm 4,3$ % проти $73,2 \pm 3,8$ % у контролі). Тобто у щурів при дихлоретановому гепатиті підвищення частки гемолізованих еритроцитів відмічається у всіх досліджуваних концентраціях NaCl та виходить далеко за межі нормальних значень (таблиця).

Таблиця

Вплив епадолу-нео, селенази, адеметіоніну, детоксилу, лівонорму на осмотичну резистентність еритроцитів у щурів з дихлоретановим гепатитом (n=7)

Групи тварин	Концентрація розчину NaCl (%)				
	0,5	0,45	0,4	0,35	0,1
	Відсоток гемолізу еритроцитів (%)				
Нормотензивні щури	0	0	$27,7 \pm 2,8^x$	$73,2 \pm 3,8^x$	100 ± 0
Дихлоретановий гепатит	$13,8 \pm 3,4^x$	$28,8 \pm 2,4^x$	$81,2 \pm 5,8^x$	$90,2 \pm 4,3^x$	100 ± 0
Дихлоретановий гепатит+епадол-нео	$1,2 \pm 0,8^{xx}$	$12,2 \pm 1,7^{xx}$	$55,7 \pm 2,8^{xx}$	$78,8 \pm 6,6^{xx}$	100 ± 0
Дихлоретановий гепатит+селеназа	0	0	$36,2 \pm 3,7^{xx}$	$70,4 \pm 4,2^{xx}$	100 ± 0
Дихлоретановий гепатит+адеметіонін	0	0	$38,2 \pm 5,6^{xx}$	$71,4 \pm 4,1^{xx}$	100 ± 0
Дихлоретановий гепатит+детоксил	$2,1 \pm 1,4^{xx}$	$14,5 \pm 2,6^{xx}$	$58,8 \pm 3,9^{xx}$	$81,1 \pm 4,8^{xx}$	100 ± 0
Дихлоретановий гепатит+лівонорм	$2,4 \pm 1,3^{xx}$	$15,8 \pm 2,7^{xx}$	$60,1 \pm 3,7^{xx}$	$82,3 \pm 6,1^{xx}$	100 ± 0

* $P \leq 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

** $P \leq 0,05$ порівняно з групою контролю

Це може свідчити про суттєві порушення нормального функціонування клітин мембрани, в першу чергу її проникності та здатності до розтягування. Основою будь якої клітинної мембрани є подвійний шар ліпідів. Від його цілісності залежать бар'єрні та механічні властивості клітинних мембран, що обумовлює їх стабільність та проникність. Форма та здатність еритроцитів до деформації, обумовлені фосфоліпідами, гліколіпідами, глікопротеїдами, холестерином, що входять до складу мембрани та білками цитоскелету [1].

Взаємодія білків цитоскелету з ліпідним шаром мембрани забезпечує стабільність структури еритроцитів і надає йому властивості пружного твердого тіла [1].

При потрапленні еритроцитів у гіпотонічне середовище у клітину в першу чергу заходить вода (коефіцієнт проникності мембрани для води приблизно на 10 порядків вище, ніж для електролітів), щоб урівняти осмотичний тиск в середині та зовні клітини. Спочатку при набуханні еритроцита площа мембрани не змінюється, збільшується тільки об'єм клітини. При досягненні сферичної форми подальше збільшення об'єму без збільшення площі поверхні цитоплазматичної мембрани стає неможливим - мембрана ізотропно розтягується. При певному пороговому рівні натягу енергетично вигідним стає виникнення в мембрані гідрофільних пор. Ці пори принципово відрізняються від білкових каналів своєю будовою та винятковою динамічністю. Гемолітичні пори на відміну від каналів не мають вибіркості, цей параметр

залежить лише від розміру пори. Фізико-математичні розрахунки виявили, що на ліпідну пору діє одночасно дві антагоністичні сили: кривий лінійний натяг параметра пори (сприяє росту пори), поверхневий натяг біслою фосфоліпідів (викликає стиснення пори) [16]. Крізь гемолітичну пору, що утворюється, ізотропно-розтягнутій мембрані еритроциту, відбувається викид частини внутрішньоклітинного вмісту (спочатку іони калію, пізніше гемоглобін) з клітини назовні під дією залишкового перепаду гідростатичного тиску. При цьому тиск всередині клітини швидко падає до критичного значення і відносний об'єм клітин зменшується. Якщо радіус кривизни пори менший від критичного радіуса - пора закривається, оскільки, її існування стає термодинамічно невигідним. Якщо ж радіус кривизни пори більший критичного радіуса - буде відбуватись розкриття мембрани в результаті необмеженого росту.

При вивченні стану еритроцитарних мембран при дихлоретановому гепатиті встановлені суттєві порушення їх функцій, насамперед проникності та здатності до розтягнення. Про це свідчить значне підвищення частки вивільнених еритроцитів у всіх досліджуваних концентраціях гіпотонічного розчину NaCl, включаючи стійкі і найстійкіші еритроцити, що може бути пов'язано з утворенням ліпідних радикалів під впливом активних форм кисню.

При застосуванні епадолу-нео OPE підвищується у всіх досліджуваних розчинах NaCl. В порівнянні з тваринами без застосування препарату відсоток гемолізу еритроцитів у 0,4 % розчині зменшується з $81,2 \pm 5,8$ % до $55,7 \pm 2,8$ %, хоча цей показник не досягає контрольних величин нормотензивних щурів. У 35 % розчині гемоліз еритроцитів також вірогідно не відрізнявся від гемолізу у нормотензивних щурів. Селеназа приводить до суттєвого покращення OPE. Так, у 0,5 % і 0,45 % розчинах NaCl гемоліз еритроцитів не спостерігається, що відповідає величинам у контрольних щурів без дихлоретанового гепатиту. У 0,4 % розчин NaCl рівень гемолізу еритроцитів зменшується з $81,2 \pm 5,8$ % до $36,2 \pm 3,7$ % в порівнянні з щурами з дихлоретановим гепатитом, а у 0,35 % розчині вірогідно не відрізняється від нормотензивних тварин ($70,4 \pm 4,2$ % проти $73,2 \pm 3,8$). Адеметіонін має подібну спрямованість дії. У 0,5 % і 0,45 % розчинах NaCl гемоліз еритроцитів не спостерігається. У 0,4 % розчині рівень гемолізу еритроцитів, як і у випадку з селеназою, зменшується з $81,2 \pm 5,8$ % до $38,2 \pm 5,5$ %. Менша ефективність показників гемолізу еритроцитів спостерігалася у детоксилу та лівонорму. Препарати не так суттєво, як при застосуванні селенази, адеметіоніну, навіть епадолу-нео, також зменшують гемоліз еритроцитів. Так, в концентрації 0,4 % детоксил зменшує гемоліз еритроцитів з $81,2 \pm 5,8$ % до $58,8$ %, а лівонорм з $81,2 \pm 5,8$ % до $60,1 \pm 3,7$ %. Отже, всі препарати, які вивчалися, а саме епадол-нео, селеназа, адеметіонін, детоксил, лівонорм здатні зменшувати проникність мембран еритроцитів, підвищуючи їх осмотичну резистентність. Більш виражені мембранопротекторні властивості встановлені у селеназі і адеметіоніну, що узгоджується з попередніми даними щодо більшого впливу селенази і адеметіоніну на показники ліпідної пероксидації. Епадол-нео, детоксил, лівонорм нормалізують проникність мембран еритроцитів, проте цей параметр не досягає нормальних величин, в той час як селеназа та адеметіонін мають виражені мембранопротекторні властивості. Більш виражений вплив селенази та адеметіоніну пов'язаний з їх більшими антиоксидантними властивостями, здатністю зменшувати рівень маркерів цитолізу, це, мабуть, сприяє їх здатності блокувати надмірне надходження кальцію до клітини та попереджати фосфорилювання білків цитоскелету еритроцитів. Не можна виключати прямого впливу цих засобів на фізико-хімічні властивості мембрани, зміну текучості завдяки проникненню шляхом пасивної дифузії. Можливо, що препарати можуть безпосередньо стимулювати репарації мембранних ліпідних пор, що виникають на ранніх стадіях гіпотонічного гемолізу. Мембранопротекторні властивості селенази та адеметіоніну пояснюються їх антирадикальними ефектами, можливою інактивацією неферментних каталізаторів (двовалентних іонів заліза), гальмівним впливом на ксантиноксидази, здатністю захищати ферментну ланку антиоксидантної системи (каталазу, глутатіонпероксидазу). Всі препарати мають певну гідрофобність, що сприяє безпосередньому впливу на структурно-динамічний стан клітинних мембран, дає змогу селеназі і адеметіоніну функціонувати як скаванджери активних форм кисню та переривати реакції вільнорадикального окислення безпосередньо в мембранах.

Наявність різниці при застосуванні препаратів на інтенсивність лізису еритроцитів в гіпотонічних умовах, можливо, пояснюється тим, що багато сполук різної хімічної будови можуть проявляти протекторний вплив при гіпотонічному гемолізі еритроцитів шляхом неспецифічної взаємодії з ліпідними та білковими компонентами гемолітичних пор.

У щурів з дихлоретановим гепатитом гемоліз еритроцитів виявляється у 0,5 %, 0,45 % розчинах NaCl. Значно зростає ступінь гемолізу стійких еритроцитів у 0,4 % розчині NaCl та найстійкіших у 0,35 % розчині.

Епадол-нео, в меншому ступені детоксил і лівоноорм, підвищують ОРЕ щурів з токсичним гепатитом в усіх досліджуваних розчинах NaCl, проте цей показник не досягає величин, характерних для нормотензивних щурів.

Селеназа та адеметіонін у щурів з дихлоретановим гепатитом повністю відновлюють функціональний стан еритроцитарних мембран.

Джерела інформації:

1. Антонов В.Ф. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран / В.Ф. Антонов//Соросовский образовательный журнал. - 1998. - №10. - С. 10-17

2. Базарнова М.А. Клінічна лабораторна діагностика: практичні заняття з клінічної біохімії / М. А. Базарнова. - К.: Вища школа, 1994. - 432 с.

3. Барнаулов О.Д. Детоксикационная фитотерапия, или противоядные свойства лекарственных растений / О.Д. Барнаулов. - Политехника, 2007. - 409 с.

4. Болотов А.Т. О лекарственных травах / А.Т. Болотов, В.Ф. Корсун, Е.В. Корсун, О.В. Понкрашова - М. - Институт фитотерапии. - 2010. - 334 с.

5. Борисов Ю.А. Резистентность эритроцитов мембран: механизмы, тесты, оценка / Ю. А. Борисов, В. Н. Спиридонов, Е. Д. Суглобова // Клин. лаб. диагностика. - 2007. - №12. - С. 36-40.

6. Гарник Т.П. Деякі аспекти застосування лікарських рослин в медицині / Т.П. Гарник, Ф.А. Мітченко, Т.К. Шураєва // Фітотерапія. Часопис. - 2002. - №: 1-2. - С. 70-72.

7. Губський Ю.І. Вивчення біохімічних і структурно-динамічних параметрів мембран еритроцитів за умов гострого болювого синдрому та дії кеторолаку і альфа-токоферолу ацетату / Ю. І. Губський, Т. А. Бухтіарова, Г.Г. Горгошко [та ін.] // Медична хімія.-2012. - Т. 14, № 4. - С. 5-11;

8. Корсун В.Ф. Руководство по клинической фитотерапии. Лекарственные растения в гастроэнтерологии / В. Ф. Корсун, К. А. Пупыкина, Е. В Корсун. - Практическая Медицина.-2008. - 464 с.

9. Мазнев Н. И. Высокоэффективные лекарственные растения. Большая энциклопедия / Н. И. Мазнев. - Эксмо, 2012. - 656 с.

10. Моисеенко В.А. Показатель проницаемости эритроцитарных мембран в оценке функционального состояния организма / В. А. Моисеенко, Л. И. Антоненко, Л. Л. Аршинникова [и др.] // Крымский терапевт, журнал. - 2007. - Т. 2, №2. - С. 103-106.

11. Мышкин А.В. Окислительный стресс и повреждение печени при химических воздействиях / А. В. Мышкин, А. Б. Бакиров. - Уфа, 2001. - 171 с.

12. Парфенов А.С. Анализ реологических свойств крови / А. С. Пафенов, А. В. Пешков А. В., Н. А. Добровольский. - М.: 1994.-15 с.

13. Поготова Г.А. Вплив лівоноорму та детоксилу на енергетичний обмін, про-оксидантно-антиоксидантну систему в печінці, міокарді та головному мозку щурів при дихлоретановому гепатиті / Г. А. Поготова, Н. О. Горчакова, І. Ф. Беленічев, І. С. Чекман // Вісн. проблем біології і медицини. - 2014. - Т. 3, Вип. 3. - С. 187-191

14. Поготова Г.А. Дія селенази на показники енергетичного обміну та прооксидантно-антиоксидантної системи в органах щурів при токсичному гепатиті / Г. А. Поготова, Н. О. Горчакова, І. Ф. Беленічев, І. С. Чекман // Вісник проблем біології і медицини.-2014. - Т. 2, Вип. 3. - С. 216-220.

15. Постнов Ю.В. Нарушение проницаемости клеточных мембран при спонтанной генетической гипертензии крыс / Ю. В. Постнов, С. Н. Орлов, А. С. Шевченко // Кардиология. - Т. 15, № 10. - С. 88-91

16. Потапенко А.Я. Оспотическая устойчивость эритроцитов / А. Я. Потапенко, А. А. Кятова, А. М. Тихомиров. - М.: 2006. - 16 с.

17. Раделов С. Энциклопедия лекарственных растений / С. Раделов. -СЗКЭО, 2010.-208 с.

18. Санина И.Л. Полный справочник лекарственных растений / И.Л. Санина. - Х.: Аргумент Принт, 2012. - 560 с.

19. Стефанов А.В. Доклинические исследования лекарственных средств / А.В. Стефанов. - Киев: Авиценна, 2002. - 568 с.

20. Факиров Д.Ф. Исследование кислотной и осмотический резистентности эритроцитов у рабочих нефтехимического производства / Д. Ф. Факиров, В. М. Самсонов, В. П. Кудрявцев [и др.] // Клін. лаб. діагностика. - 2003. - №7. - С. 21-23

21. Шайтан К.В. Сравнительное изучение молекулярной динамики, диффузии и проницаемости по отношению к лигандам для биологических мембран с различным липидным составом / К. В. Шайтан, М. Ю. Антонов, Е. В. Турлей // Биологические мембраны. - 2008. - Т. 25, №1. - С. 66-85.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення впливу метаболітотропних засобів на осмотичну резистентність еритроцитів в крові щурів при дихлоретановому гепатиті, що включає дослідження крові, який **відрізняється** тим, що моделюють токсичний гепатит, на 5 день експерименту введення дихлоретану припиняють і протягом 10 днів тваринам вводять внутрішньошлунково селеназу в дозі 50 мг/кг, а інші препарати - в дозі 100 мг/кг, визначають осмотичну резистентність еритроцитів на 20-й день, отримані результати порівнюють з контролем і при зміні показників визначають вплив метаболітотропних препаратів на осмотичну резистентність еритроцитів крові.

5

10

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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

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