



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77864** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61K 38/00**  
**A61P 9/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 10970</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Шиманська Тетяна Віталіївна (UA),</b> <b>Гошовська Юлія Володимирівна (UA),</b> <b>Сагач Вадим Федорович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>20.09.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.02.2013</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О.</b> <b>БОГОМОЛЬЦЯ НАНУ,</b> вул. Богомольця, 4, м. Київ-24, 01024 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.02.2013, Бюл.№ 4</b>	

**(54) СПОСІБ ЗАПОБІГАННЯ РОЗВИТКУ РЕПЕРFUЗІЙНИХ ПОРУШЕНЬ ФУНКЦІЇ СЕРЦЯ**

**(57) Реферат:**

Спосіб запобігання розвитку реперфузійних порушень функції серця полягає у внутрішньочеревинному введенні L-цистеїну. Попередньо здійснюють внутрішньочеревинне введення DL-пропаргілгліцину у концентрації 11,3 мг/кг, реєструють скоротливу активність ізольованого серця за показниками кардіодинаміки, кисневого обміну та зміною рівнів мітохондріального фактора.

**UA 77864 U**



Корисна модель належить до медицини і кардіології і може бути використана для профілактики і корекції ішемічно-реперфузійних порушень роботи серця та інших органів під час операцій по їх трансплантації.

Ішемія-реперфузія виникає при операціях на серці з використанням апаратів штучного кровообігу, при трансплантації органів і тканин. Профілактика і лікування реперфузійного пошкодження при тромболітичній терапії також досить гостро стоїть перед лікарями різних напрямків, бо наслідки реперфузії істотно обмежують можливості тромболітичної терапії, призводячи до порушень судинного тону, кровопостачання і функціонального стану реперфузованого органу.

Нестача кровопостачання і обмежений доступ кисню до ішемізованих ділянок міокарда різко обмежують здатність кардіоміоцитів синтезувати АТФ, що необхідний для забезпечення скорочення і розслаблення серцевою м'язу. Протягом короткого часу у такому стані кардіоміоцити можуть зберігати цілісність мембран, необхідну для підтримання життєдіяльності, і в подальшому відновити скоротливу активність міокарда. Однак, тривалий період ішемії призводить до істотних клітинних пошкоджень: в кардіоміоцитах спостерігається збільшення вільних радикалів, перевантаження іонами  $\text{Ca}^{2+}$ , утворення мітохондріальних пор, зниження мембранного потенціалу, запалення і ацидоз. Робота серця при цьому відновлюється частково і є низькоефективною.

Утворення надмірної кількості активних форм кисню (АФК) при різкому відновленні кровопостачання ішемізованих ділянок міокарда є основним пошкоджуючим фактором при реперфузії, що супроводжується розвитком так званого окисного стресу. При цьому значно порушується тканинне дихання і АТФ-синтезуюча функція мітохондрій, а також погіршується скоротлива активність серця. Встановлено, що дихання мітохондрій ішемізованих або реперфузованих сердець знижується на 20-30 % внаслідок пошкодження мітохондріальної мембрани АФК або іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Отже, розвиток окисного стресу - головна причина реперфузійних порушень функції органів. Подальше виживання клітин і відновлення їх функцій залежить багато в чому від активності антиоксидантної системи. Саме чому найбільш ефективними для профілактики або корекції наслідків ішемії-реперфузії є засоби і агенти, що запобігають розвитку окисного стресу.

Серед методів метаболічної корекції станів, зумовлених ішемією-реперфузією, все більшу увагу привертають препарати, що мають властивості антиоксидантів і мембранопротекторів. Сучасні наукові дані та результати власних досліджень свідчать, що використання тролоксу, мелатоніну, коензиму  $\text{Q}_{10}$ , які мають антиоксидантні властивості, призводять до зменшення реперфузійних порушень функції серця і виступають блокаторами утворення мітохондріальних пор (1, 2). Однак, важливим також є стимуляція власної антиоксидантної системи кардіоміоцитів, що в результаті може забезпечити повноцінне відновлення скоротливої функції серця в реперфузійний період.

В літературі є дані про використання амінокислоти L-цистеїну як сполуки, що здатна зменшувати негативний вплив ішемії-реперфузії на міокард, а саме зменшувати зону інфаркту (3), збільшувати активність супероксиддисмутази і пригнічувати продукцію АФК (4).

Даний спосіб є найбільш близьким до запропонованої корисної моделі.

Недоліком даного способу є реалізація дії L-цистеїну через продукт свого метаболізму, а саме сірководень, який утворюється ферментом цистатіон-γ-ліазою і виступає тригером у кардіопротекторних механізмах міокарда. Однак, L-цистеїн може використовуватися клітиною не лише для синтезу сірководню, але й для синтезу білків і як попередник утворення найпотужнішого ендogenousного антиоксиданта - глутатіону. Таким чином, використання клітиною L-цистеїну в багатьох метаболічних шляхах супроводжується відсутністю бажаного ефекту на відновлення функціонального стану серця, незважаючи на характерний біохімічний ефект зниження впливу окисного стресу при ішемії-реперфузії.

В основу корисної моделі поставлено задачу попередити розвиток реперфузійних порушень функціональної активності серця і збільшити ефективність утилізації кисню мітохондріями міокарда.

Технічним результатом корисної моделі є запобігання розвитку реперфузійних пошкоджень органів (міокарда), пов'язаному з надмірним утворенням АФК і порушенням мітохондріального дихання.

Поставлена задача вирішується завдяки застосуванню L-цистеїну на фоні попереднього введення DL-пропаргілгліцину.

Запропонований спосіб дозволяє активізувати захисні властивості міокарда не через клітинну сигналізацію, залежну від сірководню, а через спрямування метаболічних шляхів перетворення L-цистеїну в антиоксидантні сполуки. При цьому DL-пропаргілгліцин, що

вводиться попередньо до введення L-цистеїну, пригнічує активність цистатіон-γ-ліази, під дією якої з L-цистеїну утворюється сірководень. Даний спосіб передбачає також і позитивний вплив на функцію мітохондрій, що проявляється в запобіганні утворення мітохондріальних пор транзиторної проникності, відкривання яких веде до апоптозу/некрозу кардіоміоцитів. Такий підхід щодо корекції реперфузійних порушень функції серця використовується вперше і дозволяє не лише отримати значний кардіопротекторний ефект, але й збільшити ефективність кисневого метаболізму серця у реперфузійний період.

В спосіб, що заявляється, водний розчин DL-пропаргілгліцину вводять внутрішньоочеревинно. Через 10 хв здійснюють ін'єкцію водного розчину L-цистеїну. Через 30 хв відтворюють ішемію-реперфузію ізольованого серця щурів та реєструють скоротливу активність ізольованого серця за показниками кардіодинаміки, кисневого обміну та зміною рівнів мітохондріального фактора.

Приклад.

Дослідження проводили на дорослих щурах лінії Вістар. Здійснювали внутрішньоочеревинне введення DL-пропаргілгліцину у концентрації 11,3 мг/кг маси тіла, а через 10 хв L-цистеїну у концентрації 121 мг/кг маси тіла. Через 30 хв реєстрували скоротливу активність ізольованого серця за методом Лангендорфа, припиняли перфузію коронарних судин на 20 хв, після чого реперфузія тривала 40 хв. Оцінювали скоротливу активність ізольованого серця, кисневу вартість його роботи і ступінь проникності мітохондріальних мембран за вивільненням у відтікаючий розчин мітохондріального фактора методом спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці спектру (230-260 нм) (5).

У контрольній групі щурів протягом усього періоду реперфузії показники скоротливої активності і розслаблення міокарда були знижені більше ніж в два рази. Величина тиску, який розвивав лівий шлуночок, на початку реперфузії була зменшена на 90 % від вихідного рівня, поступово збільшуючись до 30 % від вихідного значення (фіг. 1, фіг. 2). Поруч з цим величина коронарного потоку була значно зниженою (фіг. 3).

Застосування вибраної комбінації речовин (L-цистеїну на фоні введення DL-пропаргілгліцину) мало потужний кардіопротекторний ефект при дії ішемії-реперфузії (фіг. 1).

Корисна модель пояснюється за допомогою наступних фігур.

Фіг. 1. Попередження реперфузійного зниження тиску, що розвиває лівий шлуночок, при ішемії - реперфузії. А - контроль; Б - сумісний вплив DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну (Б).

Фіг. 2-5. Зміни показників кардіодинаміки при ішемії-реперфузії міокарда у контрольних умовах і після застосування L-цистеїну і його комбінації з DL-пропаргілгліцином; фіг. 2 розвинутий і кінцево-діастолічний тиск у лівому шлуночку; фіг. 3 - коронарний потік; фіг. 4 - швидкість скорочення і розслаблення міокарда; фіг. 5 - інтенсивність скоротливої функції серця ІСФ/.

Фіг. 6. Вплив DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну на зміни величини кисневої вартості роботи серця при ішемії-реперфузії.

Фіг. 7. Зміни рівнів мітохондріального фактора, що визначався у перфузійному розчині, який відтікав від серця за 1 хвилину реперфузії.

Спостерігали значне попередження реперфузійних змін всіх досліджуваних показників функціонального стану міокарда. Була зареєстрована достовірна різниця між серіями експериментів щодо величини тиску у лівому шлуночку ( $92 \pm 5,3 \%$  проти  $30 \pm 9,4 \%$  у контрольній серії) (фіг. 2), швидкості скорочення ( $96,0 \pm 4,0 \%$  проти  $64,7 \pm 9,8 \%$  у контрольній серії) і розслаблення міокарда ( $92,95 \pm 4,5 \%$  проти  $59,6 \pm 13,3 \%$  у контролі),  $P < 0,01$  (Фіг. 4). Величина кінцево-діастолічного тиску практично не змінювалась, а ІСФ через 40 хв реперфузії відновлювалась до  $98,3 \pm 7,2 \%$  (Фіг. 5).

Одночасно реєстрували більш ефективну роботу дихальною ланцюга мітохондрій. Під час реперфузії киснева вартість роботи серця тварин, що отримали запропоновану комбінацію сполук, практично не змінювалась, в той час як в контрольній групі цей показник зростав в 2,4 рази. Це свідчить про більш ефективне використання кисню міокардом тварин за дії DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну.

Таким чином, в результаті введення L-цистеїну на фоні застосування DL-пропаргілгліцину резистентність міокарда до ішемічного та реперфузійного впливів неймовірно зростала.

Зниження ступеня реперфузійних порушень функції серця під впливом DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну корелювало з кількістю мітохондріального фактора (показник відкривання мітохондріальних пор в умовах *in situ* та *in vivo*), який вивільнювався у коронарне русло. Приріст густини поглинання відтікаючого від серця під час реперфузії розчину був вдвічі меншим, ніж у контрольній серії (Фіг. 7), що підтверджує протекторний вплив DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну при дії ішемії-реперфузії і утворення мітохондріальних пор у кардіоміоцитах.

Варто зазначити, що спостережуваний кардіопротекторний ефект був зумовлений виключно комбінуванням DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну, оскільки введення самого L-цистеїну виявляло лише тенденцію до покращення показників кардіодинаміки (Фіг. 2-5) і кисневої вартості його роботи (Фіг. 6) протягом усіх часових проміжків спостереження реперфузійного періоду.

Таким чином, результати досліджень свідчать, що послідовне введення DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну, тобто блокада перетворення його у сірководень, призводить до істотного зменшення ступеня реперфузійних порушень функції серця та його кисневого обміну на фоні пригнічення утворення мітохондріальних пор. Отже, застосування DL-пропаргілгліцину і L-цистеїну в умовах ішемії-реперфузії сприяє зменшенню проникності мітохондріальних мембран у міокарді тварин, що дає можливість серцю зберегти енергосинтезуючу функцію мітохондрій, зменшити неефективне використання кисню і протистояти руйнівним наслідкам окисного стресу.

Основною перевагою даного способу запобігання розвитку реперфузійних порушень функції серця перед іншими є практично відсутнє пригнічення функціонального стану серця, збільшення ефективності утилізації кисню міокардом і попередження утворення мітохондріальних пор, а також можливість застосування даного способу не лише для серця, а й для інших органів.

Джерела інформації:

1. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів мітохондріальної пори // Фізіол. ж.-2002.-48, № 6. - С. 3-9.

2. Сагач В.Ф., Г.Л. Вавілова, О.В. Рудик, Ф.В. Добровольський, Т.В. Шиманська, О.С. Медведєв. Інгібування мітохондріальної пори як один із механізмів кардіопротекторної дії коензиму Q<sub>10</sub>. // Фізіол. ж. 2007.-53, № 4. - С. 34-41.

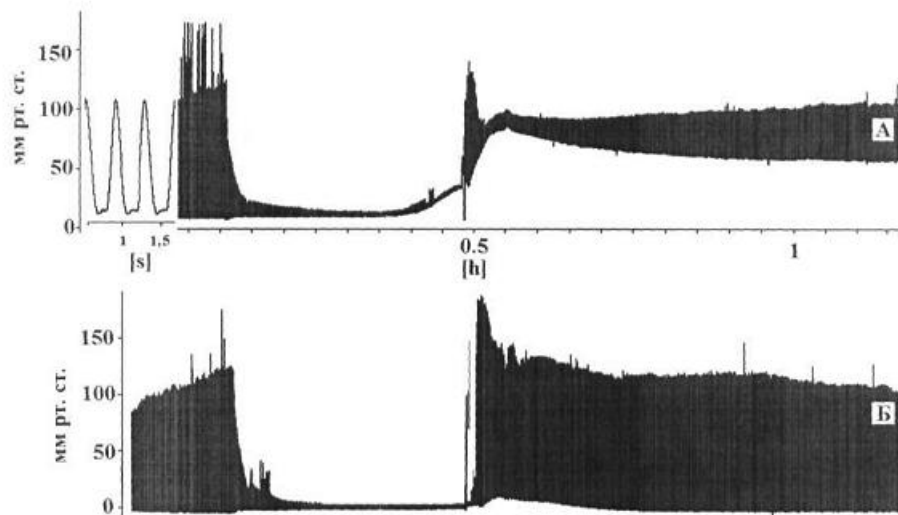
3. Eiscy D.J., Fowkes R.C., Baxter G.F. L-cysteine stimulates hydrogen sulphide synthesis in myocardium associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.-2010.-15, № 1. - P. 53-59.

4. Xue M., Cui J., Xia W., Li Y., Qian L.B., Ye Z.G., Wang H.P., Xia Q. Effect of S-allyl-L-cysteine on isolate heart subject to ischemia/reperfusion // Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.-2011.-27, № 1. - P. 13-17.

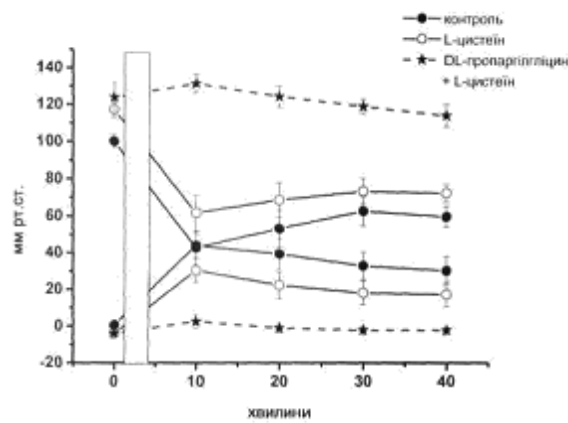
5. Державний патент України на корисну модель № 26385 від 25.09.2007, Бюл. № 15, 2007. Сагач В.Ф., Дмитрієва А.В., Бубнова Ю.О., Шиманська Т.В., Надточій С.М., Максименко В.Б. Спосіб діагностики ішемічно-реперфузійних пошкоджень міокарда та відкривання мітохондріальної пори // Міністерство освіти і науки. Державний департамент інтелектуальної власності.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

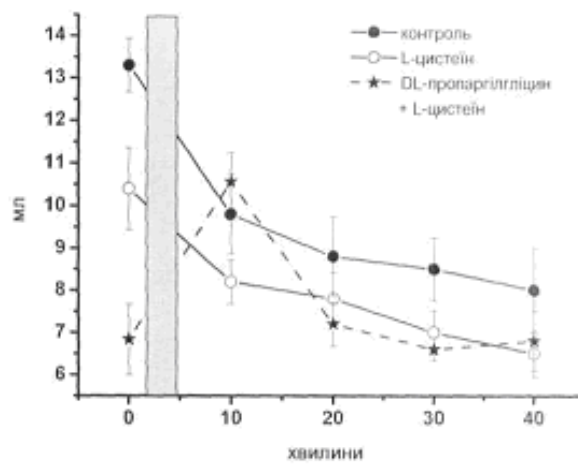
Спосіб запобігання розвитку реперфузійних порушень функції серця, що полягає у внутрішньочеревинному введенні L-цистеїну, який **відрізняється** тим, що в ньому здійснюють попереднє внутрішньочеревинне введення DL-пропаргілгліцину у концентрації 11,3 мг/кг, реєструють скоротливу активність ізольованого серця за показниками кардіодинаміки, кисневого обміну та зміною рівнів мітохондріального фактора.



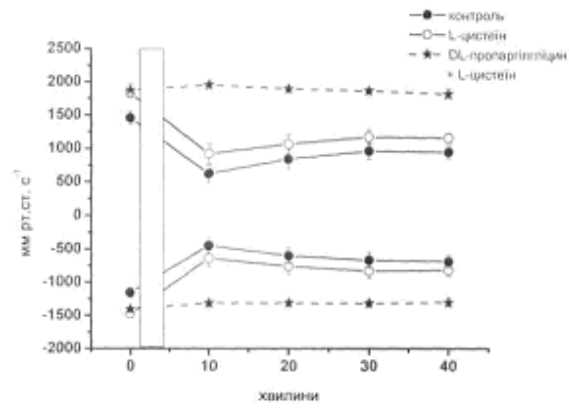
Фиг. 1



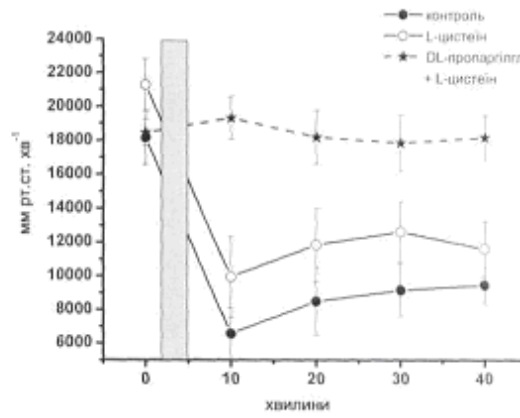
фиг. 2



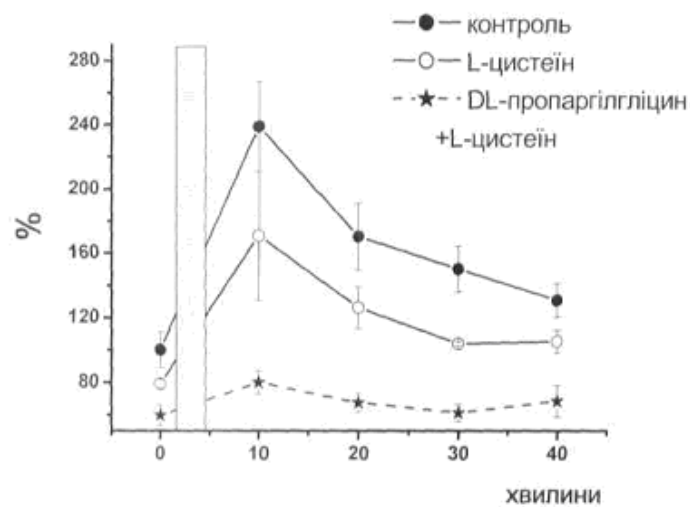
фиг. 3



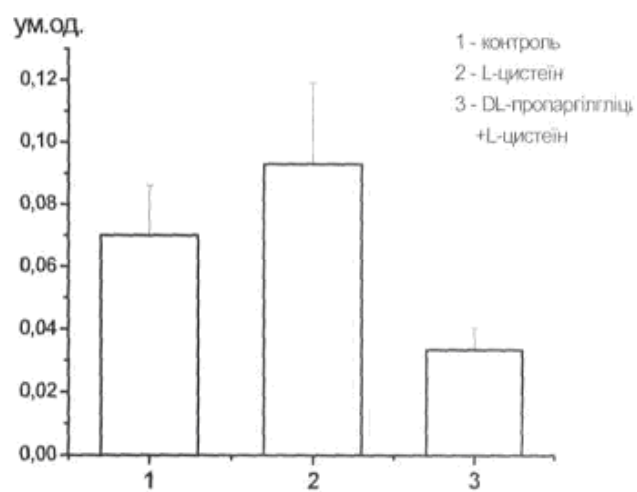
фiг.4



фiг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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