



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95996** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 36/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2014 08944	(72) Винахідник(и):	Довгань Роман Степанович (UA)
(22) Дата подання заявки:	08.08.2014	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	12.01.2015		УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	12.01.2015, Бюл.№ 1		бул. Шевченка, 13, м. Київ, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки ефективності лікування артеріальної гіпертензії включає проведення морфометричного аналізу гістохімічних препаратів. Визначають об'ємну щільність міофібрилу і мітохондрій та їх співвідношення в кардіоміоцитах, кількість мітохондрій в одиниці площі кардіоміоциту та площу їх зрізу, довжину саркомерів, діаметр канальців сарко-плазматичної сітки до та після лікування елгацином, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність препарату.

UA 95996 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до фармакотерапії серцево-судинних захворювань, може використовуватись для покращення результатів лікування артеріальної гіпертензії.

При лікуванні артеріальної гіпертензії гіпотензивними препаратами, навіть за умов зниження артеріального тиску, повного відновлювання структурних пошкоджень міокарда експериментальних щурів з артеріальною гіпертензією (АГ) не відбувається [3, 4]. Пошук більш ефективних схем лікування цієї патології показав доцільність комплексного застосування антигіпертензивних та метаболічних препаратів [1]. Одними з перспективних засобів є препарати, які мають антиоксидантні властивості. Це обумовлено тим, що при артеріальній гіпертензії відмічається пряма кореляція між рівнями перекисного окислення ліпідів і систолічним кров'яним тиском [2, 4]. І хоча питання, чи є оксидантний стрес причиною, чи наслідком розвитку артеріальної гіпертензії, дискутабельне [12], те, що вона нерозривно пов'язана з оксидантним стресом, не викликає сумнівів [8, 9].

До антиоксидантів належать рослинні поліфеноли, серед яких найбільш активними є елаготаніни і, зокрема, їх похідна - елагова кислота [6, 14]. Елагова кислота має широкий спектр дії - їй притаманна антимуtagenна, антиканцерогенна, і фермент інгібуюча активності [6, 13]. Крім того, елагова кислота має виразну кардіопротекторну дію і застосовується при лікуванні інфарктів міокарду. Ефективність використання елагової кислоти у комплексному лікуванні артеріальної гіпертензії вивчена недостатньо [5].

У зв'язку з цим, метою дослідження було вивчення впливу елгацину (елагова кислота) на ультраструктуру міокарда лівого шлуночка серця щурів з АГ, що дозволить деталізувати деякі механізми дії цього препарату.

Найбільш близьким за технічним вирішенням до способу що заявляється, є спосіб оцінки вплив у тіотриазоліну в комплексній терапії хворих ішемічною хворобою серця (ІХС) який виступає як прототип. Цим способом досліджують мембраностабілізуючі, антиоксидантні властивості тіотриазоліну за допомогою біохімічних показників.

Однак, цей спосіб має недоліки: він низько інформативний, мало чутливий, потребує тривалого виконання та незручний у використанні.

Задача корисної моделі, що заявляється, полягає в розробці способу, який передбачає застосування елгацину та його впливу на ультраструктуру міокарда лівого шлуночка, що дозволить проконтролювати якість лікування артеріальної гіпертензії і покращити ефективність фармакотерапії даного захворювання.

Технічний результат, який досягається, полягає у підвищенні ефективності лікування.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі який включає проведення морфометричного аналізу гістохімічних препаратів, згідно корисної моделі, визначають об'ємну щільність міофібрил і мітохондрій та їх співвідношення в кардіоміоцитах; кількість мітохондрій в одиниці площі кардіоміоциту та площу їх зрізу, довжину саркомерів, діаметр каналців саркоплазматичної сітки до та після лікування елгацином, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність препарату.

Методом електронної мікроскопії та морфометричного аналізу досліджено 3 групи тварин (по 7 у кожній групі): нормотензивні щури лінії WKY, щури лінії NCSAG з АГ та щури з АГ, які отримували розчинений на воді елгацин у дозі 1 мг/кг через орогастральний зонд один раз на добу. Тварини утримувалися в умовах віварію Національного медичного університету імені О.О. Богомольця при постійній температурі, достатньому природному освітленні, вільному доступу до стандартного харчування та води.

В експеримент брали щурів вагою 190-210 г. Артеріальний тиск вимірювали на хвостовій артерії за допомогою гумової манжети та плетизмографа без наркотизації перед початком та напередодні виведення тварин з експерименту. Тривалість експерименту 60 діб. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985), "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Міокард лівого шлуночка фіксували у 2,5 % розчині глутарового альдегіда з подальшою дофіксацією в розчині OsO₄ за Мілонінгом, обробляли згідно загальноприйнятій для електронно мікроскопічних досліджень методики та заключали у суміш епону та аралдиту. Ультратонкі зрізи, отримані на ультратомі LKB, контрастували ураніл ацетатом та цитратом свинцю і фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125 К. Стереологічні показники отримували за допомогою програми KAPPA. Морфометрично оцінювали наступні показники: об'ємна щільність міофібрил і мітохондрій та їх співвідношення в кардіоміоцитах; кількість мітохондрій в одиниці площі кардіоміоциту та площу їх зрізу; довжину саркомерів; діаметр каналців

саркоплазматичної сітки. Статистична обробка матеріалу здійснювалася методом варіаційної статистики з використанням критерію Стюдента.

Вимірювання артеріального тиску не виявило значущих змін рівнів артеріального тиску до початку експерименту і наприкінці в усіх групах досліджених тварин. У щурів лінії WKY середній показник артеріального тиску дорівнював 103 ± 1 мм рт. ст., - 104 ± 1 мм рт. ст.; у щурів з АГ - 157 ± 1 мм рт. ст. та 156 ± 1 мм рт. ст.; у щурів зі САГ після застосування елгацину - 154 ± 2 мм рт. ст. та $153 \pm 2,0$ мм рт. ст., відповідно.

У щурів з АГ після застосування елгацину кардіоміоцити лівого шлуночку варіюють за ультраструктурою. Спостерігаються клітини з добре збереженими міофібрилами, які формують типові саркомери (Фіг. 1 А). У частини кардіоміоцитів саркомери містить ділянки локального лізису міофібрил (Фіг. 1 Б, В). Відмічаються також перескорочені міофібрили (Фіг. 1 В, Г), хоча їх поширеність менша, ніж у нелікованих щурів з АГ. Об'єм, який займають міофібрили в одиниці об'єму кардіоміоцитів після застосування елгацину, статистично ймовірно перевищує цей показник у щурів зі САГ, але не досягає контрольного показника (табл. 1).

Про роз'єднаність процесів скорочення та розслаблення міофібрил свідчить показник довжини саркомерів, який дорівнює $0,97 \pm 0,01$ мкм, що залишається значуще нижчим, ніж у нормотензивних щурів, хоча і вище показника у нелікованих щурів з АГ (табл.).

Таблиця

Морфометричні показники кардіоміоцитів у міокарді лівого шлуночку щурів контрольної групи (К), щурів з АГ та щурів і АГ після застосування елгацину (АГ+Ел)

	Об'ємна щільність МФ, %	Довжина саркомера мкм	Мітохондрії			МТ/МФ
			Об'ємна щільність %	Кількісна щільність, $10^{-2}/\text{мкм}^2$	Площа 10^{-2} мкм ²	
К	$51,59 \pm 1,55$	$1,23 \pm 0,01$	$28,18 \pm 1,18$	$99,56 \pm 2,83$	$28,73 \pm 0,69$	$0,55 \pm 0,10$
АГ	$38,03 \pm 2,73^*$	$0,87 \pm 0,01^*$	$31,45 \pm 1,66$	$68,39 \pm 2,34^*$	$54,98 \pm 4,61^*$	$0,93 \pm 0,02^*$
АГ+Ел	$43,71 \pm 2,38$ * **	$0,97 \pm 0,01$ * **	$27,09 \pm 1,91$ **	$107,11 \pm 2,71$ * **	$23,98 \pm 1,71$ * **	$0,61 \pm 0,02$ * **

Примітка:

* статистично достовірна різниця порівняно з контролем ($P < 0,05$).

** статистично достовірна різниця порівняно з групою щурів із САГ ($P < 0,05$).

Непрямою ознакою порушень скоротливої функції кардіоміоцитів є стан каналців саркоплазматичної сітки. Після застосування елгацину середній діаметр каналців дорівнює $(10,51 \pm 0,05) \times 10^{-2}$ мкм, що незначно перевищує цей показник у нелікованих щурів зі САГ, у яких він знижений до $(10,35 \pm 0,04) \times 10^{-2}$ мкм проти $(11,73 \pm 0,05) \times 10^{-2}$ мкм у контролі. Про незначні відмінності стану каналців саркоплазматичної сітки у нелікованих і лікованих елгацином щурів зі САГ свідчить і їх розподіл за діаметром. Вони незначно різняться між собою - у них переважну більшість складають найдрібніші каналці, тоді як у контролі їх значуще менше.

Більш ефективно впливає елгацин на мітохондрії кардіоміоцитів. Мітохондрії мають чітко структуровані зовнішні мембрани, матрикс помірної електронної щільності та досить щільно розташовані кристи (Фіг. 2 А, Б), що в цілому подібно структурі мітохондрій кардіоміоцитів у контролі.

Кількісний аналіз мітохондрій показав, що об'ємна щільність мітохондрій після застосування елгацину повертається до контрольних величин і дорівнює $27,09 \pm 1,91$ %. Суттєво відрізняються від аналогічних показників у нелікованих щурів і кількісна щільність та площа зрізу мітохондрій: збільшується їх кількість в одиниці площі кардіоміоцитів на фоні зменшення площі їх зрізу. При цьому, площа зрізу мітохондрій нижче того ж показника у контролі, що є наслідком присутності значної кількості дрібних органел та відсутності крупних. Тобто, після застосування елгацину в кардіоміоцитах відбувається фрагментація мітохондрій, що підтверджується збільшенням, порівняно з контролем, показником кількісної щільності при статистично однотипних показників об'ємної щільності.

Щодо органел біосинтетичного плану необхідно відмітити, що елгацин суттєво не впливає на їх стан. Рибосоми та полісоми спостерігаються у помірній кількості, диктіосоми комплексу Гольджі звужені (Фіг. 1 А-Г; 2 А, Б).

Більш виразно впливає елгацин на гемомікроциркуляторне русло міокарда лівого шлуночку щурів з АГ. Збільшується число мікросудин усіх ланок: прекапілярів, капілярів та посткапілярних венул. Ендотеліальні клітини, що їх вистеляють, містять ядро з чітко структурованою ядерною мембраною та рівномірно розподіленим по каріоплазмі хроматином. Про активність

трансе́ндотеліальних процесів свідчать, з одного боку стоншені периферичні ділянки ендотеліоцитів в одних мікросудинах, що зменшує відстань переносу речовин, а з другого - наповненість цих ділянок в інших мікросудинах мікропіноцитозними пухирцями, які приймають участь в переносі речовин.

Таким чином, проведений ультраструктурний та морфометричний аналіз міокарда лівого шлуночка щурів з АГ після 60-ти добового застосування елгацину показав, що цей препарат, хоча і не знижує підвищений артеріальний тиск у щурів з АГ, покращує скоротливий апарат кардіоміоцитів. Це проявляється зменшенням виразності та поширеності перескорочених міофібрил, що сприяє зменшенню їх руйнування і наслідком чого є збільшення об'ємної щільності міофібрил. Причиною цього може бути властивість елагової кислоти нормалізувати

рівні серцевого тропоніну Т, який, як відомо, приймає участь у зв'язуванні міозину з актином і нестача якого у серцевому м'язі може блокувати акто-міозинове розходження.

Крім того, роз'єднаність процесу взаємодії актинових та міозинових ниток може бути обумовлена дефіцитом молекул АТФ, яке виникає в кардіоміоцитах при спонтанній артеріальній гіпертензії. На ультраструктурному рівні це проявляється дистрофічно-деструктивними змінами мітохондрій, що корелює зі зниженням кількості АТФ у кардіоміоцитах та вмісту основного субстрату для її утворення - пальмітинової кислоти у щурів з АГ. Елагова кислота проявляє захисну дію проти ультраструктурних ушкоджень мітохондрій при інфаркті міокарда завдяки видаленню вільних радикалів. Високу антиоксидантну активність елагова кислота має завдяки великому числу гідроксильних груп в її структурі, здатних секвеструвати і нейтралізувати вільні радикали. Завдяки поліфенольній природі, ця сполука, вбудовуючись у гідрофобну фазу мембран, впливає на структуру останніх. В мітохондріях елагова кислота, запобігаючи утворенню мітохондріальних карбонільних білків та перекисному окисленню ліпідів, інгібує мітохондріальний окислювальний стрес, чим сприяє відновленню мембран та зменшенню мітохондріальної дисфункції. Нормалізуючи стан мітохондріальних мембран, елгацин позитивно

впливає на процеси злиття-поділу мітохондрій, врівноваженість яких відіграє важливу роль у біоенергетичній функції [10].

Проявляючи виразну антиоксидантну активність, елгацин суттєво не впливає на стан каналців саркоплазматичної сітки та органел білок синтетичного плану.

Ще однією стороною позитивного впливу елгацину на міокард лівого шлуночку серця щурів з АГ, є властивість елагової кислоти знижувати ступень ендотеліальної дисфункції [11], яка розвивається при артеріальній гіпертензії за умов оксидантного стресу. Після застосування елгацину у щурів з АГ спостерігається збільшення кількості кровоносних мікросудин, серед яких значну частину складають найдрібніші - капіляри. Тобто відбувається новоутворення гемомікросудин, ендотеліальне вистелення яких має ультраструктурні ознаки активних

трансе́ндотеліальних процесів.

Висновки.

1. Елгацин, не викликаючи зниження артеріального тиску у щурів з АГ, покращує стан скоротливого апарату кардіоміоцитів лівого шлуночка. Це проявляється зменшенням виразності та поширеності перескорочених міофібрил, що запобігає їх деструкції. Даний препарат не впливає на стан каналців саркоплазматичної сітки.

2. Нормалізація процесів скоротливості кардіоміоцитів обумовлена властивістю елгацину блокувати оксидантний стрес, в першу чергу, в мітохондріях. Це призводить до відновлення зовнішніх та внутрішніх мембран, тим самим посилюючи утворення АТФ, дефіцит якого викликає роз'єднаність процесів скорочення та розслаблення міофібрил.

3. Антиоксидантна спроможність елгацину позначається на стані гемомікроциркуляторного русла міокарда лівого шлуночка щурів з АГ, де спостерігається активне новоутворення мікросудин та активація трансе́ндотеліальних процесів переносу речовин.

Джерела інформації:

1. Довгань Р.С., Порівняльна морфометрична оцінка ефективності впливу біпрололу та його комбінації з препаратами метаболічного плану на кардіоміоцити щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / Р.С. Довгань, Л.О. Стеченко, Т.П. Куфтирева та ін. // Вісн. морфології. - 2009. - Т. 15 - № 1. - С. 1-4.

2. Довгань Р.С. Порівняльний аналіз змін вмісту жирних кислот в органах та крові щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / Р.С. Довгань // Вісник проблем біології та медицини. - 2013. - Т.2 - № 2. - С. 97-101.

3. Загородний М.І. Вплив карведилолу на ультраструктуру міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / Загородний М.І., Куфтирева Т.П., Стеченко Л.О., Свінціцький А.С. // Український кардіологічний журнал. - 2008 - № 6. - С. 79-83.

5 4. Загородний М.І. Вплив ліприлу на ультраструктуру міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / Загородний М.І., Стеченко Л.О., Куфтирева Т.П., Свінціцький А.С. та ін. // Лікарська справа. Врачебное дело. - 2008 - № 5, 6. - С. 82-87.

5. Пузиренко А.М. Вивчення антигіпертензивної дії амлодіпіну, бісопрололу, елгацину та їх комбінації у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / А.М. Пузиренко, А.Горчакова Н.О., І.С. Чекман // Галицкий мед. ж. - 2011. - Vol. 1. - Р. 76-78.

10 6. Хворот О.П. Эллаговая кислота, распространенность в растительном мире и аспекты биологического действия / О.П. Хворот, В.В. Малый, А.Г. Сербин и др. // Провизор.-1998. - N 22. - С. 17-19.

7. Aggarwal B.B. Suppression of the nuclear factor-kappa B activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning / B.B. Aggarwal, S.Shishodia // Ann. NY Acad. Sci.-2004, - V. 1030-P. 434-441.

8. Armani C. Molecular markers of cardiovascular damage in hypertension / C. Armani, N. Botto, M.G. Andreassi // Curr. Pharm. Des – 2013-V.19. N. 13-P. 2341-2350.

9. Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension / A. Ceriello // Diabetes Care.-2008. - V. 31-N 2-P. 181-184

20 10. Chan D.C. Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals / D.C.Chan // Ann. Rev. Cell Dev. Biol.-2006. - V.22-P. 79-99.

11. Chularojmontri L. Phyllanthusemblica L. Enhances Human Umbilical Vein Endothelial Wound Healing and Sprouting / L.Chularojmontri, M.Suwatronnakorn, S.K.Wattanapitayakul // Evid Based Complement Alternat Med – 2013-P. 720-728.

25 12. Grossman E. Does increased oxidative stress cause hypertension? /E.Grossman // DiabetesCare.-2008. - V.31. - N 2. - P. 185-189.

13. Heber D. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins / D.Heber // CancerLett.-2008. - V. 269. - N 2. - P. 262-268.

30 14. Ito H. Metabolites of the ellagitanningeraniin and their antioxidant activities /H. Ito // Planta Med. - 2011. - V.77-N 11. - P. 1110-1115.

15. Визир В.А., Волошина И.Н., Мазур И.А. и др... Гепатопротекция у больных ишемической болезнью сердца // Новости медицины и фармации. - 2006. № 10 (192). - С. 9-19.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35 Спосіб оцінки ефективності лікування артеріальної гіпертензії, що включає проведення морфометричного аналізу гістохімічних препаратів, який **відрізняється** тим, що визначають об'ємну щільність міофібрилу і мітохондрій та їх співвідношення в кардіоміоцитах, кількість мітохондрій в одиниці площі кардіоміоциту та площу їх зрізу, довжину саркомерів, діаметр канальців сарко-плазматичної сітки до та після лікування елгацином, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність препарату.

40

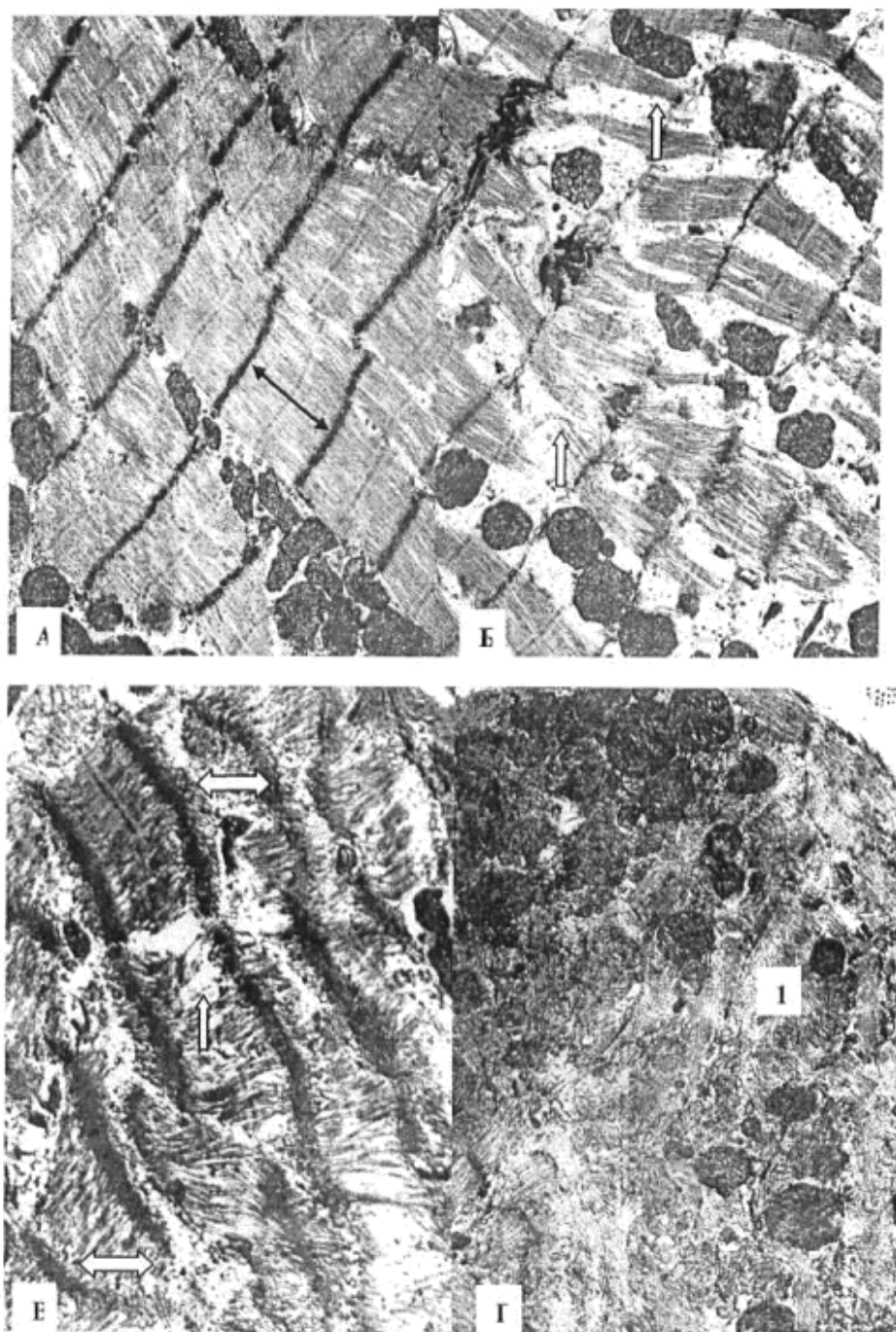
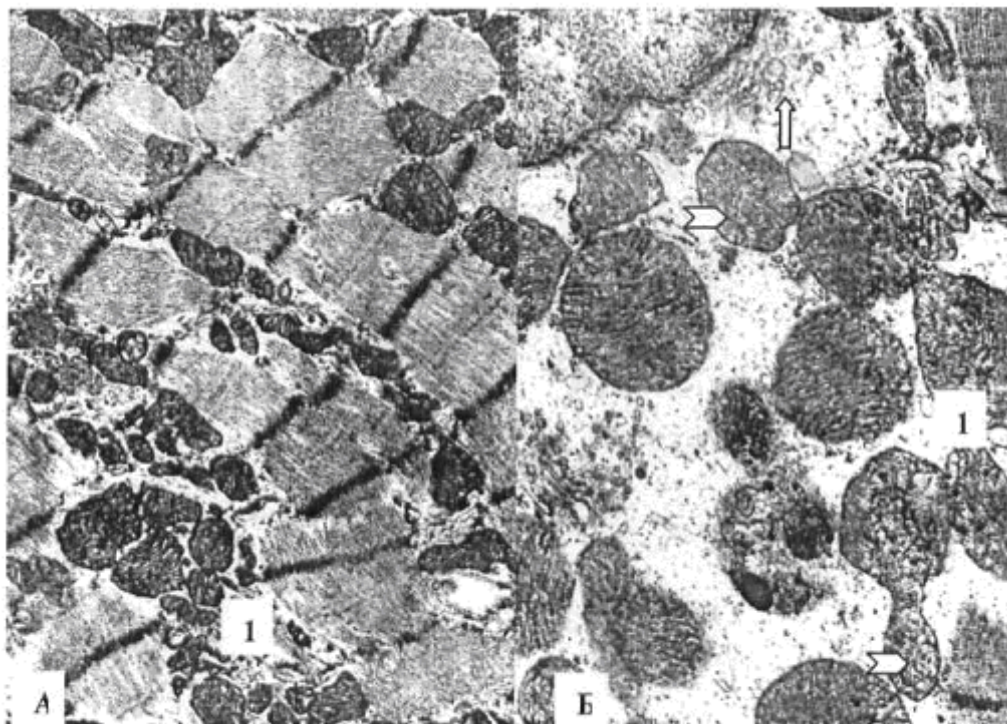


Fig. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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