



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95997** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 33/00
A61K 36/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 08946	(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 НЕБІВІЛОЛУ ПРИ ЛІКУВАННІ МІОКАРДА ЛІВОГО ШЛУНОЧКА СЕРЦЯ ЩУРІВ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки ефективності небівілолу при лікуванні міокарда лівого шлуночка серця щурів з артеріальною гіпертензією передбачає проведення морфометричних досліджень. Визначають об'ємну щільність міофібрил та мітохондрій, їх співвідношення в кардіоміоцитах; кількість мітохондрій в одиниці площі кардіоміоциту та площу їх зрізу; довжину саркомерів; діаметр канальців саркоплазматичної сітки до та після лікування небівілолом, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність лікування артеріальної гіпертензії.

UA 95997 U

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

У лікуванні артеріальної гіпертензії широко застосовуються блокатори бета-адренорецепторів, стимуляція яких викликає підвищення частоти та сили серцевих скорочень, споживання міокардом кисню, артеріального тиску. У розкриття складних механізмів дії бета-адреноблокаторів, які досі до кінця не з'ясовані, вагомий внесок може надати вивчення впливу препаратів цієї групи на структуру серця - основного органа-мішені артеріальної гіпертензії. Роботи останніх років показали, що такі бета-адреноблокатори як карведілол та бісопролол, понижуючи артеріальний тиск, зменшують негативні морфологічні зміни в міокарді у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією (САГ). Це проявляється зменшенням контрактильності міофібрил та покращенням енергетики у кардіоміоцитах. При цьому карведілол більшою мірою сприяє відновленню мітохондрій, ніж бісопролол [1, 2, 4]. Відмінності у дії різних бета-адреноблокаторів, які відмічаються при клінічних дослідженнях, пов'язують з їх неоднаковою селективністю, симпатомімічною активністю, розчинністю у жирах, здатністю метаболізуватися у печінці, тривалості дії.

У зв'язку з цим, метою дослідження було вивчення ультраструктури міокарда лівого шлуночка серця щурів зі САГ при застосуванні небівілолу - кардіоселективного бета-адреноблокатора III покоління.

Для оцінки спрямованості та ефективності дії лікарських засобів був застосований кількісний гістохімічний аналіз кардіоміоцитів, що дозволило визначити деякі аспекти впливу вивчених препаратів на процеси, які розвиваються у гіпертензивних щурів до та після лікування.

Найбільш близьким за технічним вирішенням до способу, що заявляється, є спосіб оцінки впливу тіотриазоліну в комплексній терапії хворих ішемічною хворобою серця (9), який виступає як прототип. Цим способом досліджують мембраностабілізуючі, антиоксидантні, репаративні властивості тіотриазоліну за допомогою біохімічних показників.

Однак цей спосіб має недоліки: низька інформативність і мала чутливість, потребує тривалого виконання та незручний у використанні.

Задача корисної моделі, що заявляється, полягає в розробці способу, який передбачає комплексне застосування небівілолу, що дозволить проконтролювати якість лікування артеріальної гіпертензії і покращити ефективність фармакотерапії даного захворювання.

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

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який передбачає проведення морфометричних досліджень, згідно з корисною моделлю, визначають об'ємну щільність міофібрил та мітохондрій, їх співвідношення в кардіоміоцитах; кількість мітохондрій в одиниці площі кардіоміоциту та площу їх зрізу; довжину саркомерів; діаметр каналців саркоплазматичної сітки до та після лікування небівілолом, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність лікування артеріальної гіпертензії.

Матеріалом для дослідження були нормотензивні щури лінії WKY та щури лінії HICAG (ISIAH) зі спонтанною генетично зумовленою артеріальною гіпертензією (САГ). 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. 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).

Досліджено 3 групи тварин (по 7 у кожній групі): 1 група - контрольна (нормотензивні щури); 2 група - щури зі САГ; 3 група - щури зі САГ, які отримували розчинений на воді небівілол у дозі 1 мг/кг через орогастральний зонд один раз на добу.

Електронно-мікроскопічно досліджувався міокард лівого шлуночка. Матеріал фіксували у 2,5 % розчині глутарового альдегіду з подальшою до фіксацією в розчині OsO₄ за Мілонінгом, обробляли згідно з загально прийнятою для електронно мікроскопічних досліджень методикою та заключали у суміш епону та аралдиту. Ультратонкі зрізи, отримані на ультратомі LKB, контрастували уранілом 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 та мітохондрій

та їх співвідношення в кардіоміоцитах; кількість мітохондрій в одиниці площі кардіоміоциту та площу їх зрізу; довжину саркомерів; діаметр канальців саркоплазматичної сітки. Статистична обробка матеріалу здійснювалася методом варіаційної статистики з використанням критерію Ст'юдента.

5 Результат дослідження та їх обговорення

Небівілол статистично ймовірно знижував артеріальний тиск у щурів зі САГ до $137 \pm 5,0$ мм. рт. ст., у порівнянні з нелікованими тваринами, середній показник у яких дорівнював $157,5 \pm 5,0$ мм.рт.ст., але не досягав контрольних величин - $104,2 \pm 1,8$ мм. рт. ст. Зниження тиску корелювало з покращенням ультраструктури міокарда лівого шлуночка серця щурів зі САГ після 60-ти добового застосування небівілолу.

10

На поздовжніх зрізах кардіоміоцитів чітко розрізнялися саркомери (фіг. 1 А, Б), середня довжина яких дорівнювала $1,06 \pm 0,01$ мкм, що значно більше, ніж у нелікованих тварин зі САГ (таб. 1.). Хоча цей показник менше, у порівнянні з контролем, якісний аналіз та аналіз розподілу саркомерів за довжиною (фіг. 2) свідчив про відсутність різко перескорочених міофібрил.

15

Таблиця 1

Стереологічні показники кардіоміоцитів у міокарді лівого шлуночка щурів контрольної групи (К), щурів зі САГ та щурів зі САГ після застосування небівілолу (САГ+Н)

	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	$51,59 \pm 1,55$	$1,23 \pm 0,01$	$28,18 \pm 1,18$	$99,5 \pm 2,8$	$28,73 \pm 0,69$	$0,55 \pm 0,00$
САГ	$38,03 \pm 2,73^*$	$0,87 \pm 0,01^*$	$31,45 \pm 1,66$	$68,3 \pm 2,3^*$	$54,98 \pm 4,61^*$	$0,93 \pm 0,02^*$
САГ+Н	$45,08 \pm 0,81^*$	$1,06 \pm 0,01^{**}$	$28,47 \pm 0,57^{**}$	$104,9 \pm 1,5^{**}$	$27,42 \pm 2,05^{**}$	$0,63 \pm 0,04^{**}$

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

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

Відсутність контрактурних змін, які призводять до руйнації міофібрил, значною мірою сприяло їх відновленню під впливом небівілолу. Внаслідок цього, очевидно, значно збільшувався у порівнянні з нелікованими щурами зі САГ, об'єм, який займали міофібрили в кардіоміоцитах щурів зі САГ, які отримували небівілол. Разом з тим, повернення цього показника до контролю не відбувалося (табл. 1), що пов'язано з наявністю кардіоміоцитів, в яких міофібрили займають до 30 % об'єму, що не спостерігалось у нормотензивних щурів, у яких переважна більшість кардіоміоцитів містила 45-60 % міофібрил (фіг. 3). Відсутність повного відновлення скоротливого апарата після дії небівілолу корелює з переважанням саркомерів помірної довжини (фіг. 2).

20

Більш ефективно впливав небівілол на стан енергетичного апарата кардіоміоцитів. Мітохондрії містять добре структуровані зовнішні мембрани та кристи. Останні розташовувалися, в основному паралельно, міжкристний простір не розширений (фіг. 1Б).

30

Кількісні показники, що характеризували ці структури, після застосування небівілолу не відрізнялися від контрольних. Значно зменшувалася, у порівнянні з нелікованими щурами зі САГ, площа зрізу мітохондрій, що відбувалося одночасно із збільшенням їх числа (табл. 1.).

Саркоплазматична сітка представлена канальцями, діаметр яких варіював (фіг. 4А).

35

Під дією небівілолу зменшувалося, у порівнянні з нелікованими щурами зі САГ, число дрібних канальців і збільшувалася кількість середніх за розмірами канальців (фіг. 5). Внаслідок цього середній діаметр канальців СПС з $(10,35 \pm 0,04) \times 10^{-2}$ мкм значно збільшувався до $(11,24 \pm 0,03) \times 10^{-2}$ мкм у щурів зі САГ, які отримували небівілол, хоча і залишався статистично меншим, ніж у контролі $-(11,73 \pm 0,05) \times 10^{-2}$ мкм.

40

Позначався небівілолі на стані гемомікроциркуляції. Це, в першу чергу, проявлялося збільшенням кількості гемомікросудин, число яких у щурів зі САГ було суттєво зменшено. Повсюдно спостерігалися кровоносні капіляри невеликого діаметра, утворених однією ендотеліальною клітиною, яка містила функціонально активне, велике за розмірами ядро з переважанням еухроматину (фіг. 4Б). Це давало підставу віднести ці мікросудини до новостворених. В периферичних ділянках ендотеліоцитів містилося велике число

мікропіноцитозних пухирців, які приймали участь у трансендотеліальному переносі речовин (фіг. 4А).

При аналізі отриманого матеріалу необхідно враховувати наступне. Відомо, що одним із проявів дії небівілолу, який належить до β_1 -адреноблокаторів, є зниження сили серцевих скорочень. Надлишок іонів кальцію у цитозолі кардіоміоцитів при артеріальній гіпертензії, викликаний надмірним їх надходженням через відкриті кальцієві канали, активує утворення актино-міозинових комплексів, тим самим підвищуючи силу серцевих скорочень, а затримка їх переходу в каналці саркоплазматичної сітки через звуження останніх, яке спостерігається в наших дослідженнях у щурів зі САГ, перешкоджає розслабленню міофібрил. Небівілол, блокуючи β_1 -адренорецептори, перериває ланку їх взаємодії з ендogenousними катехоламінами - аденілатциклазою - синтезом цАМФ, що запобігає фосфорилуванню мембранних кальцієвих каналів. Внаслідок цього останні залишаються закритими, зменшуючи надходження іонів кальцію в кардіоміоцити з інтерстиційного простору, і тим самим зменшують силу серцевих скорочень. На ультраструктурному рівні це проявляється суттєвим зменшенням числа перескорочених саркомерів у кардіоміоцитах лівого шлуночка, що в свою чергу відображується на цілісності міофібрил. Про це свідчить показник об'ємної щільності міофібрил, величина якого у щурів зі САГ після прийому небівілолу наближується, хоча і не досягає контрольних величин.

Небівілол, як традиційний β -адреноблокатор, стимулює продукцію та виділення оксиду азоту, який, як відомо, має гемодинамічні ефекти та кардіопротекторну активність. Роботи останніх років свідчать, що оксид азоту синтезується не тільки в ендотелії кровоносних судин [5], а й практично всіма серцевими типами клітин. Експресія в кардіоміоцитах оксиду азоту, який є клітинним месенджером і відіграє ключову роль у регуляції серцевої функції, дуже важлива, тому що він має короткий час напіврозпаду, внаслідок чого ефекти NO локалізовані поряд з місцем його синтезу. Субстратом для синтезу NO, є синтаза оксиду азоту, яка локалізується в кавеолах сарколемії Т-каналців, саркоплазматичному ретикулуму і мітохондріях. Тому нормалізація якісних та кількісних показників цих органел, яке ми спостерігали в кардіоміоцитах щурів зі САГ після застосування небівілолу, може бути непрямою ознакою впливу цього препарату на процеси експресії синтази оксиду азоту, тим самим знижуючи контрактильність міокарда.

Позитивно впливає небівілол і на енергетичну функцію кардіоміоцитів, внаслідок чого усі показники, що характеризують мітохондрії не відрізняються від контролю. Збільшується, у порівнянні з нелікованими тваринами зі САГ, кількість мітохондрій при пропорційному зменшенні їх площі. Тобто, процеси злиття та поділу цих органел набувають притаманну їм у контролі виразність. Це позитивно відображується на виробництві АТФ, нестача якого також позначається на скоротливій функції кардіоміоцитів. Майже повне відновлення мітохондріального стану, можливо, пов'язане із спроможністю небівілолу нормалізувати синтез NO, нестача якого викликає зміни активності ферментів мітохондрій та розвиток вторинної мітохондріальної дисфункції. Крім того, небівілол видаляє реактивні форми кисню шляхом взаємодії з вільними радикалами, тим самим зменшуючи надмірне його виробництво і окисний стрес, який притаманний гіпертонії [6].

Висновки

1. Небівілол призводить до збільшення в кардіоміоцитах об'єму міофібрил, який був значно зменшений у щурів зі САГ. Відновлення міофібрил відбувається на фоні суттєвого зниження ступеня контрактильності міофібрил.

2. Небівілол ефективно впливає на енергетичну функцію кардіоміоцитів у щурів зі САГ, про що свідчать якісні та кількісні показники мітохондрій, які після застосування небівілолу не відрізняються від контрольних показників.

3. Небівілол сприяє новоутворенню кровоносних капілярів у міокарді щурів зі САГ та активацію в них процесів трансендотеліального переносу речовин.

На базі інституту проблем патології та кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця був апробований спосіб, що заявляється, Отримані позитивні результати дозволяють рекомендувати його для широкого впровадження в клінічну медицину.

Джерела інформації:

1. Довгань Р.С. Вплив біпрололу та метаболічних препаратів на ультраструктуру міокарда щурів із спонтанною артеріальною гіпертензією/ Р.С. Довгань, Д.С. Чекман, Л.О. Стеченко та ін. // Науковий вісник НМУ імені О.О. Богомольця. - 2008. - № 2. - С. 40-59.

2. Загородний М.І. Вплив карведилолу на ультраструктуру міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією/ М.І. Загородний, Т.П. Куфтирева, Л.О. Стеченко та ін. // Науковий вісник НМУ імені О.О. Богомольця. - 2009. - Т. 26. - № 4. - С. 79-83.

3. Звягина В.И. Воздействие донора оксида азота 1 - аргинина на активность митохондриальных оксидоредуктаз и окислительные процессы в ткани сердца крыс в условиях дефицита оксида азота/ В.И. Звягина, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских и др. // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 8. - С. 1087-1091.

5 4. Пузиренко А.М. Вплив амлодипіну та бісопрололу на ультраструктуру міокарда щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією / А.М. Пузиренко, І.С. Чекман, Т.П. Куфтирева // Фізіол. журн. - 2013. - Т. 59. - N 3. - С. 39-49.

10 5. Broeders M.A. Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta (2) - adrenergic receptor-mediated nitric oxide production/ M.A. Broeders, P.A. Doevendans, B.C. Bekkers et al. // Circulation. - 2000. - V.102. - N 6. - P. 677-684.

6. 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. 9-10.

15

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки ефективності небівілолу при лікуванні міокарда лівого шлуночка серця щурів з артеріальною гіпертензією, що передбачає проведення морфометричних досліджень, який **відрізняється** тим, що визначають об'ємну щільність міофібрил та мітохондрій, їх співвідношення в кардіоміоцитах; кількість мітохондрій в одиниці площі кардіоміоциту та площу їх зрізу; довжину саркомерів; діаметр каналців саркоплазматичної сітки до та після лікування небівілолом, одержані результати порівнюють з контролем і при нормалізації показників оцінюють ефективність лікування артеріальної гіпертензії.

20

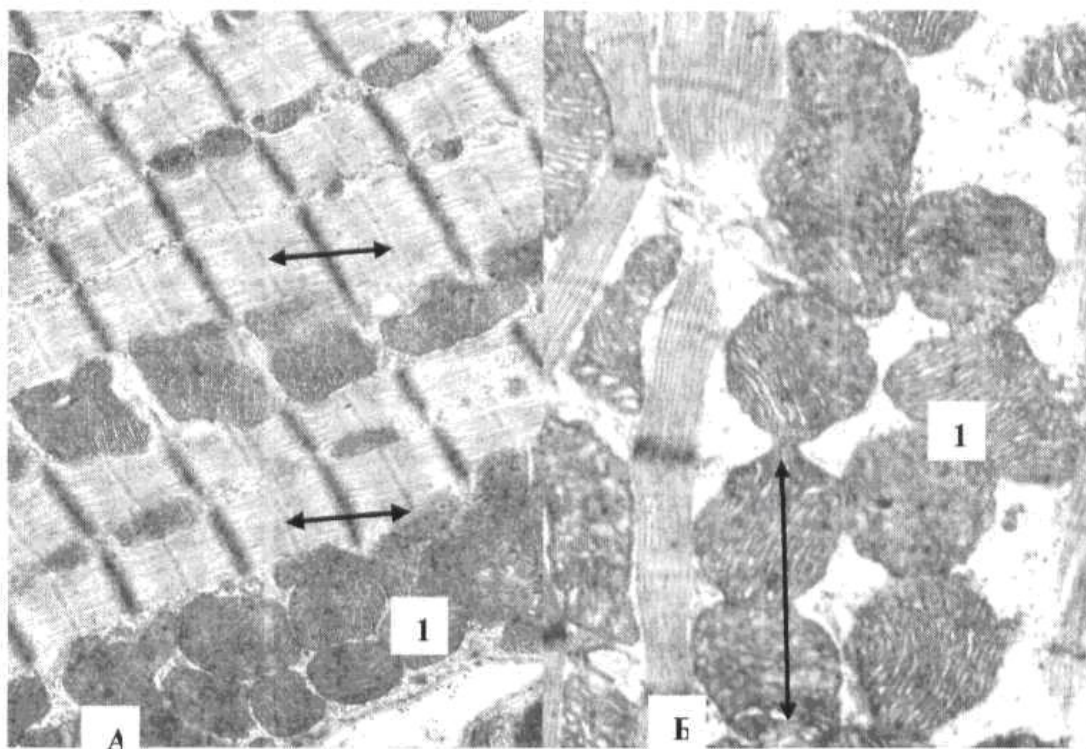
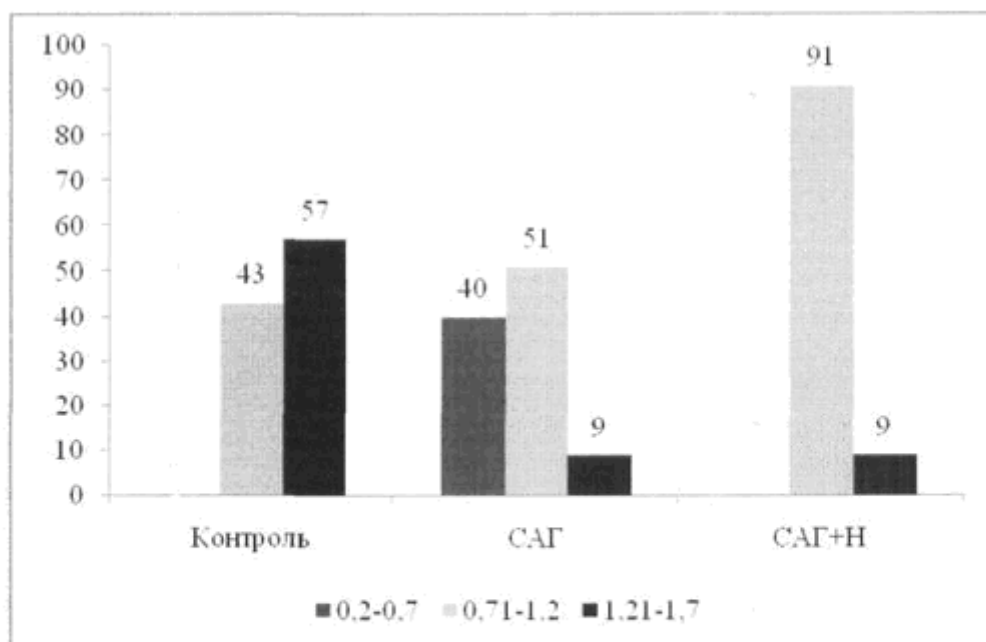
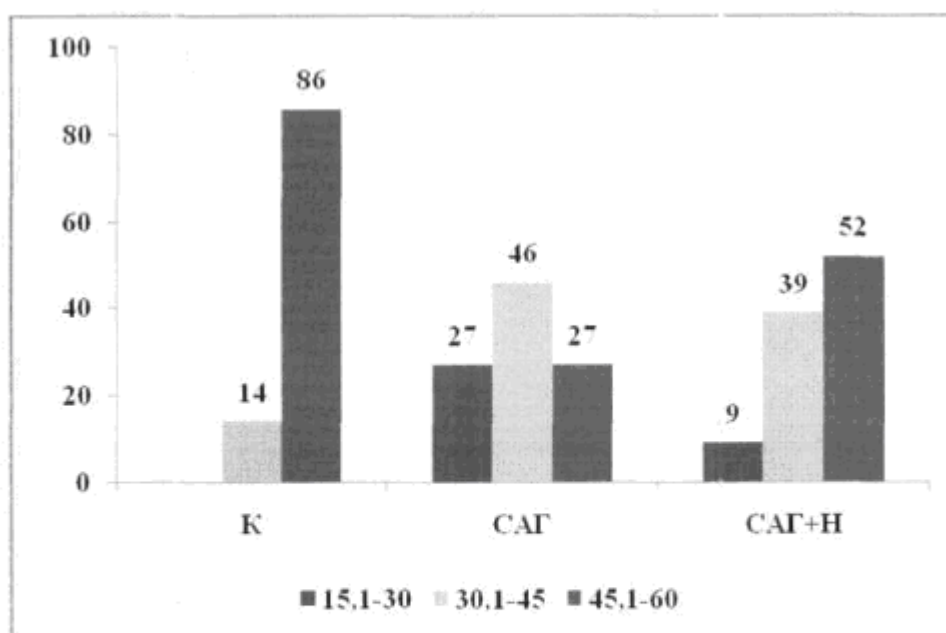


Fig. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

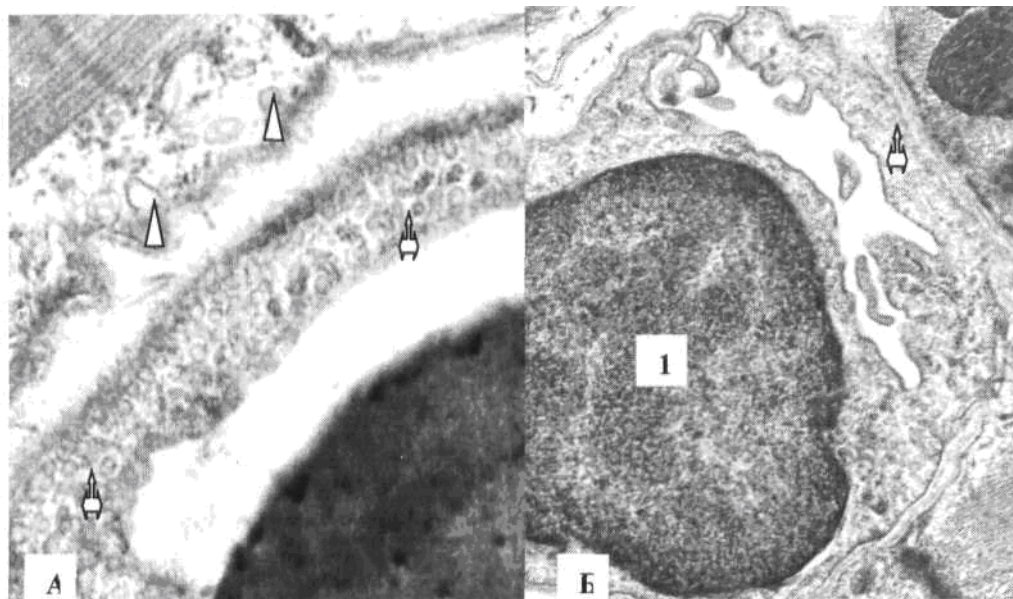


Fig. 4

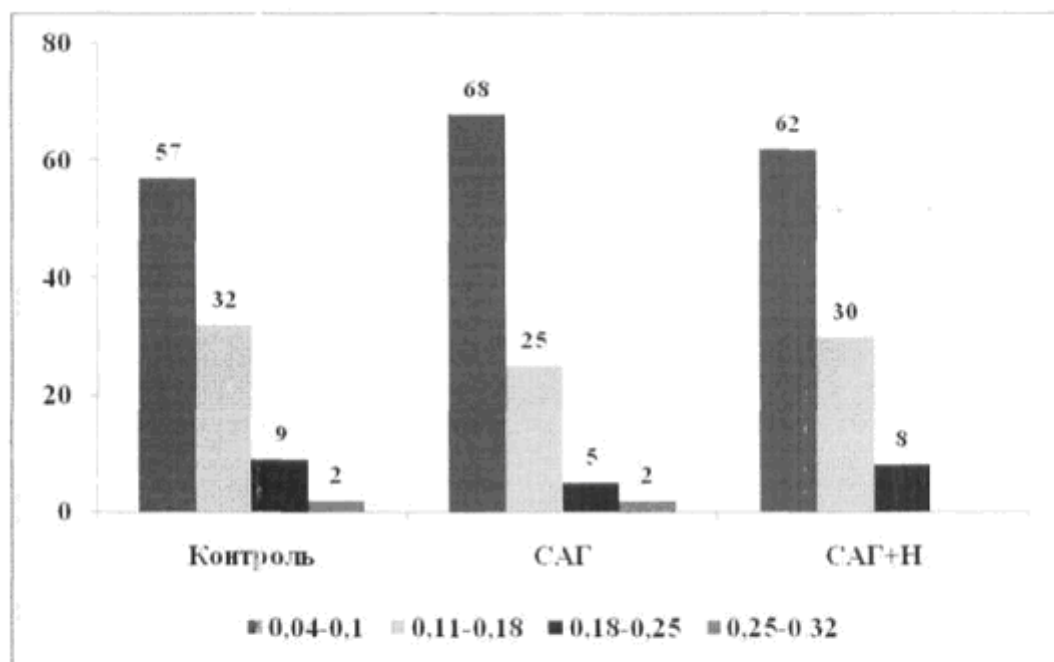


Fig. 5

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