



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97665** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 11781	(72) Винахідник(и): Остапенко Ольга Валеріївна (UA), Чайковський Юрій Богданович (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.10.2014	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2015, Бюл.№ 6	

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ З ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНИМ ГІПОТИРЕОЗОМ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки ефективності лікування підшлункової залози щурів з післяопераційним гіпотиреозом передбачає проведення морфометричних досліджень. Визначають співвідношення одно-, двоядерних екзокриноцитів; кількість темних та світлих екзокриноцитів; процентне співвідношення екзокриноцитів з гранулами та екзокриноцитів в стані екструзії; кількісне співвідношення екзокриноцитів з ліпідними включеннями до та після лікування епадолом, одержані результати порівнюють з контролем і при зміні показників оцінюють ефективність лікування.

UA 97665 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до фармакотерапії захворювань травної системи, і може використовуватись для покращення результатів лікування післяопераційного гіпотиреозу.

Усе більшу увагу приділяють препаратам омега-3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), що є незамінними для людини. Фармакологічні дослідження ПНЖК інтенсивно проводяться в усьому світі, однак молекулярні механізми розвитку їхніх терапевтичних ефектів остаточно не встановлено, а при ендокринних захворюваннях, при гіпотиреозі різного ґенезу дослідження практично відсутні.

Значний ріст патологій щитовидної залози, в першу чергу первинного гіпотиреозу, обумовлено погіршенням екологічного стану оточуючого середовища, йододефіцитом в ряді регіонів країни, наслідками аварії на ЧАЕС та ін. Недостатня кількість гормонів щитовидної залози викликає важкі порушення практично в усіх органах та тканинах, в наслідок чого розвивається гіпотиреоз. Тиреоїдині гормони приймають участь в процесах адаптації організму, впливаючи на співвідношення анаболічних та катаболічних процесів в органах та тканинах. На відміну від багатьох гормонів, які мають більш менш локальну дію на органи чи тканини, тиреоїдині гормони характеризуються досить широким спектром дії. Під їх контролем знаходяться майже всі органи та тканини, всі реакції метаболізму, загальні енерговитрати та споживання кисню. Ці гормони впливають на ріст, розвиток організму та диференціювання тканин до та після народження [1, 4]. Дисбаланс секреторних та інкреторних речовин підшлункової залози може бути однією з імовірних патогенетичних компонентів формування та прогресування метаболічного синдрому. Саме це вимагає подальшого вивчення патогенетичних механізмів формування ускладнень з боку різних органів, а саме підшлункової залози.

Останнім часом увагу привертають омега-3 поліненасичені жирні кислоти. Сучасним аналогом є вітчизняний препарат епадол, який має широкий діапазон дії, протизапальний, антиагрегантний, імуномодулювальний, вазо- і бронходилататорний ефект [2].

У зв'язку з цим, метою дослідження було вивчення гістоструктури підшлункової залози при корекції експериментального післяопераційного гіпотиреозу гормонзамісними препаратами (L-тироксином і кальцитоніном) та епадолом, обґрунтування впливу препарату епадол на перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) та метаболізм при післяопераційному гіпотиреозі.

Для оцінки спрямованості та ефективності дії лікарських засобів був застосований кількісний морфометричний аналіз екзокриноцитів, що дозволило визначити деякі аспекти впливу вивчених препаратів на процеси, які розвиваються у тиреоїдектомованих тварин з гормонзамісною терапією до та після лікування.

Найбільш близьким за технічним вирішенням до способу, що заявляється, є спосіб оцінки впливу Текома в комплексній терапії [3], який виступає як прототип. Досліджувались антиоксидантні, репаративні властивості Текома 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 епадолу, що дозволить проконтролювати якість лікування післяопераційного гіпотиреозу і покращити ефективність фармакотерапії даного захворювання.

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

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який передбачає проведення морфометричних досліджень, згідно корисної моделі, визначають співвідношення одно-, двоядерних екзокриноцитів; кількість темних та світлих екзокриноцитів; процентне співвідношення екзокриноцитів з гранулами та екзокриноцитів в стані екструзії; кількісне співвідношення екзокриноцитів з ліпідними включеннями до та після лікування епадолом, одержані результати порівнюють з контролем і при зміні показників оцінюють ефективність лікування.

Матеріалом для дослідження були фрагменти підшлункової залози щурів-самців лінії Вістар вагою 160-220 гр. Тварини утримувались в умовах віварію Національного медичного університету імені О.О. Богомольця при постійній температурі, достатньому природному освітленні, вільному доступу до стандартного харчування та води. Перша група - тварини через 100 діб після тиреоїдектомії (післяопераційний гіпотиреоз) [5], які отримували гормонзамісну терапію (L-тироксин і кальцитонін). L-тироксин (виробник - "Фармак", Україна) у дозі 10 мг/кг маси тварини, L-тироксин (виробник - "Noventus", Швейцарія) у дозі 1,0 МО/кг маси тварини, як замісну терапію отримували протягом усього експерименту, починаючи з 3 доби після тиреоїдектомії. Друга група тварин, які разом з замісною терапією отримували препарат епадол (виробник - Київський вітамінний завод, Україна) в дозі 0,04 мг/кг маси тіла.

Одним з інформаційних методів оцінки функціонального стану підшлункової залози є метод гістологічного аналізу, який забезпечує об'єктивну оцінку мікоморфологічного статусу будь-якого органу або тканини. Матеріал для загально гістологічних методик обробляли в парафіновій заливці, зрізи фарбували гематоксилін-еозіном та пікрофуксином по Ван-Гізону.

Для електронно-мікроскопічного дослідження ділянки підшлункової залози фіксували розчином глютаральдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією в 1 % розчині OsO_4 та обробляли згідно загально прийнятій для електронно-мікроскопічних досліджень методиці та поміщали у суміш епону та аралдиту. Ультратонкі зрізи контрастували уранілацетатом та цитратом свинцю і фотографували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К. Отримані цифрові дані обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію Стюдента. Результати вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Для контролю стану гіпотиреозу, за допомогою імуноферментного аналізу, вимірювали рівень вільного тироксину у плазмі крові тиреоїдектомованих щурів через 100 діб після операції. Результати ИФА свідчать про гіпофункціональний стан тиреоїдної системи тварин. Морфо-функціональний стан підшлункової залози свідчить про негативний вплив нестачі гормонів щитовидної залози. Структурні зміни клітин на ультраструктурному рівні призводять до функціональних змін органа в цілому.

При застосуванні терапії гормонами щитовидної залози, L-тироксином та кальцитоніном структурна організація підшлункової залози покращується, але не відповідає контролю. Тобто, на ультраструктурному рівні відмічаються екзокриноцити зі змінами, характерними для патологічних процесів (дистрофічні зміни з боку органел, особливо білок синтезуючого апарату та мітохондрій).

Підшлункова залоза тварин, які разом з L-тироксином та кальцитоніном отримували препарат епадол, характеризується покращення структурно-функціонального стану.

Екзокринний апарат складає основну масу залози. Ацинуси мають округлу або овальну форму і складаються з 5-10 (в середньому $4,83 \pm 0,88$) екзокриноцитів. Кожен ацинус оточено тонким сполучно тканинним прошарком, в якому міститься незначна кількість клітин фібробластичного ряду, нервові закінчення, нервові волокна та судини.

Паренхіма підшлункової залози характеризується різноманіттям клітинного складу. Наряду з одноядерними екзокриноцитами (93,07 %) зустрічаються і двоядерні екзокриноцити (6,93 %) (табл.). Співвідношення одноядерних і двоядерних ациноцитів складає 13,3-1", в той час, як при гіпотиреозі співвідношення складає 10:1.

Таблиця

Кількісні характеристики паренхіми підшлункової залози щурів з гіпотиреозом (I) та його корекцією (II)

	Кількість 1-ядерних клітин	Кількість 2-ядерних клітин	Кількість клітин з гранулами	Кількість клітин в стані екструзії
I	$10,58 \pm 1,23$	$1,08 \pm 0,23$	$8,58 \pm 1,57$	$7,67 \pm 1,52$
II	$9,00 \pm 1,61$	$0,67 \pm 0,31$	$6,67 \pm 1,44$	$5,33 \pm 1,16$

У зв'язку з тим, що клітини підшлункової залози знаходяться на різних фазах секреторного циклу спостерігається наявність як світлих, так і темних секреторних клітин. Суттєвих відмінностей від звичайної залози не відмічається. Будь-яка функціонально активна залоза характеризується наявністю клітин, цитоплазма яких має різну електронну щільність. Однак, в паренхімі залози тварин другої групи наряду з одноядерними, двоядерними ациноцитами зустрічаються і багатоядерні клітини. Кількість ядер в таких структурах може бути 3-4 (Фіг... 1)

Диктіосоми комплексу Гольджі не розширені, мають будову притаманну звичайним (патологічно не зміненим) органелам.

Мітохондрії середніх розмірів, помірної електронної щільності. Кристи мітохондрій добре сформовані, з паралельним розташуванням та візуалізуються на електронно-мікроскопічних мікрофотографіях.

В апікальній частині сконцентровані зимогенні гранули, розміри яких сильно варіюють. Слід відмітити, що електронна щільність більшості гранул однакова. Секреторні гранули характеризуються помірною електронною щільністю, що свідчить про завершення процесу синтезу та формування вмісту гранул (Фіг. 2).

Більша частина цитоплазми зайнята гранулярною ендоплазматичною сіткою, цистерни якої утворюють навколо ядра системи каналців, пухирців та мішечків. Цистерни ендоплазматичної сітки дещо укорочені, але значних розширень не утворюють.

При аналізі отриманого матеріалу необхідно враховувати наступне. Препарат епадол, який містить омега-3 ПНЖК, поряд з гіполіпідемічними, антиагрегантними, антикоагулянтними властивостями, має здатність зменшувати прояви оксидативного стресу [6].

Відомо, що біологічні мембрани є важливими структурними та функціональними елементами живих клітин. Дестабілізація мембран призводить до функціональних порушень клітини й організму в цілому. Одним із найпотужніших механізмів деструкції мембран є перекисне окислення ліпідів. Перекисне окислення ліпідів - це ланцюговий аутоокисний радикальний процес, що включає реакції ініціювання, продовження, розгалуження та обриву ланцюгів [7]. Взаємодія активних форм кисню з поліненасиченими жирними кислотами ініціює процеси перекисного окислення ліпідів.

Епадол здатен впливати на патологічні шляхи (циклооксигеназний, ліпооксигеназний), прозапальні медіатори (цитокіни, ейкозаноїди тощо), а також пригнічувати виділення металопротеїназ. Омега-3 поліненасичені жирні кислоти як субстрат для окислення в циклооксигеназному та ліпооксигеназному шляхах сприяє продукції простагландинів і лейкотрієнів, що мають протизапальні властивості. Збільшення вмісту омега-3 ПНЖК у фосфоліпідах клітинних мембран супроводжується пригніченням продукції цитокінів, що відіграють ключову роль у виникненні хронічного запалення.

Результати досліджень свідчать, що омега-3 ПНЖК справляють специфічний вплив на регуляторні механізми, а також на корекцію порушеного ліпідного обміну, що має місце у другій групі тварин.

Відомо, що в умовах гіпотиреозу навіть на субклінічній стадії виникає гіперліпідемія, в наслідок сповільнення швидкості розпаду ліпідів в результаті зниження активності ліпопротеїдліпази, погіршення транспорту та виведення антерогених ліпідів [8, 9].

Ендотелій капілярів залишається потовщеним, але значна кількість мікропіноцитозних пухирців свідчить про активні процеси обміну, транспорту, які відбуваються між капіляром та екзокриноцитами (Фіг. 3).

Оксидативний стрес внаслідок посилення процесів перекисного окислення ліпідів приводить до зниження кислоторезистентності еритроцитів в результаті розвивається порушення мікроциркуляції. За функціональними порушеннями мікроциркуляції ідуть органічні, які характеризуються значною розповсюдженістю та охоплюють периферичне і вісцеральне судинне русло [10].

Морфологічна картина наглядно свідчить про наявність відновлювальних процесів в підшлунковій залозі експериментальних тварин при отриманні комплексу гормонзамісної терапії та епадолу.

Комплексний аналіз (якісних та кількісних показників) показав, що 100 добовий дефіцит гормонів щитовидної залози (викликаний видалення щитовидної залози) позводить до морфологічних змін паренхіми та строми підшлункової залози, що обумовлює зміни в функціонуванні орган.

Застосування епадолу у комплексі із замісною терапією після операційного гіпотиреозу покращує морфо-функціональний стан клітин підшлункової залози, що розкриває нові підходи щодо профілактики та лікування даного стану.

Епадол сприяє покращенню структури кровоносних капілярів та активацію в них процесів трансендотеліального переносу речовин.

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

Джерела інформації:

1. Кандрор В.И. Гормоны щитовидной железы: биосинтез и механизмы действия //Рос. хим. ж. - 2005. - Т.XLIX, № 1. - С. 75-83.

2. Breslow Jan L. N-3 Fatty acids and cardiovascular disease// A.J. of Clinical Nutritio.-2006. - Vol. 83, № 6. - P. 1477-1482.

3. Фещенко Ю.И., Гаврилюк В.К. Омега-3 ПНЖК. Новый лекарственный препарат Теком, Киев, 1996, 124 с.

4. Гіполіпідемічна, гіпокоагуляційна та антиагрегантна дія нового лікарського препарату Теком в експерименті/ Ю.І. Фещенко, В.К. Гаврисюк, В.І. Коржов [та ін.] // Журн. Акад. мед. наук України.-1997. - Т. 3, № 1. - С. 155-164.

5. Стеченко Л.О. Спосіб моделювання гіпотиреозу у щурів /Л.О. Стеченко, В.А. Петренко, П.Л. Бик, В.Р. Кузян, Т.П. Куфтирева //Патент № 27821, МПК G09B23/28(2006.01). Офіційний бюлетень.-2007 р.

6. Кириленко О.Є. Зміни перекісного окислення ліпідів у пацієнтів з ішемічною хворобою
серця під впливом омега-3 поліненасичених жирних кислот /О.Є. Кириленко, Т.В. Кукоба, Т.Д.
Никула //Атеросклероз і ішемічна хвороба серця: сучасний стан проблеми. Артеріальна
гіпотензія як фактор ризику ІХС; профілактика ускладнень. Мат. Пленуму правління українського
наукового товариства кардіологів: Тез. науков. доповідей. Київ, 2003. - С. 81-82.

7. Гринюк С.М. Деякі особливості лікування псоріазу на сучасному етапі //Ліки України.-2008.
- № 5 (121). - С. 69-70.

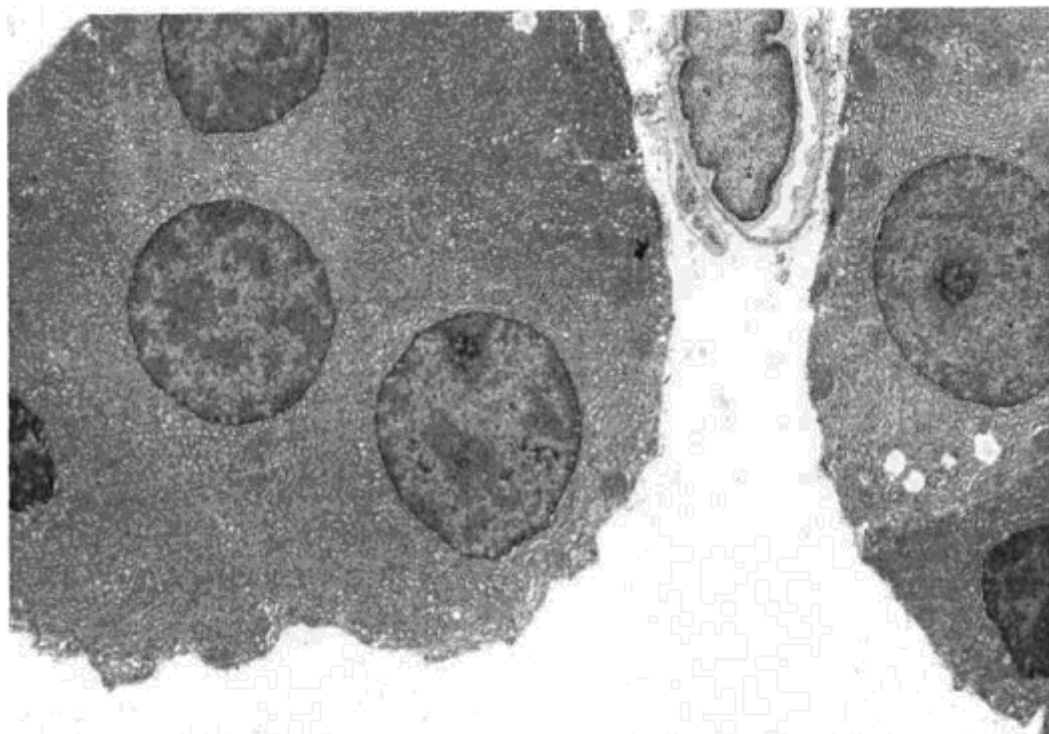
8. Сыч Ю.П. Нарушение липидного обмена при субклиническом гипотиреозе /Ю.П. Сыч, В.В. Фадеев, Г.А. Мельниченко и др. //Проблемы эндокринологии.-2004. - № 3. - С. 48-52.

9. Duntas L.H. Thyroid disease and lipids //Thyroid.-2002. - Vol. 12. - P. 287-293.

10. Гогин Е.Е. Микроциркуляция при ишемической болезни сердца и артериальной
гипертензии /Е.Е. Гогин //Терапевт, архив.-2007. - Т. 78, № 4. - С. 5-9.

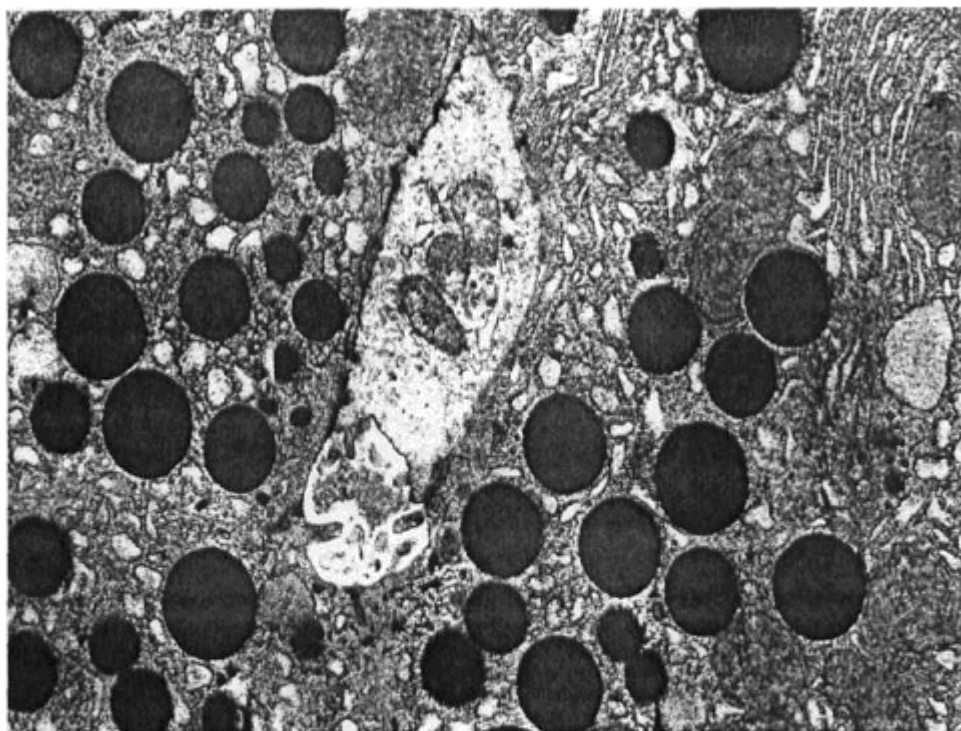
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки ефективності лікування підшлункової залози щурів з післяопераційним
гіпотиреозом, що передбачає проведення морфометричних досліджень, який **відрізняється**
тим, що визначають співвідношення одно-, двоядерних екзокриноцитів, кількість темних та
світлич екзокриноцитів, процентне співвідношення екзокриноцитів з гранулами та
екзокриноцитів в стані екструзії, кількісне співвідношення екзокриноцитів з ліпідними
включеннями до та після лікування епадолом, одержані результати порівнюють з контролем і
при зміні показників оцінюють ефективність лікування.



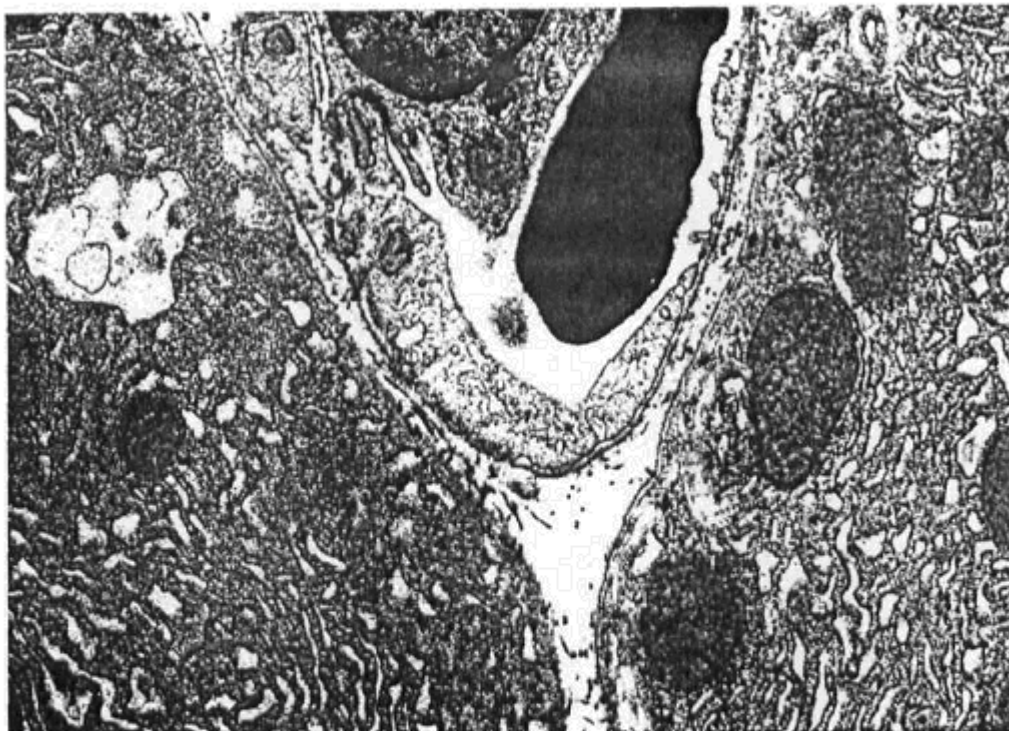
Фрагмент підшлункової залози щурів з післяопераційним гіпотиреозом, які отримували гормонзамісну терапію та епадол. Електронно-мікроскопічна мікрофотографія. 1 - багатоядерний ациноцит, 2 - світлий ациноцит, 3 - темний ациноцит, 4 - капіляр. Шк. 2400.

Фіг. 1



Фрагмент підшлункової залози щурів з післяопераційним гіпотиреозом, які отримували гормонзамісну терапію та епадол. Електронно-мікроскопічна мікрофотографія. 1 - апікальна частина ациноцит, 2 - просвіт ацинуса, 3 - мікроворсинки ациноцита, 4 - секреторні гранули, 5 - комплекс Гольджи, 6 - мітохондрії. Зб. 8000.

Фіг. 2



Фрагмент підшлункової залози щурів з післяопераційним гіпотиреозом, які отримували гормонзамісну терапію та епадол.
Електронно-мікроскопічна мікрофотографія. 1 - екзокриноцит, 2 - мітохондрії, 3 - ендоплазматична сітка, 4 - мітохондрії, 5 - ендотелій капіляру, 6 - піноцитозні пухирці, 7 - еритроцит. Зб. 9600.

Фіг. 3