



УКРАЇНА

(19) UA (11) 22266 (13) U
(51) МПК
G09B 23/28 (2007.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПИЛКОМ КВІТКОВИМ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ

1

(21) u200609658
(22) 08.09.2006
(24) 25.04.2007
(46) 25.04.2007, Бюл. № 5, 2007 р.
(72) Пішак Василь Павлович, Захарчук Олександр Іванович, Пішак Ольга Василівна, Магальяс Віктор Миколайович, Висоцька Віолетта Георгіївна, Сук Тетяна Іванівна
(73) Магальяс Віктор Миколайович

2

(57) Спосіб лікування пилком квітковим на експериментальній моделі ревматоїдного артриту, який відрізняється тим, що тваринам внутрішньошлунково вводять індометацин в дозі 5мг/кг маси тіла протягом трьох діб та пилко квітковий (бджолину обніжку) - в дозі 250мг/кг маси тіла протягом п'яти діб, починаючи з десятої доби ревматоїдного артриту.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до патологічної фізіології, ревматології і може бути використаним у науково-практичній діяльності та при виконанні дослідній роботі.

Експериментальна модель ревматоїдного артриту (РА) створювалась в першу чергу для вивчення найбільш ймовірних і важливих ланок патогенезу захворювання і розробки нових методів медикаментозного лікування.

Всі описані моделі РА об'єднує наявність виражених порушень в системі імунітету.

Однією з найпоширеніших і зручних моделей є ад'ювальний артрит (АА). У щурів з АА відсутні властивості РА серологічні зсуви, інтермітуючий перебіг хвороби і лімфоїдні фолікули в синовіальній оболонці, лімфоплазмоцитарна інфільтрація синовії не буває настільки масивною, як у людини: імунофлюоресцентне дослідження не виявляє місцевого синтезу імуноглобулінів, відмічається різко виражена тенденція до остеобластичної реакції. Вже в перші дні розвитку АА у щурів визначається проліферація клітин синовіальної оболонки. В периакулярних тканинах, в сухожилках, котрі до них прилягають, і в підшкірній клітковині виникає лімфогістіоцитарна і еозинофільна інфільтрація. Через тиждень після появи вишівіти градуляційна тканина розповсюджується на бокові поверхні хряща шаром проліферативних клітин. Панус росте в хрящі і виникає його зруйнування, одночасно відбувається системне пошкодження сполучної тканини зятуванням у процес серця, легень, печінки, нирок, лімфатичних вузлів і тимусу [Волошин О.І., Вдовічен А.М., Андрієць В.Т. та ін.

Загальні особливості клініки, перебігу та лікування деяких захворювань системи травлення у жителів Чернівецької області, що проживають на забруднених територіях //Хірург, пробл. і екологія. Матер. Симп. -Чернівці, 1995. -С.63-64; Пішак О.В. Особливості порушень гастродуоденальної, гепатобіліарної системи і нирок при ревматоїдному артриті і патогенетичні способи їх корекції: Автор. дис. канд. мед. наук. - Івано-Франківськ. -1995. -29с.]

Зміни в суглобах, в внутрішніх органах, лімфоїдній системі у щурів з АА морфологічно відповідають як гіперчутливості сповільненого, так і негайного типів, і являють собою імунологічну реакцію організму на дисемінацію ад'юванта фрейнда.

Включення імунологічних механізмів в патогенез АА з'єднує його з РА людини, тому аналіз характеру запальної реакції і порушень функціонального стану органів при експериментальній моделі дає цінну інформацію про окремі важливі ланки патогенезу РА.

Експерименти виконувались на 194 білих щурах популяції Вістар, масою 140-180г. в роботі використана модель Пірсона в модифікації G.Beneke, M.Nohe (1970).

У тканинах визначається вміст дієнових кон'югатів (ДК) та молонового альдегіду (МА), простагландини групи Е (ПГЕ) і лейкотрієни В₄ (ЛТВ₄).

У шлунку, печінці і нирках досліджували активності супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) та каталази.

Проаналізовано вміст ейкозаноїдів і фібринолітичну активності тканин цих органів. Функцію

(19) UA (11) 22266 (13) U

нирок вивчено в умовах водного навантаження (5% від маси тіла).

У відповідності із завданням експерименту тваринам внутрішньо-шлунково вводили індометацин (Indometacin, Gebro) в дозі 5мг/кг маси тіла протягом трьох діб, ПК (бджолину обніжку) - в дозі 250мг/кг маси тіла протягом п'яти діб, починаючи з десятої доби АА.

Ми не зустріли робіт по вивченню ролі периксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в розвитку вісцеральної патології при РА, що пов'язано з проблемою біопсії органів. Вміст продуктів ПОЛ та активність ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ) в тканинах шлунка (табл.1), печінки (табл.2) і нирок (табл.3) вивчалися нами на експериментальній моделі РА. При цьому встановлено, що у щурів з АА активуються процеси ПОЛ, у функціональному відділі шлунка.

Рівень ДК зростав у 6,4 рази, із тенденцією до збільшення МА, інтенсивність каталазної реакції збільшувався в три рази, активність ГПО зростала на 538% із незначними підвищенням активності СОД.

Під впливом індометацину вміст ДК у шлунку збільшився на фоні гальмування активності СОД та ГПО і зменшенням інтенсивності каталазної реакції.

У тканині печінки простежена тенденція до підвищення рівня ДК та зменшення МА. Очевидно, ці незначні зміни зумовлені зростанням активностей СОД і каталази, спрямованих на запобігання пероксидації ліпідів на рівні гідроксильного радикалу.

Після призначення індометацину спостерігалось збільшення кількості МА та різке падіння активності СОД. Суттєвих змін глутатіонпероксидазної реакції не спостерігалось.

У нирках рівень ДК зменшився щодо контролю в 2,5 рази без змін МА. Це зумовлено "перехопленням" вільних радикалів кисню за рахунок ейкозаноїдів і антигіпертензивних ліпідів мозгової речовини. Звідси стає зрозумілим, чому за умов зниження активності каталази і ГПО.

Зменшується рівень первинних продуктів ПОЛ. При гальмуванні синтезу ПГ в нирках щурів з АА рівень ДК збільшився у 2,5 рази з тенденцією до зростання вмісту МА, активацією каталазної і глутатіонпероксидазної реакції. При цьому активності СОД вірогідно не змінювалась, а рівень первинних продуктів ПОЛ не перевищував контрольних величин.

Отже, при АА підвищується вміст первинних і проміжних продуктів ПОЛ у тканинах шлунку і печінки. Індометацин підсилює вільнорадикальні процеси не тільки в цих органах, але і з нирками.

Ці зміни супроводжуються зменшенням ферментів антирадикального захисту (табл.1-3). За умов водного навантаження при АА зміни функціонального стану нирок повною мірою відповідають порушенню діяльності нирок у хворих на РА. Введення індометацину викликає у щурів з АА погіршення роботи судинно-клубочкового і каналцевого апарату нейрона, активацію ПОЛ і у нирках, що супроводжується зростанням пошкодження нефроцитів.

Відповідно до отриманих експериментальних даних, а також на підставі літературних джерел про зниження активності каталази при РА, пригнічення антиоксидантної системи крові, підвищення ПОЛ, яке пошкоджує тканини і органи у хворих на РА [Пішак О.В. Особливості порушень гастродуоденальної, гепатобілярної системи і нирок при ревматоїдному артриті і патогенетичні способи їх корекції: Автор, дис. канд. мед. наук. - Івано-Франківськ. -1995. -29с.], проводилося експериментальне дослідження можливості корекції пероксидації у щурів з АА, які отримували індометацин, за допомогою ПК.

Встановлено, що призначення ПК з десятої по п'ятнадцяту добу АА призводило до зменшення рівня МА у тканині фундаментального відділу шлунка і печінки. Значнішим був вплив ПК на вміст у тканинах дієнових кон'югатів. В фундаментальному відділі шлунка рівень останніх знижувався в 3,3 рази, у печінці простежувалась тенденція до зниження вмісту ДК, а в нирках кількість цих первинних продуктів ПОЛ зменшувалась у чотири рази. В печінці і шлунку проявилась тенденція до зниження вмісту МА.

ПК сприяв активації ферментів антирадикального захисту: зростала активність СОД у шлунку на 72%, у печінці на 94% і в нирках на 31%, з тенденцією до зменшення каталази в цих органах. Це було пов'язано, можливо, з тим, що нейтралізація перекису водню забезпечувалась в шлунку і печінці за рахунок глутатіонпероксидазної реакції: активність цього ферменту у тканинах фундаментального відділу шлунка зростала в 1,5 рази, з тенденцією до її підвищення в печінці. Проте в кортикальній тканині нирок активність ГПО практично не змінювалась.

Механізм інгібуючої дії ПК на процеси ПОЛ в органах, що досліджувалися, може бути пов'язаним з підвищенням активності СОД, а в тканинах шлунка і печінки - з індукцією глутатіонпероксидазної реакції. Проте, повністю пояснити антиоксидантний ефект ПК за рахунок активації ферментних реакцій антирадикального захисту не уявляється можливим, особливо в нирках, де активність каталази зменшується, а ГПО залишається без змін.

Відомо, щодо антирадикальних препаратів природного походження належать токоферолі, а в склад ПК входить один з восьми існуючих видів токоферолів - вітамін Е, який володіє найбільшою антиоксидантною активністю. Окрім того, ПК містить в собі велику кількість флавоноїдів, котрі мають антиоксидантну дію і попереджують процеси ПОЛ.

Оскільки ПК вміщує поліненасичені жирні кислоти, зокрема арахідонову, котра є джерелом ПГ, доцільно було дослідити вплив ПК на метабілізм серахідонату в тканинах шлунка, печінки і нирок у щурів з АА.

Призначення ПК тваринам з АА, котрі отримували індометацин, призводило до збільшення вмісту ПГЕ в тканині фундаментального відділу шлунка у три рази, тоді як рівень ЛТВ₄ не зазнавав змін. У кортикальній тканині нирок встановлено значне (на

200%) підвищення рівня ПГЕ та різке зменшення кількості (у 9,6 рази) ЛТВ₄.

Таким чином, під впливом ПК у щурів з АА, які лікувалися індометацином, сталася перебудова метаболізму арахідонової кислоти, яка полягала в підвищенні рівня ПГЕ і зниженні утворення ЛТВ₄. Вплив ПК на процеси ПОЛ, окислювальне перетворення арахідонату є наслідком комплексної дії флавоноїдів, токоферолів і каротиноїдів, які у великій кількості містяться в бджолиній обніжці.

Оскільки ЛТВ₄ різко підсилює хемотаксис нейтрофілів, моноцитів і макрофагів, що сприяє міграції клітин в зону запалення, вибіркова інгібіція ЦОГ індометацином призводить до посилення ліпоксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти, потенціює судинні ефекти ЛТ і сприяє тенденції супероксидативного радикалу. ЛТ збільшує агрегацію тромбоцитів, а також синтез останніми тромбозитів, а також синтез останніми тромбоксану А₂, що активує первинний гемостаз і підвищує внутрішньо- та позасудинний фібриногенез [Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука. 1972. -272с.].

Встановлене у процесі експерименту пригнічення утворення ЛТ під впливом ПК повинно сприяти покращенню мікроциркуляції і попереджувати порушення тромбоцитарно-судинного гемостазу у хворих на РА. оскільки введення ПК викликає у щурів гіперкоагуляцію. Про значний вплив ПК на первинний гемостаз засвідчує зниження індексу спонтанної агрегації тромбоцитів до нуля.

За отриманими даними у тканинах шлунка. ПК підвищував СФА за рахунок ферментного фібринолізу, тоді як НФА мала тенденцію до збільшення. В печінці тканинний фібриноліз під впливом ПК знижувався. В нирках відбувалося падіння СФА за рахунок ферментативного фібринолізу, але НФА мала слабку тенденцію до підвищення. Це дає підстави розцінювати зниження тканинного фібринолізу у печінці і нирках як вторинне, пов'язане із зменшенням фібриногенезу під впливом ПК.

Зниження тканинного фібринолізу в печінці і нирках як вторинне, пов'язане із зменшенням фібриногенезу під впливом ПК.

Слід вважати, що при справедливості цього судження функціональний стан органів, а саме нирок, повинен покращуватись.

Пригнічення синтезу ЛТ в нирках і зниження тканинної фібринолітичної активності під впливом ПК у щурів з АА супроводжується покращенням функціонального стану.

Підводячи підсумок експериментальній частині дослідження зазначено, що ПК володіє ефектом цитопротекції, мембраностабілізуючою дією, регулює метаболізм арахідонату, блокує синтез лейкотриєнів, активує синтез білка і покращує енергообмін у тканинах шлунка, печінки і нирок, сприяє гіпокоагуляції і вторинному зменшенню тканинного фібринолізу в печінці і нирках, пригнічує процеси перекисного окиснення ліпідів, активує систему ферментативного антирадикального захисту та поліпшує функціональний стан нирок.

Результати експериментальних досліджень дають підстави рекомендувати застосування ПК як

засобу патогенетичної терапії другорядних порушень функціонального стану шлунка, печінки і нирок у хворих на РА. Вище викладені дослідження є основою для способу експериментальної моделі ревматоїдного артриту (РА) та лікування пилком квітковим (ПК) - бджолиною обніжкою.

Мета корисної моделі. Розробити спосіб експериментальної моделі ревматоїдного артриту (РА) та лікування пилком квітковим (ПК).

Поставлена мета досягається тим, що тваринам внутрішньошлунково вводили індометацин (Indometacin, Gebro) в дозі 5мг/кг маси тіла протягом трьох діб, ПК (бджолину обніжку) - в дозі 250мг/кг маси тіла протягом п'яти діб, почи:аючи з десятої доби РА.

Технічне рішення способу експериментальної моделі ревматоїдного артриту (РА) та лікування пилком квітковим (ПК) здійснюється уведенням тваринам внутрішньо-шлунково індометацину (Indometacin, Gebro) в дозі 5мг/кг маси тіла протягом трьох діб, ПК (бджолину обніжку) - в дозі 250мг/кг маси тіла протягом п'яти діб, починаючи з десятої доби РА (в роботі використана модель Пірсона в модифікації G.Beneke, M.Nohe, 1970 року).

Суть даного способу заключається в тому, що спосіб експериментальної моделі ревматоїдного артриту (РА) та лікування пилком квітковим (ПК) необхідний для покращення лікування РА пилком квітковим (бджолину обніжку).

Спосіб експериментальної моделі ревматоїдного артриту (РА) та лікування пилком квітковим (ПК) полягає у покращенні біохімічних показників при лікуванні РА пилком квітковим.

Відповідність критерію "новизна" даного способу полягає в тому, що вперше використовується пилко квітковий (бджолину обніжку) у лікуванні РА.

Відповідність критерію "суттєві відмінності" даного способу полягають у тому, що на відміну від попередніх досліджень на ревматоїдний артрит при лікуванні індометацином (Indometacin, Gebro) в дозі 5мг/кг маси тіла протягом трьох діб, нами ще використаний і пилко квітковий (бджолину обніжку) - в дозі 250мг/кг маси тіла протягом п'яти діб, починаючи з десятої доби РА, для покращення результатів лікування.

Відповідність даної корисної моделі критерію "позитивний ефект" забезпечується результатами експериментальних досліджень, які засвідчують ефективність лікування експериментальної моделі ревматоїдного артриту (РА) та лікування пилком квітковим (ПК).

Література

1. Владимир Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. -272с.

2. Волошин О.І., Вдовічен А.М., Андрієць В.Т. та ін. Загальні особливості клініки, перебігу та лікування деяких захворювань системи травлення у жителів Чернівецької області, що проживають на забруднених територіях //Хірург, пробл. і екологія. Матер. Симп. - Чернівці, 1995. -С.63-64.

3. Пішак О.В. Особливості порушень гастродуоденальної, гепатобіліарної системи і нирок при ревматоїдному артриті і патогенетичні способи їх

корекції: Автор, дис. канд. мед. наук. - Івано-Франківськ. -1995. -29с.

Таблиця 1

Вплив індометацину на переокисне окислення ліпідів і активність ферментативних систем антиоксидантного захисту в фундальному відділі шлунка щурів з ад'ювантним артритом ($\bar{x} \pm S_x$)

Досліджувані показники	Контроль n=5	Індометацин n=5 1 група	АА, n=6 2 група	АА+ індометацин n=7 3 група
Дієнові кон'югати, нмоль/мг білку	0,53±0,12	2,61±0,99	3,39±0,69 p<0,05	3,87±0,86
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білку	0,79±0,07	1,39±0,28	0,96±0,04	0,84±0,10
Супероксиддисмутаза, Од/мг білку/хв.	1,48±0,10	2,30±0,20	2,68±0,55	1,46±0,08 p ₁ <0,01 p ₂ <0,05
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /мг білку/хв.	24,87±1,90	63,20±9,95 p<0,01	84,01±19,62 p<0,02	65,69±13,56
Глутатіонпероксидаза GSH/мг білку/хв.	0,32±0,06	3,75±0,49 p<0,001	2,04±0,16 p<0,001	1,26 ±0,15 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01

p - ступінь вірогідності різниць показник у порівнянні з контролем
p₁ - ступінь вірогідності різниць показників у 1 і 3 групах щурів
p₂ - ступінь вірогідності різниць показників у 2 і 3 групах щурів
n - кількість спостережень.

Таблиця 2

Вплив індометацину на пероксидне окислення ліпідів і активність ферментативних систем антиоксидантного захисту в печінці щурів з ад'ювантним артритом ($\bar{x} \pm S_x$)

Досліджувані показники	Контроль, n=5	Індометацин n=6, 1 група	АА n=6 2 група	АА+ індометацин n=7, 3 група
Дієнові кон'югати, нмоль/мг білку	0,28±0,03	0,30±0,11	0,86±0,26	0,46±0,07
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білку	0,80±0,05	0,80±0,15	0,59±0,09	0,92±0,12 p ₂ <0,02
Супероксиддисмутаза, Од/мг білку/хв.	0,26±0,02	0,28±0,02	0,40±0,03 p<0,01	0,16±0,02 p ₁ <0,01 p ₂ <0,001
Каталаза мкмоль H ₂ O ₂ /мг білку/хв.	23,47±12,39	22,37±1,35	31,23±2,51 p<0,05	28,76±762,13 p ₁ <0,05
Глутатіонпероксидаза, GSH/мг білку/хв.	0,24±0,07	0,32±0,08	0,30±0,04	0,37±0,04

p - ступінь вірогідності різниць показник у порівнянні з контролем
p₁ - ступінь вірогідності різниць показників у 1 і 3 групах щурів
p₂ - ступінь вірогідності різниць показників у 2 і 3 групах щурів
n - кількість спостережень.

Таблиця 3

Вплив індометацину на пероксидне окислення ліпідів і активність ферментативних систем антиоксидантного захисту в печінці щурів з ад'ювантним артритом ($x \pm Sx$)

Досліджувані показники	Контроль, n=5	індометацин n=6, 1 група	AA n=6 2 група	AA+ індометацин n=7, 3 група
Дієнові кон'югати, Нмоль/мг білку	0,52±0,04	0,24±0,08	0,21±0,005 p<0,001	0,53±0,07 p ₁ <0,02 p ₂ <0,01
Малоновый діальдегід, нмоль/мг білку	1,17±0,08	0,92±0,07 p<0,05	1,04±0,09	1,19±0,12
Супероксиддисмутаза, Од/мг білку/хв.	0,46±0,01	0,55±0,03 p<0,05	0,43±0,05	0,32±0,02 p ₁ <0,001
Каталаза мкмоль P202/мг білку/хв.	36,62±1,13	36,93±1,54	31,59±0,82 p<0,01	36,05±3,5
Глутатіонпероксидаза, GSH/мг білку/хв.	0,52±0,02	0,55±0,03	0,30±0,03 p<0,001	0,47±0,05 p ₂ <0,001

p - ступінь вірогідності різниць показник у порівнянні з контролем

p₁ - ступінь вірогідності різниць показників у 1 і 3 групах щурів

p₂ - ступінь вірогідності різниць показників у 2 і 3 групах щурів

n - кількість спостережень.

Таблиця 4

Вплив пилку квіткового (бджолоїної обніжки) на вміст простагландину E та лейкотрієну B₄ в тканині фундального відділу шлунка щурів з ад'ювантним артритом ($x \pm Sx$)

Група щурів	ПГЕ, нг/г тканини	ЛТВ ₄ , нг/г тканини
Контроль, n=5	15,22±2,19	4,62±1,44
Введення індометацину, n=6; 1 група	1,14±0,27 p<0,001	14,06±1,63 p<0,01
AA, n=6; 2 група	22,13±2,93	7,86±1,17
AA + введення індометацину, n=7, 3 група	4,71±0,94 p ₁ <0,01	55,14±7,74 p ₁ <0,001
AA + введення індометацину і ПК, n=7, 4 група	p ₂ <0,001 14,26±1,41 p ₃ <0,001	p ₂ <0,001 5,68±1,10 p ₃ <0,001

p - ступінь вірогідності різниць показників у порівнянні з контролем

p₁ - ступінь вірогідності різниць показників у порівнянні з 1 групою щурів

p₂ - ступінь вірогідності різниць показників у порівнянні з 2 групою щурів

p₃ - ступінь вірогідності різниць показників у порівнянні з 3 групою щурів

n - кількість спостережень