



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35208 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 31/00
G09B 23/28 (2008.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ ЕПІТАЛОНОМ ПОКАЗНИКІВ ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНОГО СТАНУ КРОВІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ МОДЕЛЮВАННІ ІМОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ У СТАРИХ ЩУРІВ НА ФОНІ ЗМІНЕНОГО ФОТОПЕРІОДУ**

1

(21) u200803518
(22) 19.03.2008
(24) 10.09.2008
(46) 10.09.2008, Бюл.№ 17, 2008 р.
(72) ПІШАК ВАСИЛЬ ПАВЛОВИЧ, UA, ЛОМАКІНА
ЮЛІЯ В'ЯЧЕСЛАВІВНА, UA
(73) БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ МОЗ УКРАЇНИ, UA

2

(57) Спосіб корекції епіталом показників про- та антиоксидантного стану крові при експериментальному моделюванні іммобілізаційного стресу у старих щурів на фоні зміненого фотоперіоду, що включає використання препарату епіталон, який відрізняється тим, що епіталон уводять у дозі 0,17 мкг/100 г маси тіла щура внутрішньом'язово.

Корисна модель належить до медицини, а саме до біології, експериментальних досліджень та може бути використана при корекції показників про- та антиоксидантного захисту в дрібних лабораторних тварин при старінні та моделювання іммобілізаційного стресу на фоні зміненого фотоперіоду, а також при виконанні експериментальних досліджень.

Особливістю демографічної ситуації в розвинутих країнах на початку ХХ століття є прогресуюче збільшення середньої тривалості життя людей. Старіння населення посилює навантаження на геронтологічні служби і підрозділи медичних установ. Для розв'язання виникаючих проблем актуальною є розробка та випробування нових лікарських засобів - геропротекторів, і зокрема препаратів, які затримують процес старіння. Розкриття основних закономірностей процесу старіння розширює можливості практичної медицини, оскільки дозволяє проводити профілактичні, діагностичні і лікувальні заходи щодо попередження прискореного старіння [Анисимов В.Н. Средства профилактики преждевременного старения (геропротекторы) // Успехи геронтологии. - 2000. - №4. - С.55-74., Мещишен І.Ф., Пішак В.П., Заморський І.І. Мелатонін: обмін та механізм дії // Бук.мед.вісник. - 2001. - Т.5, №2. - С.3-15.]

На сьогодні найбільш обґрунтованою є вільнорадикальна теорія старіння. Відповідно до цієї теорії, вільні радикали, які утворюються в результаті різноманітних окисних реакцій в організмі, викликають пошкодження ліпідів та біополімерів, що

в кінцевому результаті призводить до їх деградації та старіння [Анисимов В.Н. Средства профилактики преждевременного старения (геропротекторы) // Успехи геронтологии. - 2000. - №4. - С.55-74., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. - М., 2004. - 215с.]. Найбільш вивченими є радикали кисню, які утворюються в результаті його одноелектронного відновлення та протонування. Володіючи високою реакційною здатністю, вони отримали назву активних форм кисню (АФК). У клітині існують системи захисту від АФК та інших радикалів, які об'єднані під загальною назвою антиоксиданти [Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-восстановительный гомеостаз в норме и патологии / Под общ. ред. Ю.А. Зозули. - К.: Наук. думка, 1997. - 420с.]. Звідси витікає необхідність пошуку серед геропротекторів речовин, які б володіли антиоксидантними властивостями.

Не з'ясованим залишається питання про механізм впливу епіталону на стан саме таких показників антиоксидантного захисту (каталаза, церулоплазмін (ЦП)) та пероксидного окиснення ліпідів (малоновий альдегід (МА) та окисну модифікацію білків (ОМБ)) у старих щурів за умов одногодинного іммобілізаційного стресу (1С) на фоні зміненого фотоперіоду.

Найближчим до способу, що заявляється, є спосіб корекції епіталом антиоксидантних змін щурів [патент України на корисну модель №23176 «Спосіб антиоксидантної дії епіталону при стресі в

UA (11) 35208 (13) U

лабораторних тварин»] шляхом уведення епіталону внутрішньом'язово. Спосіб-прототип здійснюється наступним чином: щурам вводять внутрішньом'язово в дозі 0,5мг/кг маси тіла епіталон 2 рази на добу.

Недоліками прототипу є те, що не вивчався вплив епіталону на показники про- та антиоксидантного стану крові старих щурів за умов зміненого фотоперіоду та іммобілізаційного стресу.

Нами пропонується рішення, що усуває вказані недоліки.

В основу корисної моделі поставлене завдання удосконалити спосіб корекції епіталонем показників про- та антиоксидантного захисту при моделюванні іммобілізаційного стресу в умовах зміненого фотоперіоду шляхом призначення епіталону в іншому дозуванні для забезпечення урахування впливу на показники про- та антиоксидантного захисту в щурів при іммобілізаційному стресі та старінні.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі корекції епіталонем показників про- та антиоксидантного захисту при моделюванні іммобілізаційного стресу в умовах зміненого фотоперіоду в старих щурів шляхом призначення епіталону, згідно до корисної моделі, епіталон вводять у дозі 0,17мг/100г маси тіла щура внутрішньом'язово.

Спільними ознаками прототипу та рішення, що заявляється, є призначення епіталону для корекції змін системи про- та антиоксидантного захисту внутрішньом'язово. Корисна модель відрізняється від прототипу тим, що епіталон вводять в іншій дозі: 0,17мг/100г маси тіла щура.

Теоретичне підґрунтя для застосування способу.

За останні роки отримані переконливі дані, які свідчать про присутність в епіфізі мозку пептидів, що здатні здійснювати інформаційний зв'язок між різними клітинними групами і, таким чином, впливати на їх функціональну активність [Мещишен І.Ф., Пішак В.П., Заморський І.І. Мелатонін: обмін та механізм дії // Бук.мед.вісник. - 2001. - Т.5, №2. - С.3-15., Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. - СПб.: Наука, 2003. - 223с.].

За даними аналізу амінокислотної послідовності пептидів епіфіза мозку в Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології ПЗО РАН синтезований тетрапептид епіталон (Ала-Глу-Асп-Глі). Попереднє вивчення даного пептиду показало, що він володіє геропротекторною дією, що диктує необхідність більш глибокого вивчення механізмів цієї дії [Хавинсон В.Х., Мильников С.В. Влияние эпиталона на возрастную динамику ПОЛ у *Drosophila Melanogaster* // Бюл. эксперим. биол. и медицины. - 2006. - Т.130, №11. - С.585-588., Dipeptide vilon as immunomodulator in radiation model of premature ageing / I.Knyazkin, P.Zezjuln, N.Bykov, A.Trofimiv // VI European Congress on Clinical Gerontology. - Moscow, 2002. - P.126-127.].

Відомі на сьогодні дані щодо аналізу змін ферментного (супероксидди-смутаза - СОД, каталаза) і неферментного (вітамінів А та Е) ланок АОС в органах і тканинах щурів при різних світлових проміжках і уведенні мелатоніну та епіталону. В органах 6-місячних тварин виявлено відносно високу стійкість АОС до змін світлового проміжку, а також

до уведення мелатоніну та епіталону. Неферментна ланка АОС (вітаміни А та Е) - виявилася більш чутливою як до світлового проміжку, так і до уведених препаратів. Максимальну кількість змін активності антиоксидантних ферментів та жиророзчинних вітамінів під впливом препаратів відмічено у групі тварин, яких утримували за умов постійного освітлення, а мінімальну - в умовах природної зміни дня і ночі. Найбільш чутливими до експериментальних впливів виявився рівень активності СОД і каталази у печінці і нирках, при цьому зміни під впливом мелатоніну і постійної темряви в більшості випадків були односпрямованими, та під впливом мелатоніну та епіталону відрізнялися [Виноградова І.А., Ілюха В.А., Ільїна Т.Н., Узенбаєва Л.Б., Федорова А.С. Влияние мелатонина и эпиталона на антиоксидантную систему крыс зависит от светового режима // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 2006. - N 3. - С.22-26.].

У Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології ПЗО РАН вивчали вплив епіталону на вікову динаміку ПОЛ у інадаптивних ліній *Drosophila Melanogaster*. Встановлено, що одноразове уведення епіталону на личинковій стадії знижує рівень кон'югованих гідроперекисей та основ Шиффа впродовж всього життя імаго. Охарактеризовані міжлінійні і міжстатеві різниці динаміки досліджуваної ознаки [Хавинсон В.Х., Мильников С.В. Влияние эпиталона на возрастную динамику ПОЛ у *Drosophila Melanogaster* // Бюл. эксперим. биол. и медицины. - 2006. - Т.130, №11. - С.585-588.].

Спосіб здійснюється наступним чином.

При моделюванні іммобілізаційного стресу в старих щурів в умовах зміненого фотоперіоду щурам вводять епіталон внутрішньом'язово у дозі 0,17мг/100г маси тіла щура.

Приклад практичного застосування способу.

Нами було проведено дослідження ефективності використання способу, що заявляється. Дослідження виконано на 54 старих (20-24міс) нелінійних білих щурах-самцях масою 300±10г. Впродовж 1міс до початку та протягом експерименту тварин утримували у віварії за умов сталої температури (18-21°C), вологості повітря (50-55%) в окремих клітках з вільним доступом до води та їжі. Фотоперіодичні зміни в організмі тварин моделювали впродовж 1 тижня шляхом зміни режимів освітлення за допомогою лампи штучного світла (інтенсивність освітлення не менше 500 Лк: 1) 12.00С (світло): 12.00Т(темрява); 2) 24.00С:00Т; 3) 00С:24.00Т. Іммобілізаційний стрес моделювали на 8-му добу експерименту шляхом утримування тварин впродовж 1год у пластикових клітках-пеналах.

Для проведення дослідження використовували синтетичний пептид шишкоподібної залози - епіталон у дозі 0,17мг/100г щура, в/м, синтезований у Санкт-Петербурзькому інституті біорегуляції та геронтології ПЗО РАН (Росія). Декапітацію тваринам проводили о 14.00год під легким ефірним наркозом згідно з положеннями "Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях" (Страсбург, 1986). За 24год до експерименту тварин утримували без їжі з вільним

доступом до води. Цільну кров стабілізували розчином ЕДТА (1,0 мг/мл крові), розділяли на плазму (центрифугування при 3000 об/хв, 15 хв) і еритроцити (з триразовим промиванням охолодженим фізіологічним розчином натрію хлориду). У плазмі крові визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. - Мн.: Интерпрессервис, 2003. - Т.2. - С.74-75.] і HS-груп [Мещишен І.Ф., Григорьева Н.П. Метод кількісного визначення HS-груп у крові // Бук. мед. вісник. -2002. - Т.6, №2 - С.190-192.] та ОМБ [Мещишен І.Ф. Метод визначення окисно-модифікованих білків плазми (сироватки) крові / Бук. мед. вісник. - 1998. - Т.2, №1. - С.156-158]; в еритроцитах - рівень малонового альдегіду та активність каталази [Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. - Мн.: Интерпрессервис, 2003. - Т.2. - С.74-75.]. Отримані результати оброблені методом варіаційної статистики за допомогою програми "BIOSTAT".

Результати проведених досліджень вказують на те, що одногодичний іммобілізаційний стрес у старих щурів за умов 12.00С:12.00Т впродовж семи діб викликав активацію ПОЛ (рівень малонового альдегіду зростав на 46,0%) та окисної модифікації білків (показник ОМБ зростав вдвічі порівняно з контролем). За цих же умов експерименту активність каталази еритроцитів та вміст HS-груп у плазмі крові зменшилися на 51,6 і 42,7% відповідно, а рівень церулоплазміну підвищився на 80,8% (табл.2).

Уведення стресованим тваринам епіталону наближало рівні в крові МА, ОМБ та активність каталази до норми; рівень ЦП та HS-груп проявляв чітку тенденцію наближення до величин контролю.

Постійне освітлення (тварини четвертої групи) посилює (у 2,5 рази) окисну модифікацію білків плазми крові та активацію каталази (на 24,6%). Відносно інших показників, то вони не відрізнялися від тварин контрольної групи (12.00С:12.00Т). Іммобілізаційний стрес на фоні тривалого освітлення призводив до різкого підвищення в крові вмісту МА (на 55,6%) та ОМБ (майже втричі порівняно з контролем) і незначного зростання величини церулоплазміну (на 30,0%). Активність каталази та рівень HS-груп знижувалися на 38,4 і 32,7% відповідно. Уведення епіталону на фоні постійного освітлення та іммобілізаційного стресу призвело до вираженої тенденції щодо нормалізації вивчених показників: рівні в крові МА (зменшився на 7,3%), ОМБ (зменшився на 47%) та церулоплазміну (на 25%), а активність каталази та вміст HS-груп наблизилися до рівня контролю.

За умов постійної темряви жоден із досліджуваних показників про- та антиоксидантної системи не зазнавали вірогідних змін порівняно з тваринами контрольної групи.

Іммобілізаційний стрес на фоні тижневої темряви викликав, як і у всіх попередніх дослідних групах тварин, підвищення в крові рівня МА, ОМБ, церулоплазміну та зниження активності каталази та вмісту HS-груп. Уведення таким тваринам епіталону нормалізувало показники МА (зменшення на 25%), ОМБ (зменшення на 42%), каталази (підвищення на 41%) та ЦП (зменшення на 18%), а вміст HS-груп залишався вірогідно нижчим порівняно з тваринами контрольної групи.

Проведені дослідження вказують на те, що гіпофункція (постійне освітлення) та гіперфункція (постійна темрява) епіфіза мозку по-різному впливають на показники про- та антиоксидантної стану крові старих щурів. Так, при гіпофункції шишкоподібної залози (7-ми добове освітлення) має місце активація процесів ліпопероксидації, окиснювальної модифікації білків та пригнічення антиоксидантного захисту, тоді як при гіперфункції (7-ми добова темрява) не спостерігається вірогідних змін цих показників щодо контролю. Цей факт можна пояснити різною функціональною активністю шишкоподібної залози залежно від світлового періоду доби.

Іммобілізаційний стрес за умов зміненого фотоперіоду викликає різку активацію вільнорадикальних процесів на фоні зниження антиоксидантного захисту крові старих щурів. Уведення тваринам епіталону за цих умов призводить до нормалізації досліджуваних показників, що може вказувати на його безпосередню (як месенджера вільних радикалів), чи посередню (через продукцію мелатоніну шишкоподібною залозою) антиоксидантну дію.

Таким чином, при вивченні корегуючого впливу епіталону на показники ПОЛ - а саме на рівень малонового альдегіду при іммобілізаційному стресі доведено, що епіталон найефективніше відновлює показник МА при гіперфункції епіфіза мозку - на 25%. При дослідженні процесів вільного радикального окиснення, показник ОМБ найкраще реагував на вплив епіталону за умов гіпофункції шишкоподібної залози - відмічається зменшення цього показника на 47%.

Технічний результат: застосування епіталону за способом, що заявляється, призводить до корекції показників про- та антиоксидантного захисту в старих щурів при моделюванні іммобілізаційного стресу на фоні зміненого фотоперіоду.