

Даний винахід стосується застосування екстрактів, що містять фітоестроген, який селективно модулює бета-рецептори естрогену [ER-бета] та не спричиняє утеротропну дію згідно з обмежувальною частиною п. 1.

Екстракти *Vitex Agnus Castus* вже давно застосовують для лікування порушень звичайного темпу, мастодії, передменструального синдрому, порушень менструального циклу (внаслідок первинної та вторинної недостатності жовтих тіл), хоча такі екстракти не застосовували у лікуванні замість естрогену.

В період менопаузи рівень естрадіолу знижується внаслідок призупинення функції яєчників. Це призводить до уповільнення проліферативних процесів та в гіпоталамусі - до підсилення активності GnRH-генератора пульсу. (GnRH-генератор пульсу представляє собою тактовий генератор гіпоталамусу, він регулює розподіл LH, причому стероїди впливають на амплітуду та частоту.) В результаті цього стимульований розподіл LH у жінок клімактеричного віку призводить до небажаного збільшення приливів, так званих „Hot flushes”.

При зниженні досить високого рівня естрадіолу в крові у кісній тканині переважає активність остеокластів та внаслідок цього відбувається зменшення маси кісток, пов'язане з підвищеною небезпекою переломів скелету. В той же час виникає небезпека утворення бляшок у судинній системі і тим самим підвищується ризик інфарктів.

Негативним виявився естрогеноподібний вплив на матку, піхву, грудну тканину та печінку. Небажаним виявився той факт, що до цього часу в рівні техніки не був описаний ніякий фітопрепарат, який можна було б застосовувати для селективної профілактики або лікування браку естрогену.

Виходячи з цього рівня техніки задача даного винаходу полягає у описі рослинних лікарських засобів, що проявляють естрогеноподібну дію та не впливають або незначним чином впливають на матку.

Задача вирішується шляхом застосування згідно з п. 1.

За допомогою екстрактів, що містять фітоестроген, зокрема з *Vitex Agnus castus*, переважно плодів, згідно з даним винаходом вперше вдалося досягти селективної ER-beta-дії - без виникнення утеротропної дії. Шляхом застосування екстрактів *Vitex Agnus castus* за допомогою модуляції ER-beta можливо лікувати такі картини хвороб та патолофізіологічні стани:

- ожиріння та можливий вплив на метаболічний синдром, зокрема гіпертонію, атеросклероз, інфаркт міокарда, гіперандрогенемію;

- порушення здатності до стримування в період менопаузи;

- приливи в період менопаузи, які асоціюються з гіперстимуляцією гіпоталамічного GnRH-генератора пульсу;

- порушення синтезу стероїдних гормонів, зокрема синтезу прогестерону жовтого тіла людини як причина наявності значної кількості лютеаліну;

- хвороба Альцгеймера, пов'язана з підвищеною експресією бета-рецептору естрогену в гіпокампальних нейронах.

Згідно з винаходом екстракти можуть бути застосовані у фармацевтично прийнятній формі, наприклад, у формі крапель, пігулок, пігулок в целофановій упаковці, капсул, гранул, драже, свічок, мазей, кремів або інш.

Перевагу надають екстрактам з *Vitex Agnus Castus*, зокрема їх плодів та/або листків, одержаним шляхом екстрагування етанолом або CO<sub>2</sub> рослин або частин рослин та їх застосуванню згідно з винаходом.

Щоб показати наявність фітоестрагенів в екстрактах *Vitex Agnus castus* (VAC), винахідники застосували метод аналізу рецепторів естрогену, згідно з яким радіоактивно маркований естрадіол рецепторів витісняється лігандами, які, в разі необхідності, приєднані до рецепторів, які надалі позначаються як модулятори. Як модулятори, з одного боку, застосовують нерадіоактивний естрадіол, та, з іншого боку, досліджуваний екстракт. Препарат складається з цитозольної фракції матки свині, що містить обидва підтипи рецепторів естрогену, а саме ER-альфа та ER-бета. Результати типового експерименту показані на фіг. 1.

На фіг. 1 показані криві витіснення естрадіолу (E<sub>2</sub>, не зафарбовані символи) та VAC-екстрактів (зафарбовані символи). Вісь ординат відображає ступінь (ще наявного) приєднання радіоактивно маркованого естрадіолу до рецептора естрогену в %. Верхня вісь абсцис вказує E<sub>2</sub>-концентрацію, в той час як нижня вісь абсцис відображає VAC-концентрацію. Таке витіснення, одержане при найнижчій концентрації досліджуваних речовин, вважають 100 %-ним. Середні значення ±SEM одержують на основі потрібного аналізу. EC<sub>50</sub> VAC становить 7,8 мкг/мл.

Як видно з фіг. 1, сполуки у VAC-екстрактах в залежності від дози "змагаються" з радіоактивно маркованим естрадіолом за місце приєднання рецепторів естрогену. Одержані результати чітко показують, що досліджувані екстракти містять фітоестроген.

Для підтвердження цих результатів, таке саме дослідження було проведене на основі препарату рецепторів ендометрію людини, що також містить обидва ER-підтипи. Результати цих досліджень показані на фіг. 2.

На фіг. 2 показані криві витіснення радіоактивно маркованого естрадіолу ER з ендометрію людини естрадіолом (E<sub>2</sub>, не зафарбовані символи) та VAC-екстрактами (зафарбовані символи). Вісь ординат відображає ступінь (ще існуючого) приєднання радіоактивно маркованого естрадіолу до рецептора естрогену в %. Верхня вісь абсцис вказує E<sub>2</sub>-концентрацію, в той час як нижня вісь абсцис відображає VAC-концентрацію. Таке витіснення, одержане при найнижчій концентрації досліджуваних речовин, вважають 100 %-ним. Середні значення ±SEM одержують на основі потрібного аналізу. EC<sub>50</sub> VAC становить 12,7 мкг/мл.

Результати доводять, що фітоестрогени VAC-екстрактів приєднані до рецепторів естрогену людини на молекулярному рівні при естрогеноподібній дії сполук з VAC в організмі людини.

За наявності рекомбінантних протеїнів рецепторів можуть бути проведені різні дослідження залежно від підтипу ER (ER-альфа або ER-бета). Результат у формі типової кривої витіснення ER-альфа показаний на фіг. 3.

Фіг. 3 показує дозування/криві дії естрадіолу (E<sub>2</sub>, не зафарбовані символи) та VAC-екстрактів заявника (зафарбовані символи) при проведенні дослідження за допомогою рекомбінантного ER-альфа людини. Верхня вісь абсцис вказує E<sub>2</sub>-концентрацію, в той час як нижня вісь абсцис відображає VAC-концентрацію. Таке приєднання, одержане при найнижчій концентрації досліджуваних речовин, вважають 100 %-ним. Середні значення ±SEM одержують на основі потрібного аналізу на одиницю концентрації.

В той час як дозування E<sub>2</sub> та радіоактивних лігандів рецепторів не узгоджені між собою, фітоестрогени VAC-екстрактів не приєднані до ER-альфа. Таким чином EC<sub>50</sub> підрахувати неможливо.

В ER-бета-дослідженнях застосовують ті самі сполуки, що були застосовані в ER-альфа-дослідженнях. Результати репрезентативного дослідження показані на фіг. 4.

Фіг. 4 показує дозування/криві дії естрадіолу (E<sub>2</sub>, не зафарбовані символи) та VAC-екстрактів заявника (зафарбовані символи) при проведенні дослідження за допомогою рекомбінантного ER-бета людини. Верхня вісь абсцис вказує E<sub>2</sub>-концентрацію, в той час як нижня вісь абсцис відображає VAC-концентрацію. Таке витіснення,

одержане при найнижчій концентрації досліджуваних речовин, вважають 100 %-ним. Середні значення  $\pm$ SEM одержують на основі потрібного аналізу на одиницю концентрації.  $EC_{50}$  VAC становить 9,9 мкг/мл.

На відміну від дослідження ER-альфа фітоестрогени VAC-екстрактів заявника в залежності від дозування приєднані до ER-бета. Ці результати без сумніву підтверджують ER-бета-селективність екстрактів *Vitex Agnus castus*.

Нижче наведені приклади дослідження естрогенного впливу *Vitex Agnus castus* на гранульозні/лютеальні клітини людини та лютеальні клітини свині.

Стероїдна секреція фолікул яєчників та жовтих тіл на ендокринному рівні регулюється гормонами гіпофіза LH та FSH. Додатково відбувається локальний контроль за допомогою естрадіолу, який називають паракринної регуляцією. Такий локальний контроль є передумовою експресії рецептору естрогену. Нові результати молекулярно-біологічних досліджень підтверджують, що гранульозні клітини частіше експресують підтип ER-бета у порівнянні з ER-альфа. А лютеальні клітини експресують виключно ER-бета.

Лютеальні клітини представляють собою придатну систему для дослідження паракринної дії стероїдів. Такі клітини неможливо одержати з організму людини, оскільки всі оперативні втручання, в ході яких роблять біопсію, дуже часто здійснюють у фолікулярній фазі, щоб уникнути ризику невиявленої вагітності. В рамках програм запліднення *in vitro* так звані гранульозні/лютеальні клітини є доступними, вони поводять відносно рецепторів та секреції як лютеальні клітини. За допомогою цієї системи *in vitro* досліджують естрогенний ефект *Vitex Agnus castus*.

Спочатку необхідно відобразити дію естрадіолу 17-бета (естрадіолу природного походження) у порівнянні з ізомером естрадіолу 17-альфа на секрецію прогестерону гранульозних/лютеальних клітин людини. Ці результати графічно показані на фіг. 5.

Фіг. 5: 5-годинна інкубація цих клітин 17-бета естрадіолом (1 мкМ) приводить до значного інгібування секреції прогестерону, в той час як ізомер 17-альфа естрадіолу (також 1 мкМ) не проявляє ніякої дії. \* означає значне відхилення від показників контрольної групи. Це означає:

1. Інгібування *in vitro* секреції прогестерону - це естрогенний ефект.
2. Дія естрадіолу 17-бета дуже специфічна, оскільки 17-альфа естрадіол не проявляє ніякої дії.

Дія екстрактів *Vitex Agnus castus* при дослідженні секреції прогестерону після 5-годинного інкубування показаний на фіг. 6.

Як видно з фіг. 6, екстракт *Vitex Agnus castus* - як і 17-бета-естрадіол природного походження - інгібує секрецію прогестерону гранульозних/лютеальних клітин людини. З фармакологічної точки зору це слід розцінювати як естрогенний ефект. \* означає значне відхилення від показників контрольної групи. Вказані на осі абсцис концентрації означають відповідні концентрації VAC-екстракту.

Оскільки гранульозні/лютеальні клітини людини експресують переважно, але не виключно, ER-бета, дослідження повторюють з використанням лютеальних клітин свині, тобто клітин, які експресують виключно ER-бета. Відповідні результати показані на фіг. 7.

Згідно з фіг. 7 при дослідженні цих клітин *Vitex Agnus castus* проявляє чітко виражений естрогенний ефект, оскільки секреція прогестерону (ліва частина графіку, перші три колонки після першого контролю середовища) значно уповільнена. Неспецифічна цитотоксична дія після визначення життєздатності клітин (утворення пігменту МТТ згідно з відомим способом) повністю виключається (права частина, останні три колонки після другого контролю середовища). Екстракт *Vitex Agnus castus* не впливає на життєздатність клітин, тобто зниження секреції прогестерону - це специфічний естрогенний ефект.

\* означає значне відхилення від показників контрольної групи. Вказані на осі абсцис концентрації означають відповідні концентрації VAC-екстракту.

Для підтвердження цього висновку клітини інкубують екстрактом *Vitex Agnus castus* та разом з тим антиестрогеном тамоксифеном. Результати у вигляді діаграми показані на фіг. 8.

На фіг. 8 \* означає значне відхилення від показників контрольної групи. Вказані на осі абсцис символи означають: TAM=тамоксифен, показники концентрації відповідна концентрація VAC-екстракту та VAC+TAM=комбінація VAC-екстракту вказаної в останньому стовпчику концентрації з чистим VAC-екстрактом+тамоксифен.

Згідно з фіг. 8 антиестроген тамоксифен сам не впливає на секрецію прогестерону. Внаслідок приєднання тамоксифену до ER зменшується кількість місць приєднання для складових речовин VAC та таким чином знижується інгібування секреції прогестерону. Цей факт підтверджує, що VAC впливає на синтез прогестерону через рецептор естрогену.

Для дослідження утеротропної дії проводять такий експеримент, результати якого графічно показані на фіг. 9.

Протягом понад 3 місяців у корм шурів жіночої статі, яких попередньо піддавали оваріектомії, та шурів чоловічої статі, яких попередньо піддавали орхіектомії, примішують VAC-екстракти двох різних концентрацій (100 мг/кг=VAC100 та 400 мг/кг ваги тіла=VAC400). VAC на відміну від естрадіолу не проявляє утеротропну дію та не впливає на епітелій піхви. Обидва проліферативні впливи естрадіолу в рамках пері- та постклімактеричного лікування естрогеном або гормонами є небажаними у жінок після оваріектомії, оскільки при регулярному прийомі естрогенів та недостатній регуляції гестагенами можливість виникнення гіперплазії ендометрію внаслідок постійного проліферативного впливу естрадіолу не виключається.

На фіг. 9 на вісь ординат нанесена вага маток шурів. Окремі стовпчики стосуються контрольної групи (лише оваріектомованої), позитивного контролю естрадіолу, а також ефектів при застосуванні VAC-екстрактів двох різних концентрацій.

В даному випадку, як і у випадку з естрадіолом, утеротропна дія тварин, оброблених VAC, згідно з фіг. 9 не може бути визначена, це означає, що VAC не проліферативно впливає на тканину матки.

Незважаючи на це при проведенні подальших досліджень з'ясували, що VAC може проявляти естрогенний вплив на інші системи органів.

За допомогою комп'ютерної томографії досліджують черевну та великогомілкову жирові тканини шурів чоловічої та жіночої статі. При  $E_2$  та високому дозуванні *Vitex Agnus castus* спостерігають зменшення розміру двох тканин. Одночасно зменшується рівень сироватки лептину у оброблених VAC тварин. Результати цього дослідження показані на фіг. 10 та 11.

Фіг. 10 показує вплив естрадіолу та VAC двох різних концентрацій на великогомілкову жирову тканину у

вигляді процентного співвідношення жирової тканини в області великогомілкової кістки по відношенню до контрольної групи.

Фіг. 11 показує вплив естрадіолу та VAC двох різних концентрацій на вміст сироватки лептину, нанесений на вісь ординат в нг/мл.

Як видно з фіг. 10 та 11, при прийомі VAC спостерігається зниження вмісту жиру в області великогомілкової кістки та зменшення концентрації сироватки лептину.

За допомогою комп'ютерної томографії спостерігають також за зміною щільності кісток (зменшення розвитку остеопорозу) на метафізі в області великогомілкової кістки у щурів чоловічої та жіночої статі. Результати показують, що при прийомі VAC щільність кісток зменшується значно повільніше, ніж в контрольній групі тварин.

Інстиляція 1 мл фізіологічного розчину хлористого натрію катетером у сечовий міхур оварієктомованих щурів жіночої статі протягом 1 хвилини приводить до підвищення внутрішнього тиску міхура. У тварин, які протягом 3 місяців одержували  $E_2$ , збільшення тиску припиняється в приблизно в 3 рази швидше, ніж у тварин контрольної групи, які піддали плацебо лікуванню, він трохи слабший, але значно відрізняється від тиску тварин, оброблених естрадіолом, якщо ці тварини одержували VAC. Результати досліджень показані на фіг. 12 та 13.

На фіг. 12 на осі ординат вказаний максимальний внутрішній тиск міхура в ммHg, визначений для контролю, естрадіолу як позитивного контролю та VAC двох різних концентрацій.

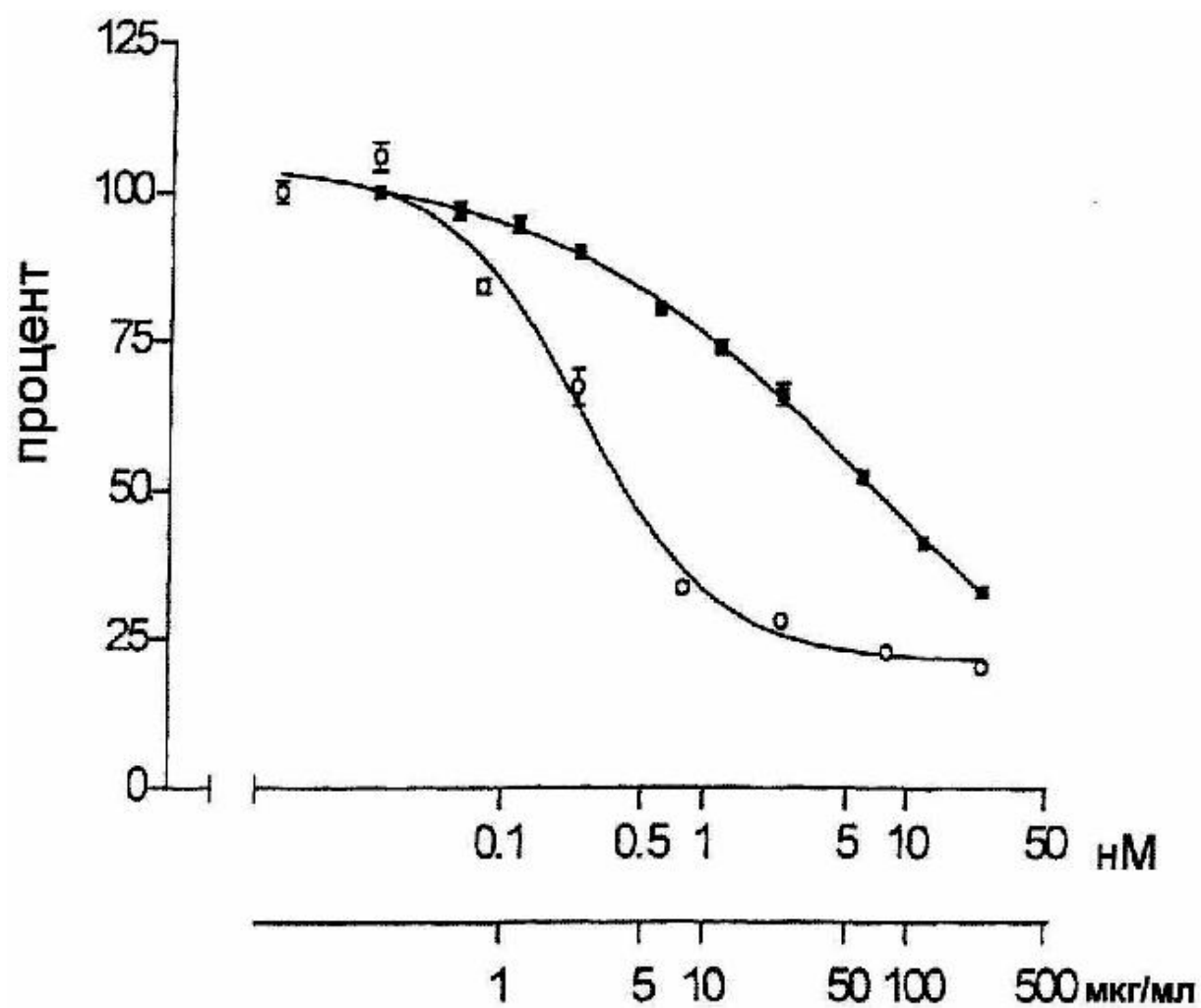
На фіг. 13 на осі ординат нанесена поверхня під кривою тиску [AUC] в ммHg x сек для контролю, естрадіолу як позитивного контролю та VAC двох різних концентрацій.

Згідно з усім вищесказаним VAC-екстракти, які не проявляють утеротропну дію, можуть бути застосовані для одержання лікарських засобів для лікування:

- ожиріння та можливого впливу на метаболічний синдром, зокрема гіпертонію, атеросклероз, інфаркт міокарда, гіперандрогенемію;
- порушення здатності до стримування в період менопаузи;
- приливів в період менопаузи, які асоціюються з гіперстимуляцією гіпоталамічного GnRH-генератора пульсу;
- порушення синтезу стероїдних гормонів, зокрема синтезу прогестерону жовтого тіла людини як причина наявності значної кількості лютеаліну; а також
- хвороби Альцгеймера, пов'язаної з підвищеною експресією бета-рецептору естрогену в гіпокампальних нейронах.

Література:

- 1) Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 2000 Sep; 141(9): 3506-9.
- 2) Hosokawa K, Ottander U, Wahlberg P, Ny T, Cajander S, Olofsson U. Dominant expression and distribution of oestrogen receptor beta over oestrogen receptor alpha in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 2001 Feb; 7(2): 137-45.
- 3) Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 2000 Feb; 24(1): 145-55.
- 4) Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Niisson S, Gustafsson JA 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.
- 5) Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR, 1997. Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol* 154:R13-R16.
- 6) Makela S, Strauss L, Kuiper G, Valve E, Salmi S, Santti R, Gustafsson JA, 2000. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol* 164:109-116.



Фиг. 1

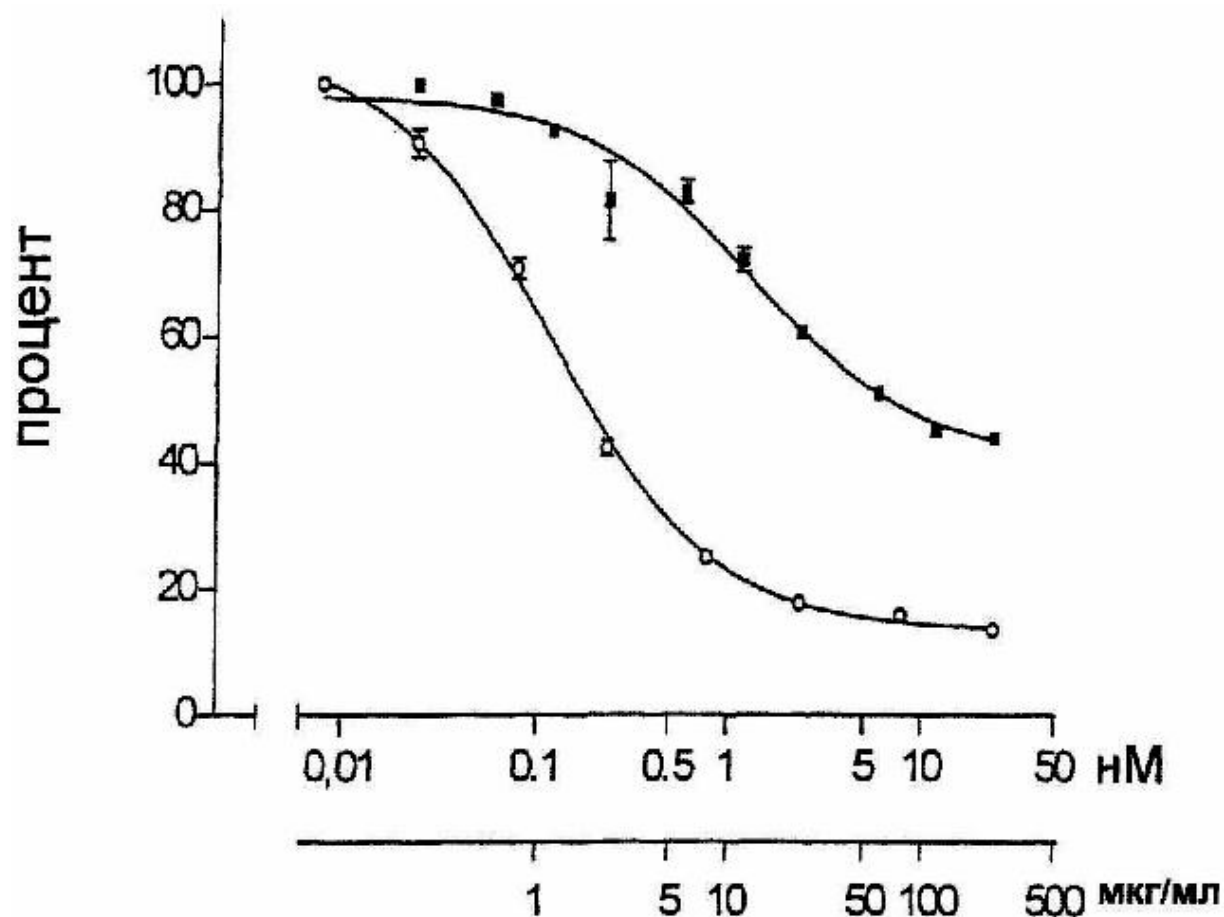


Fig. 2

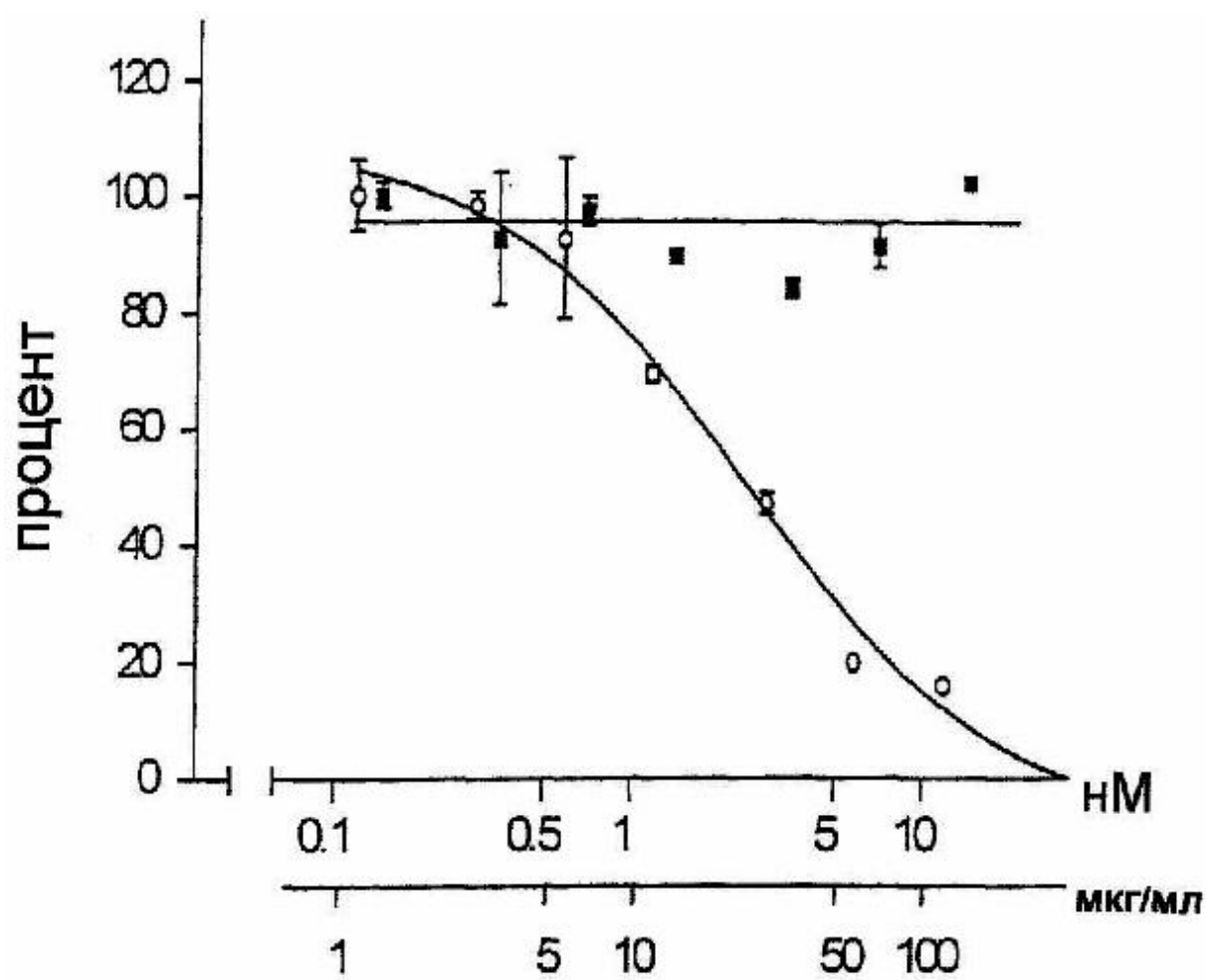
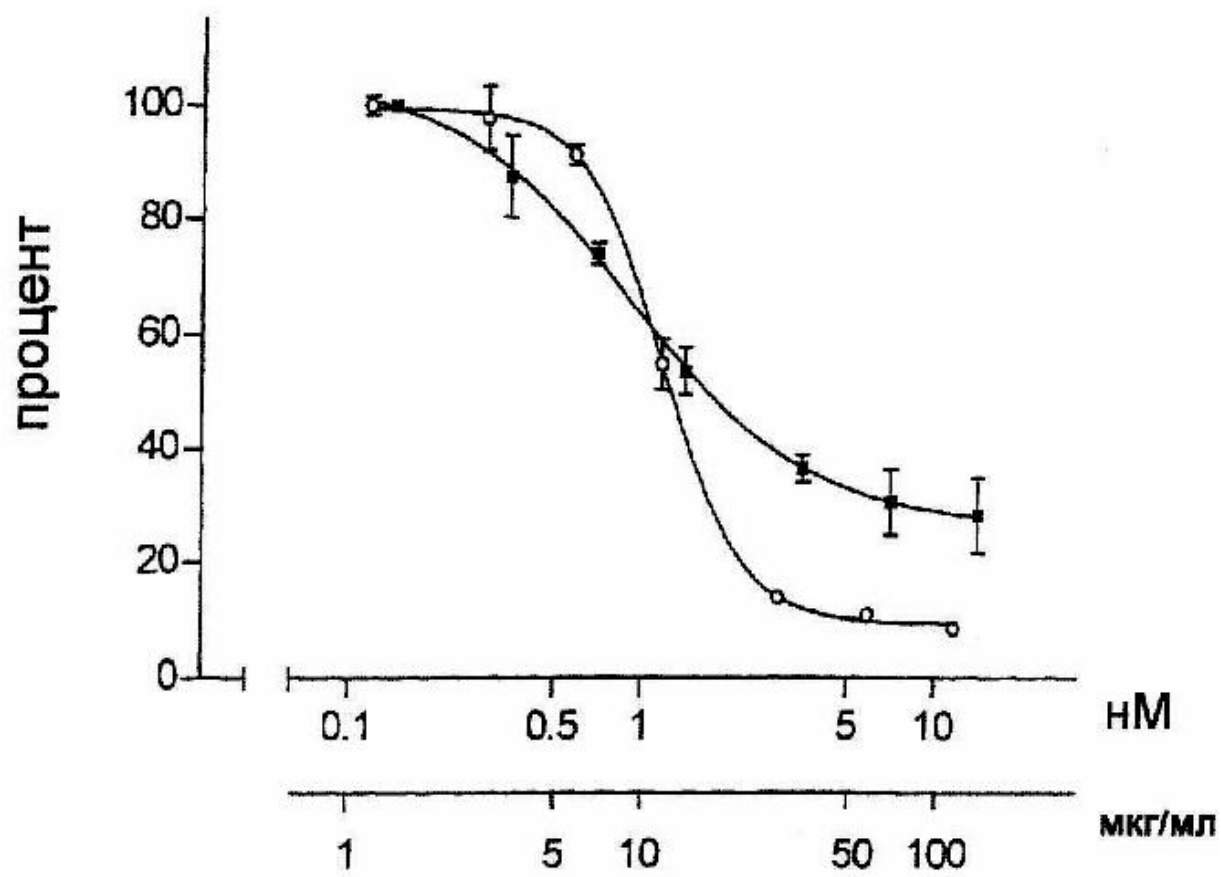
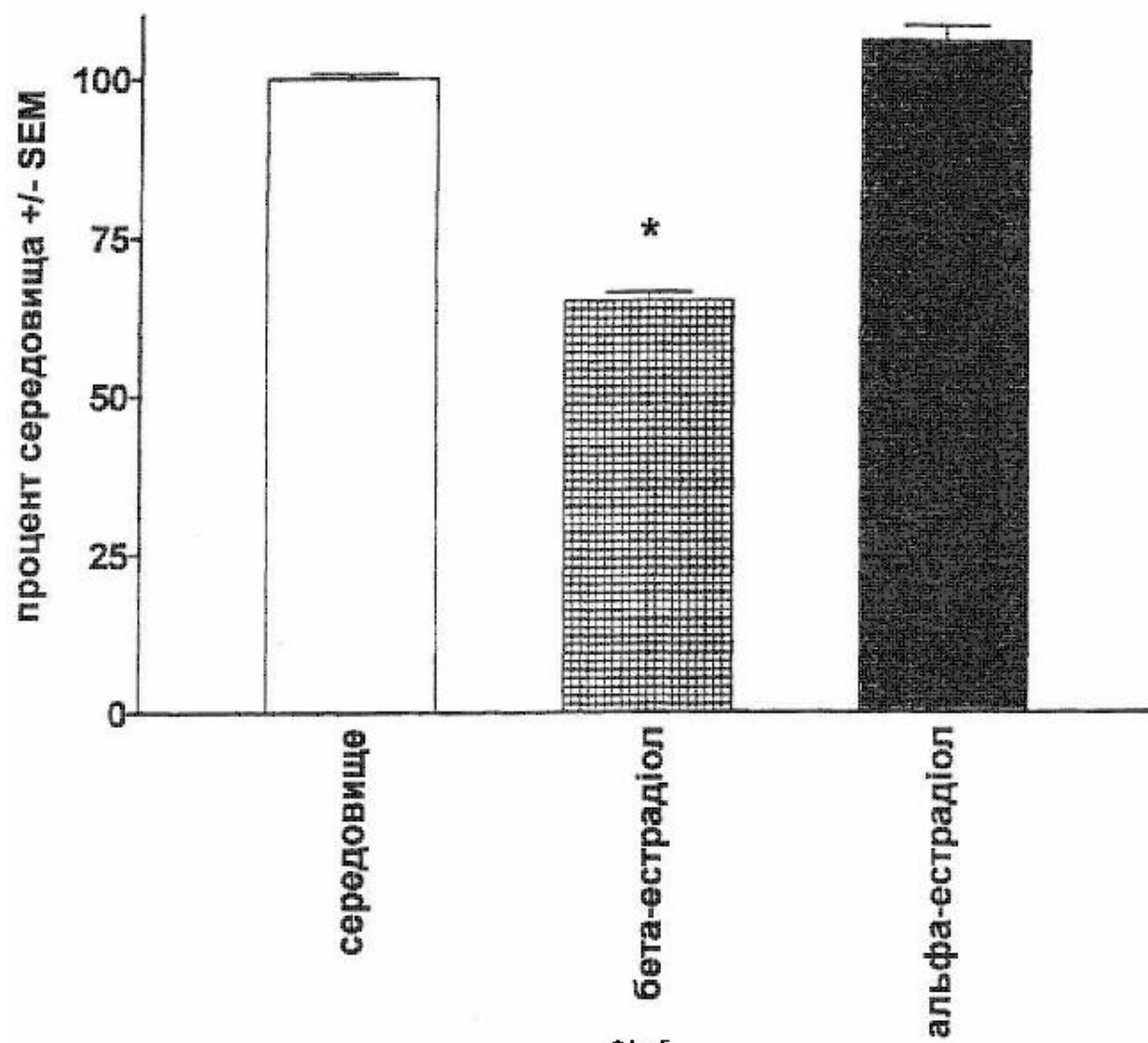


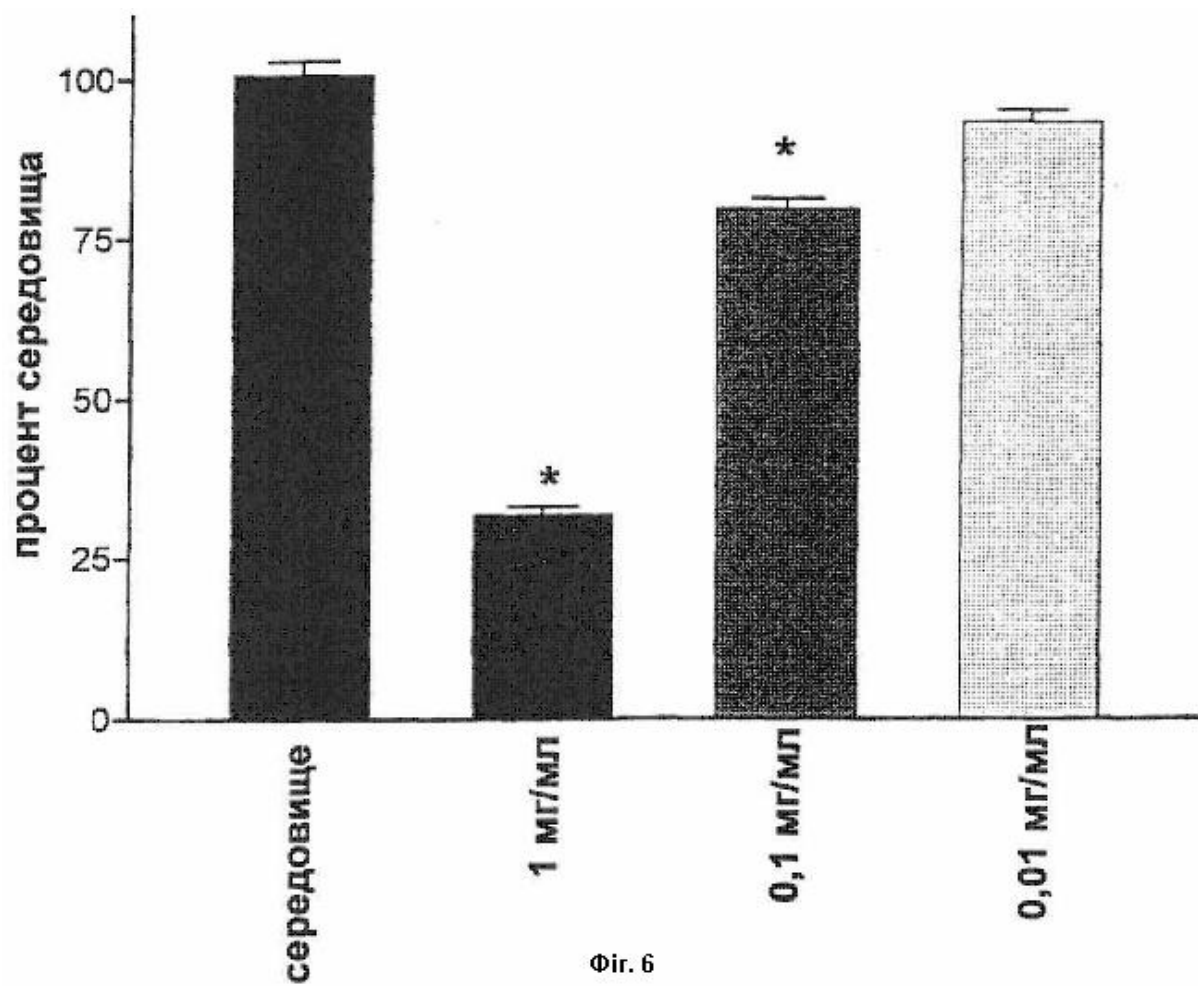
Fig. 3



Фиг. 4



Фіг. 5





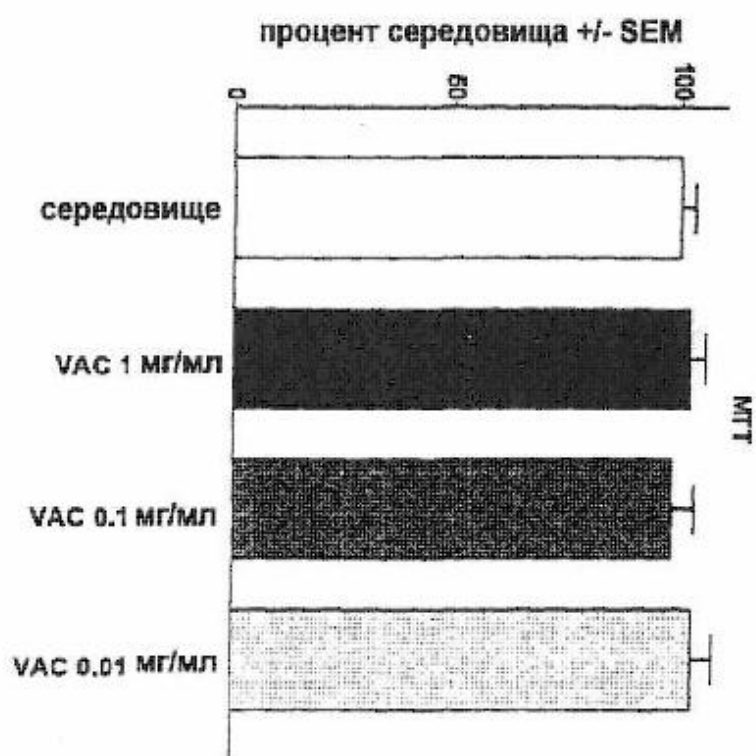
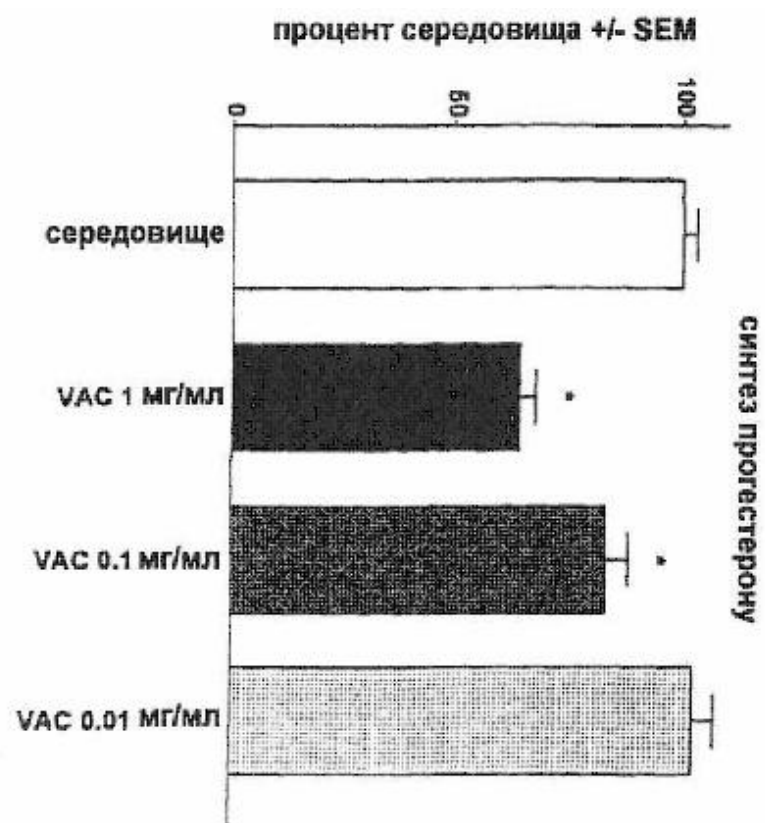
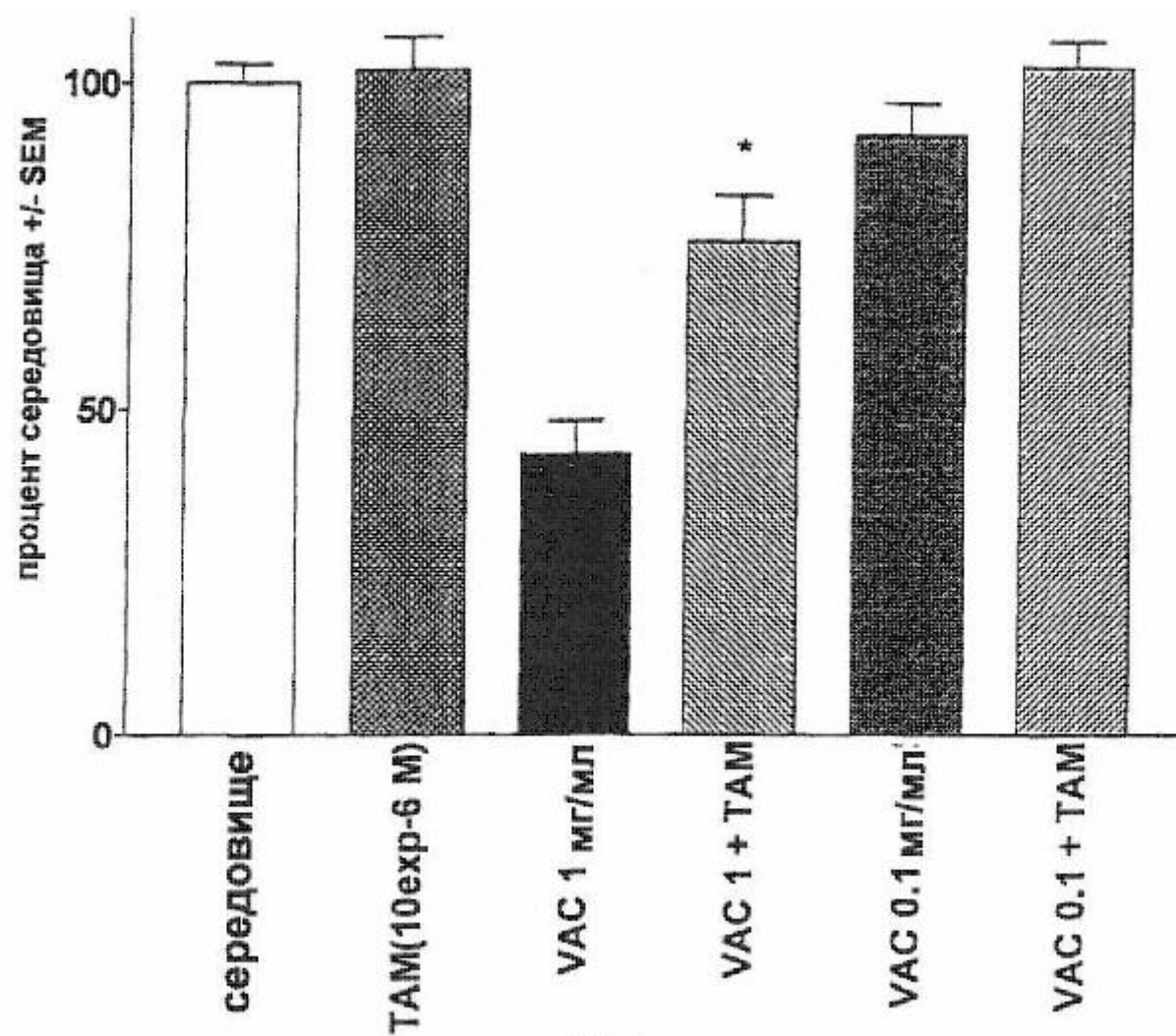
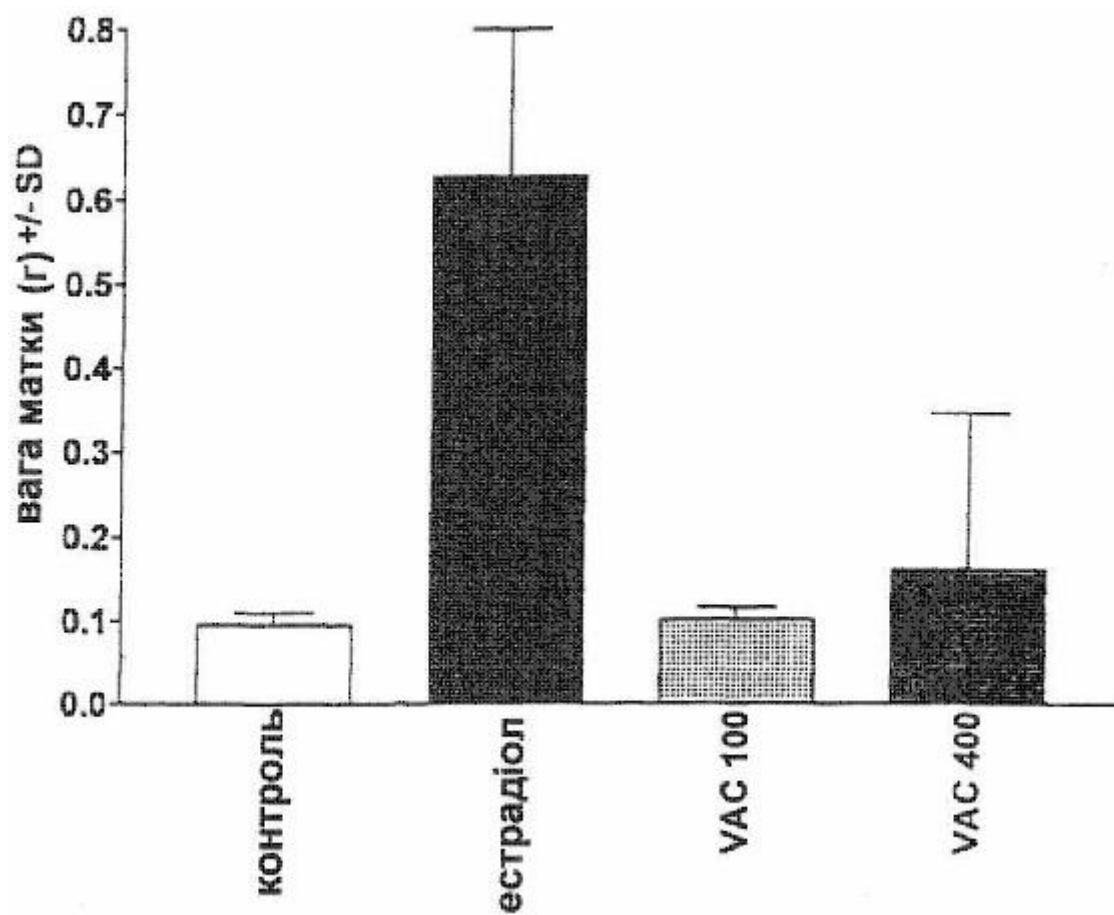


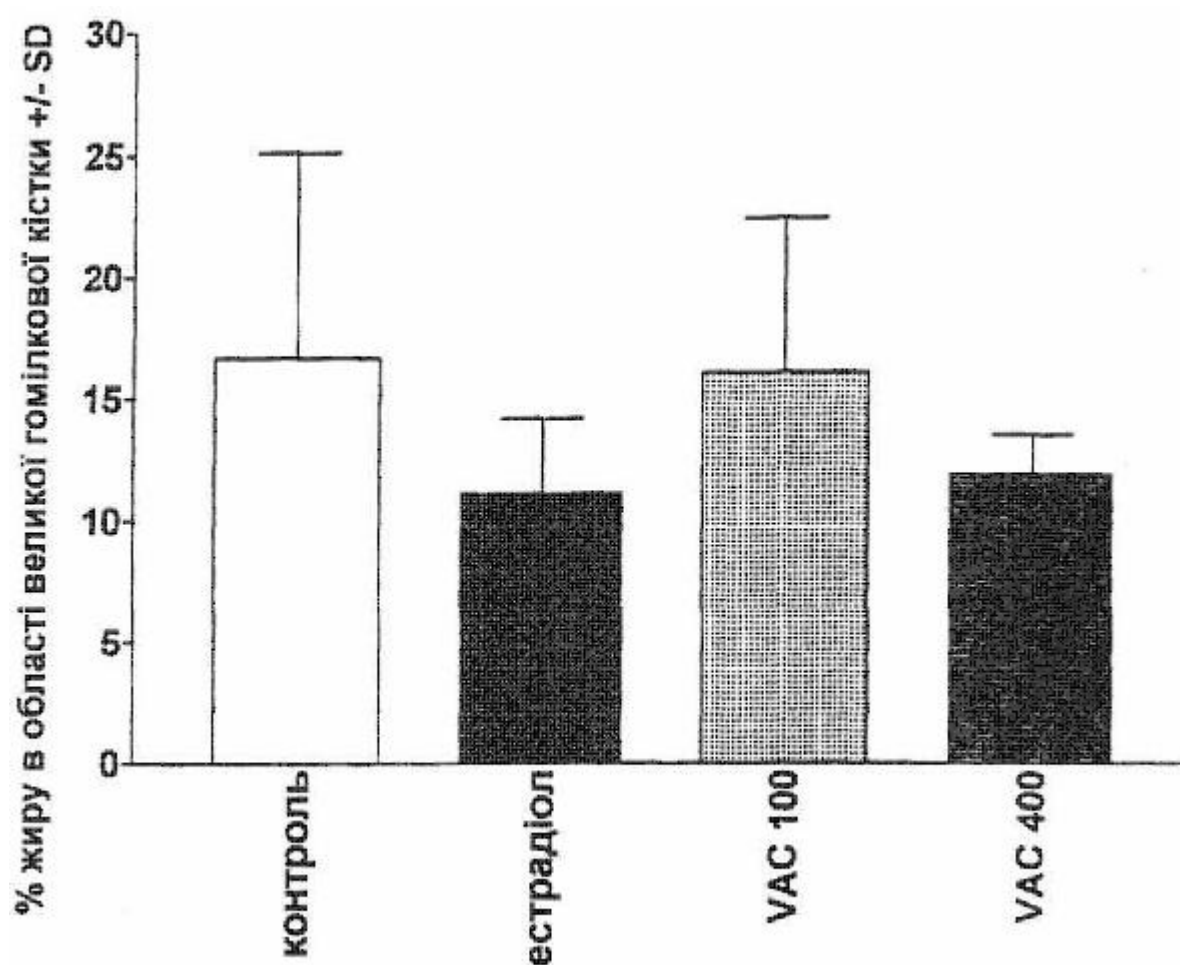
Fig. 7



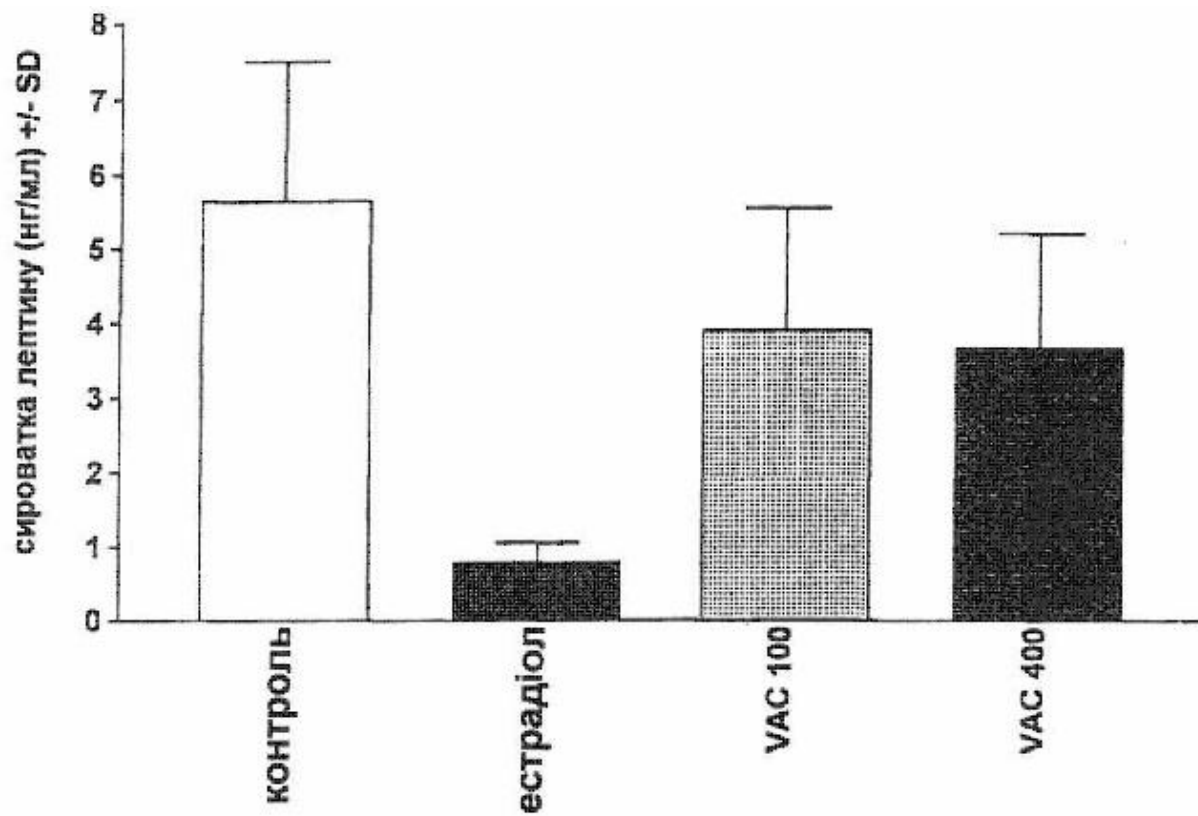
Фиг. 8



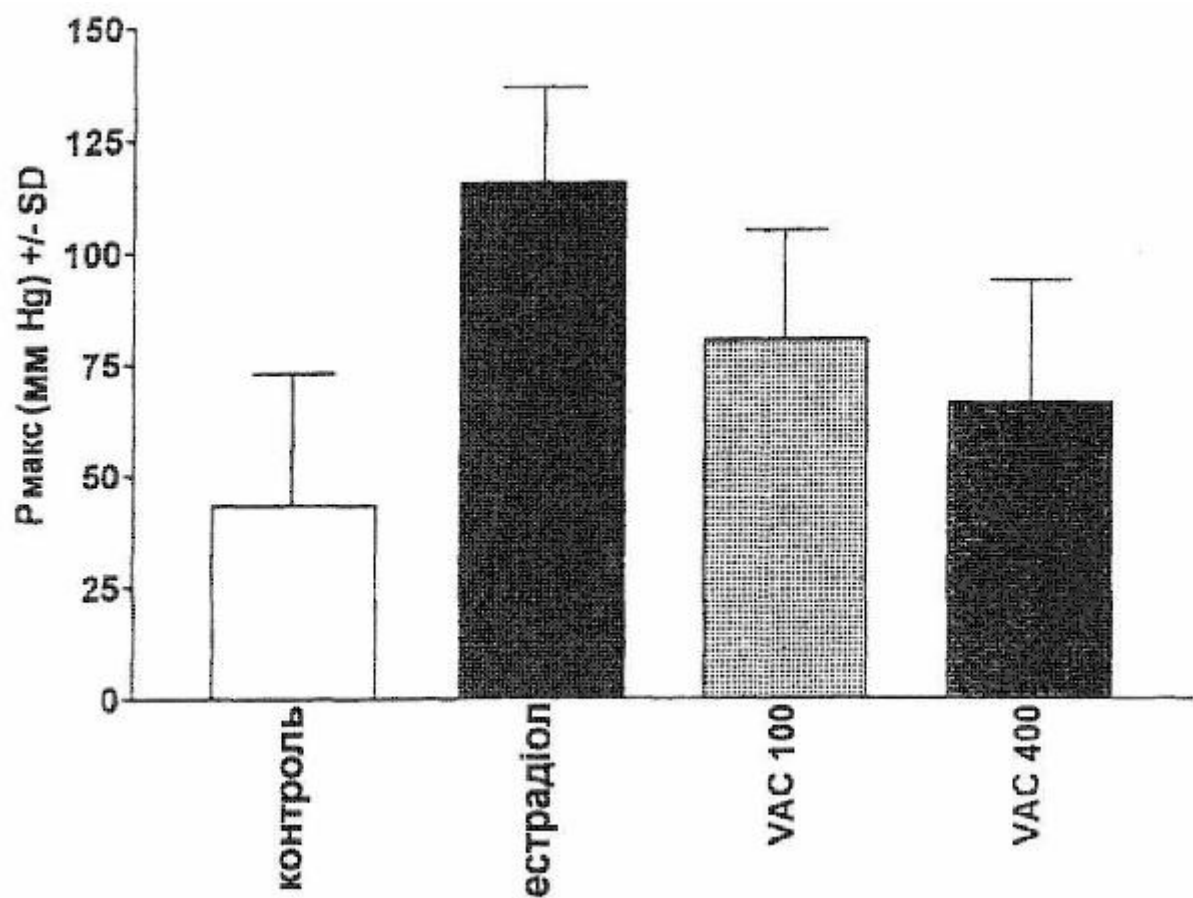
Фиг. 9



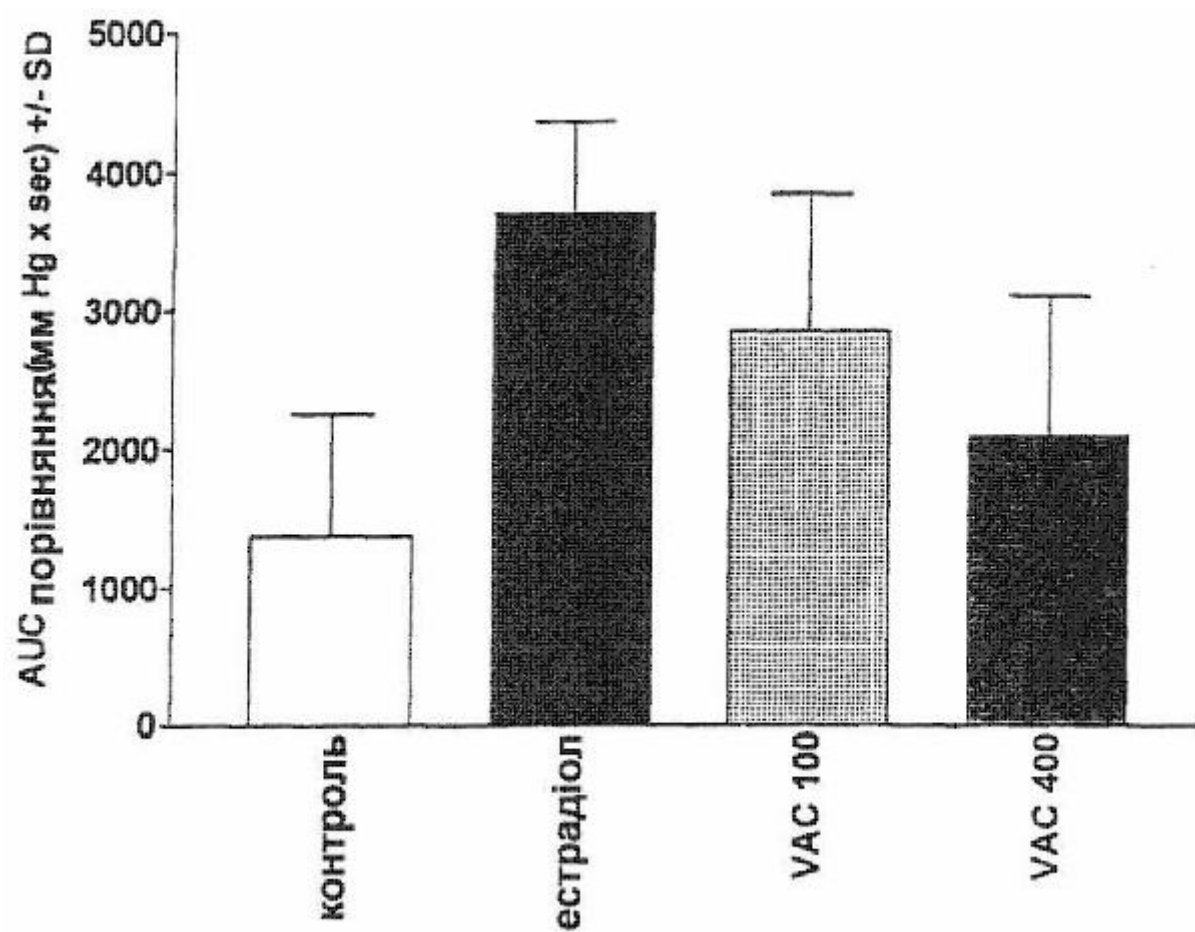
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фіг. 13