



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81857** (13) **C2**  
(51) МПК (2006)  
**G09B 23/28** (2006.01)  
**A61K 31/395**  
**A61P 1/16** (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ПРЕВЕНТИВНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕПАТИТУ

1

2

(21) а200606215

(22) 05.06.2006

(24) 11.02.2008

(72) КОРДА МИХАЙЛО МИХАЙЛОВИЧ, UA, ЯРО-  
ШЕНКО ТЕТЯНА ЯРОСЛАВІВНА, UA

(73) ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я.ГОРБАЧЕВСЬКОГО, UA

(56) Gastric damage and granulocyte infiltration  
induced by indomethacin in tumour necrosis factor  
receptor (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase  
(iNOS) deficient mice // Souza M.H., Lemos P. H,  
OUveira R. B., Cunha F. Q. // Gut -2004. -№ 53. -P.  
791-796.

О.М.Олещук, К.А.Посохова, Л.Й.Плосканич //  
Вплив селективного блокатора індукцибельної NO-  
синтази аміногуанідину на стан печінки при її іше-

мії-репрфузії // Здобутки клінічної і експеримента-  
льної медицини: матеріали XLVIII підсумкової нау-  
ково-практичної конференції// Тернопіль. -  
"Укрмедкнига". - 2005. - С. 201-202.

UA A 59729 15.09.2003

(57) Спосіб превентивної профілактики експери-  
ментального гепатиту у білих щурів, що включає  
введення інгібітора індукцибельної синтази оксиду  
азоту (iNOS), який **відрізняється** тим, що як інгібі-  
тор iNOS застосовують N-(3-(амінометил)бензил)  
ацетамідину (1400W), який вводять одноразово  
внутрішньоочеревинно в дозі 1,5мг/кг за 30хв. до  
дії гепатотоксином - аліловим спиртом, введеним у  
дозі 30мкл/кг маси в ізотонічному розчині натрію  
хлориду.

Винахід стосується медицини, зокрема експе-  
риментальної патології, і може бути використаний  
при вивченні ролі оксиду азоту як поліпотентного  
месенджера регуляторного спрямування в патоген-  
незі токсичного ураження печінки.

Відомий спосіб превентивної профілактики ек-  
спериментального гепатиту у білих щурів, який  
включає введення інгібітора індукцибельної синта-  
зи оксиду азоту [1]. За відомим способом, як інгібі-  
тор індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS)  
використовують аміногуанідин.

Недоліком відомого способу є недостатня  
ефективність, що впливає з недостатнього рівня  
селективності застосованого інгібітора iNOS, який  
завдяки неселективній дії його як на печінкову,  
тобто зосереджену в купферовських клітинах,  
iNOS, так і конституційну NO-синтазу (eNOS), що  
знаходиться переважно в клітинах ендотелію капі-  
лярів, призводить до надмірного вивільнення ок-  
сиду азоту (NO) і потенціювання, внаслідок патоген-  
етичних механізмів токсичного гепатиту.

В основу винаходу поставлено завдання вдос-  
коналити відомий спосіб, в якому шляхом застосу-  
вання інгібітора iNOS з високим рівнем селектив-  
ності щодо субстрату L-аргініну досягають

підвищення рівня ефективності превентивної про-  
філактики експериментального токсичного гепа-  
титу.

При вирішенні технічного завдання було взято  
до уваги те, що інгібітором з високим рівнем селе-  
ктивності відносно субстрату L-аргініну є N-(3-  
(амінометил)бензил) ацетамідину (1400W скоро-  
чена назва), якому притаманна властивість галь-  
мувати процес посиленої експресії iNOS і, відпові-  
дної гіперпродукції NO при токсичному ураженні  
печінки, що має негативну роль. Тоді як NO, що  
синтезується eNOS (зосереджена в оновному в  
ендотелії капілярів) проявляє захисну функцію,  
покращуючи мікроциркуляцію в паренхімі і, тим  
самим, мінімізуючи печінкове ураження [2].

Виходячи з наведених міркувань у відомому  
способі превентивної профілактики експеримента-  
льного гепатиту у білих щурів, який включає вве-  
дення інгібітора індукцибельної синтази оксиду азо-  
ту (iNOS), відповідно до винаходу як інгібітор iNOS  
застосовують N-(3-(амінометил)бензил) ацетаміди-  
ну (1400W скорочена назва), який вводять однора-  
зово внутрішньоочеревинно в дозі 1,5мг/кг за 30хв.  
до дії гепатотоксину алілового спирту, введеного у

(19) **UA** (11) **81857** (13) **C2**

дозі 30мкл/кг маси на ізотонічному розчині натрію хлориду.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Після визначення маси тварини за 30хв. перед моделюванням токсичного гепатиту білому щуру одноразово внутрішньоочеревинно вводять розчин 1400W, в дозі 1,5мг/кг, після чого на лабораторній тварині виконують експериментальне моделювання токсичного гепатиту. Для цього внутрішньоочеревинно їй вводять аліловий спирт у дозі 30мкл на 1кг маси тіла на Ізотонічному розчині натрію хлориду. Через 24год. тварину декапітують під тіопенталовим наркозом. Висновок про ефективність превентивної профілактики токсичного гепатиту роблять за показником біологічної активності NO в тканині печінки електрохімічним методом. Для цього після евтаназії тварин печінку негайно видаляють, вміщують у холодний розчин Хенкса, розрізають на декілька шматочків і відразу переносять до рідкого азоту, де тканину печінки зберігають не більше 20 днів перед її використанням. Безпосередньо перед визначенням NO шматочок печінки вміщують у холодний розчин Хенкса. Тканину нарізають тоненькими смужками довжиною 7-8мм і шириною 4-5мм і кожну з них вносять до термостатованої кювети (37°C), заповненої фосфатним буфером. Платиновий і каломельний електроди розміщують у кюветі в безпосередній близькості від тканини печінки, а активний кінець робочого наносенсора прикладають до поверхні тканини за допомогою мікроманіпулятора. Для оцінки максимальної продукції NO 10мкл кальцій-іонофору A23187 впорскують на поверхню тканини печінки за допомогою наноінжектора (кінцева концентрація іонофору в середовищі 1 мкмоль/л), після чого реєструють електричний струм, що виникає внаслідок окиснення NO на робочому електроді. Концентрацію NO вираховують за допомогою калібрувальної кривої, виготовленої попередньо за допомогою стандартних розчинів. Висновок про ефективність способу роблять за функціональним станом конституційної NO синтази.

#### Приклад 1.

Білому щуру масою 200г попередньо внутрішньоочеревинно ввели розчин інгібітора iNOS, а саме 0,3мг 1400W в 1мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Через 30хв. цій тварині внутрішньоочеревинно ввели 6 мкл алілового спирту, розведеного в 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, що відповідало дозі 30мкл/кг. Паралельно контрольній тварині з аналогічною масою (200г) також внутрішньоочеревинно ввели 6мкл алілового спирту в 1мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Додатковим - другим контролем була інтактна тварина, якій внутрішньоочеревинно ввели 1мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Через 1 добу трьом тваринам - інтактній, контрольній і дослідній - здійснили евтаназію, після чого у кожної негайно видалили печінку, розрізали на декілька шматочків і поміщали в холодний розчин Хенкса (4°C). Отримані тканинні взірці поміщали на дно термостатованої кювети (37°C), заповненої фосфатним буфером. Платиновий і каломельний електроди розміщували в кюветі близько до тканини печінки, а активний кінець робочого наносенсора опускали

на поверхню тканини. Для оцінки максимальної продукції NO 10мкл кальцій-іонофору A23187 наноінжектором впорскують на поверхню тканини печінки і записували величину струму, користуючись потенціометром фірми EG&G Princeton Applied Research. Отримані дані обробляли за комп'ютерною програмою (Research Electrochemistry Software, Ver. 4.30; EG&G Princeton Applied Research) і аналізували за допомогою програми Origin 6.0. Рівень NO розраховували за допомогою калібрувальної кривої. Сумарну активність NO-синтази печінки визначали колориметричне за кількістю утворених нітратів і нітритів в інкубаційному середовищі, що містило 40мМ тріс HCl буфер, pH 7,9; гомогенат печінки (1мг білка/мл); 4 мМ ФАД; 4 мМ H<sub>4</sub> біоптерин; 3тМ дітіотреїтол і 1мМ L-аргінін. Реакцію ініціювали НАДФН (2мМ) при 37°C. Отримані результати занесли до робочої таблиці (табл.1). З наведених у ній даних видно, що в результаті превентивного введення щуру інгібітора iNOS токсична дія алілового спирту на печінку була суттєво знижена, і становила 82,1нмоль/л. У той же час, без застосування інгібітора рівень максимальної концентрації NO був дещо вищим, і становив 85,5нмоль/л. Аліловий спирт призводив до максимальних деструктивних змін у гепатоцитах.

Сумарна активність синтази оксиду азоту приблизно вдвічі зросла після інтоксикації (контроль) у порівнянні з інтактною твариною (табл.1), тоді як, загальна активність NOS дослідної тварини наближалася до норми, що й свідчить про високу ефективність інгібітора як профілактичного засобу.

Таблиця 1

Результати визначення рівня  
максимальної концентрації NO і  
загальної активності NO синтази в печінці

Лабораторна тварина	C <sub>max</sub> , нмоль/л	NO синтаза, нмоль/(мг білка хв.)
I Контрольна (AC)	85,5	1,35
II Контрольна (норма)	160,0	0,75
Дослідна (1400W+AC)	82,1	0,70

#### Приклад 2.

Запропонований спосіб профілактики був перевірений в експериментах на 30 щурах. В усіх випадках, як свідчать наведені у табл. 2 дані, введення тваринам високоселективного інгібітора iNOS 1400W забезпечило виражений профілактичний ефект. Як впливає із результатів дослідження, в період формування гострих некротичних змін загальна активність синтази оксиду азоту печінки (eNOS + iNOS) зростала в 1,8 рази. Оскільки, як було показано вище, eNOS під впливом AC знає пригнічення, то можна стверджувати, що таке збільшення загальної активності фермента відбувалося завдяки стимуляції його індукційної форми: 1400W значно знижував загальну активність NOS (табл. 2). Так, за умов посилення активності вільнорадикального окислення у печінковому гомогенаті у контрольних тварин, що завдяки токсичній дії алілового спирту майже втричі була ви-

щою, ніж у інтактних тварин, інгібітор 1400W достовірно пригнічує згубну дію вільнорадикального процесу в гепатоцитах, про що свідчить наближення інтенсивності хемілюмінесції до норми. На

профілактичну спроможність інгібітора 1400W вказує понижена активність маркерних ферментів АлАТ та АсАТ у сироватці крові дослідних тварин з блокуванням у такий спосіб цитолізу гепатоцитів.

Таблиця 2

Вплив N-(3-(Амінометил)бензил)ацетамідину  
на рівень NO, показники сумарної активності синтази оксиду азоту,  
амінотрансфераз у плазмі крові, отруєних аліловим спиртом тварин (M+m; n=10)

Група тварин	Показники				
	С <sub>тах</sub> , нмоль/л	NO синтаза, нмоль/(мг білка хв...)	АлАТ, Ммоль/л год.	АсАТ, моль/л год.	Спонтанна ХЛ, імпл./10с
Інтактні	160.0±12.2	0.75±0.08	0.46±0.02	0.38±0.03	34.90±1.18
Контрольні (АС)	85.5±8.88*	1.35±0.20*	4.16±0.28*	2.90±0.22*	98.60±9.75*
Дослідні 1400W+АС	82.07±10.5	0.70±0.06**	1.90±0.15**	1.58±0.13**	56.50±5.23**

Примітка. \* - зміни достовірні порівняно з показниками інтактних тварин;

\*\* - зміни достовірні порівняно з показниками контрольних тварин.

Таким чином, запропонований спосіб забезпечує надійнішу і ефективнішу, ніж за способом-прототипом, превентивну профілактику токсичного ураження печінки, ініційованого некрозогенним гепатотоксином аліловим спиртом, і може бути використаний в дослідженнях ролі оксиду азоту в патогенезі токсичного ураження печінки і формуванні механізмів саногнезу.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

1. О.М.Олещук, К.А.Посохова, Л.Й.Плосканич  
// Вплив селективного блокатора індукцибельної

NO-синтази аміногуанідину на стан печінки при її ішемії-реперфузії // Здобутки клінічної і експериментальної медицини: матеріали XLVIII підсумкової науково-практичної конференції // Тернопіль. - „Укрмедкнига”. - 2005. - С.201-202.

2. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice // Souza M.H., Lemos P.H, Olivera R.B., Cunha F.Q. // Gut -2004. -№53. -P.791-796.