

Винахід належить до галузі медицини, біотехнології та фармакології і може бути використаний як ефективний і безпечний засіб запобігання атеросклерозу.

Атеросклероз - це хронічна судинна патологія, яка полягає в ендотеліальній дисфункції, відкладенні ліпідів у інтимі судин, проліферації судинних гладеньком'язових клітин та, як наслідок, в ремоделюванні позаклітинного матриксу стінки судини, що й призводить до формування атеросклеротичної бляшки.

Відомо, що атеросклеротичні бляшки сформовано судинними гладеньком'язовими клітинами, макрофагами, пінними клітинами, активованим ендотелієм, екстрацелюлярними ліпідами, колагеном і протеїнами крові [1].

Відомо про тісний зв'язок між атеросклерозом та системою зсідання крові [2, 3], який реалізується опосередковано через запальні процеси - саме відповідь гемостазу на запалення є ключовим механізмом залучення до патофізіології атеросклерозу [4, 5]. Системний процес запалення стимулює активацію клітин ендотелію, експресію прозапальних цитокінів, появу активного тромбіну [6, 7, 8].

Відомо, що на сьогодні не існує лікарських препаратів, які мають пряму антиатеросклеротичну дію, тобто запобігають дегенерації, набряку та накопиченню холестеролу в артеріальній стінці. Жоден із антиатеросклеротичних препаратів не має додаткової інгібувальної дії на систему зсідання крові. Лікарські препарати, які можуть сприяти зниженню атерогенного потенціалу шляхом регуляції ліпідного обміну, діляться на кілька груп відповідно до етапу обміну холестеролу, який зазнає дії препарату.

Відомо засоби, які перешкоджають всмоктуванню холестеролу та жовчних кислот у кишечнику, запобігаючи таким чином потраплянню у кров екзогенного холестеролу [9, 10].

Відомо засоби, які інгібують синтез ендогенного холестеролу і тригліцеридів у печінці, завдяки чому знижується загальний холестерол сироватки, холестерол ліпопротеїдів низької щільності та окислених ліпопротеїдів низької щільності. Дію цих фармацевтичних агентів спрямовано на переривання ентерогепатичної циркуляції солей жовчних кислот [11, 12].

Відомо засоби, які прискорюють катаболізм і виведення холестеролу завдяки впливу на зворотний транспорт холестеролу з судинної стінки та профіль активації моноцитів у пацієнтів, регулюючи метаболізм холестеролу, ефірів холестеролу, тригліцеридів, фосфоліпідів у субендотеліальних, сполучнотканинних і гладеньком'язових клітинах артеріальних судин [13].

Загальним недоліком наведених вище засобів лікування атеросклерозу є відносно незначне зниження вмісту холестеролу в плазмі крові, а також побічні ефекти, пов'язані з системною дією на метаболічні процеси ліпідного обміну, до яких належать шлунково-кишкові розлади, серцеві аритмії, порушення функції печінки, підвищення ризику утворення каменів у жовчному міхурі, тромбоцитопенія, тощо [14].

Найближчим аналогом винаходу, що заявляється, за своєю природою та антиатеросклеротичними властивостями є лікарський засіб 3,4,5-триметоксибензил-4-гідроксифеніл тіоефір - хімічно синтезована речовина з циклічною структурою [15], який відрізняється тим, що інгібує процес перекисного окислення ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), перешкоджаючи проникненню окислених форм ЛПНЩ у стінку судини. Вказаний засіб має ряд недоліків, зокрема неможливо врахувати його вплив на систему антиоксидантного захисту організму та на ліпідний обмін. Цей засіб не інгібує систему зсідання крові та реактивність тромбоцитів, які є важливою складовою процесу розвитку атеросклерозу.

В основу винаходу, що заявляється, поставлена задача створення ефективного та безпечного засобу з комплексною антиатеросклеротичною дією, який би забезпечував загальну антиатеросклеротичну дію, запобігаючи дегенеративним змінам у стінках судин, не впливаючи при цьому на процеси ліпідного обміну, одночасно знижуючи реактивність тромбоцитів і прокоагулянтний потенціал системи зсідання крові.

Задачу вирішують шляхом перорального застосування хімічно синтезованої малотоксичної низькомолекулярної сполуки непептидної природи з ряду каліксаренів натрієвої солі 5,11,17,23-біс(дигідроксифосфорил)метилкалікс[4]арену [16] (далі - засіб С-145).

Засіб С-145 є кристалічною речовиною білого кольору, водорозчинною та стабільною у водних розчинах, $T_{пл} > 100^{\circ}\text{C}$ (розкл.). ^{31}P ЯМР δ 14,5, за своїми властивостями є прямим інгібітором полімеризації фібрину та тромбоутворення [16]. Засіб С-145 при пероральному шляху введення належить до класу 5 токсичності відповідно до Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) [17] і до малотоксичних речовин (IV клас токсичності) відповідно до методичних рекомендацій [18] (визначення токсичності проведено в відділі "Інститут експериментальної токсикології і медико-біологічних досліджень" Державного підприємства "Науковий центр превентивної токсикології, харчової і хімічної безпеки імені Л. І. Медведя МОЗ України"). Зокрема LD50 засобу С-145 при пероральному введенні для самиць щурів Wistar Han складає 1420 мг/кг маси тіла. Ефективною дозою, яка подовжує час зсідання плазми крові у тесті активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) та знижує ступінь агрегації тромбоцитів дослідних тварин,

визначено 7,5 мг/кг маси тіла [19].

Для виявлення антиатеросклеротичних властивостей засобу С-145 використовують лабораторних лінійних спонтанно гіпертензивних щурів, яким щоденно перорально вводять засіб С-145 у дозі 12 мг/кг маси тіла протягом 2 місяців одночасно зі створенням експериментальної моделі індукованого атеросклерозу за допомогою 3 % холестерольної дієти [20-22]. Антиатеросклеротичну дію засобу С-145 оцінюють шляхом гістологічного аналізу зрізів стінки аорти щурів з індукованим атеросклерозом, а також визначенням агрегаційної здатності тромбоцитів, прокоагулянтного потенціалу плазми крові з використанням стандартних діагностичних підходів у порівнянні з відповідними параметрами контрольних спонтанно гіпертензивних щурів.

Ефективну антиатеросклеротичну, протизапальну та антитромботичну дію засобу С-145 підтверджують наступні приклади.

Приклад 1. Вплив засобу С-145 на морфологію аорти щурів з індукованим атеросклерозом

Для прямої оцінки дії засобу С-145 на розвиток атеросклерозу проводять гістологічний аналіз зрізів аорти щурів з індукованим атеросклерозом. Експериментальну модель атеросклерозу відтворюють на лінійних спонтанно гіпертензивних щурах-самцях (SHR-rats) із масою тіла 200-220 г, яких поділяють на три групи: 1) тварини, які протягом 2 місяців експерименту отримують корм, що містить 3 % холестеролу; 2) тварини, які протягом 2 місяців експерименту отримують корм, що містить 3 % холестеролу та 12 мг/кг водного розчину С-145; 3) тварини контрольної групи, які отримують аналогічний корм без холестеролу і засобу С-145.

Гістологічні зразки аорти готують для світлової мікроскопії [23]. Для цього після декапітації тварин ізольовують фрагменти аорти й фіксують їх у 10 % нейтральному формаліні протягом 24 год. Затім дегідрують їх у зростаючій концентрації етанолу (70, 80, 90 і 96 %) та заливають фрагменти аорти в парафінові блоки. Готують зрізи товщиною 5 мкм і забарвлюють зразки гематоксиліном та еозином. Морфологію аорти визначають за допомогою світлової мікроскопії на мікроскопі Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan), товщину стінки аорти та відсоток сполучнотканинних включень у медіа аорти кількісно визначають з використанням пакета програм Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA) [24]. За результатами гістологічного аналізу стінки аорти щурів експериментальної групи з індукованим атеросклерозом виявлено значне її потовщення, появу великої кількості переродженої тканини в інтимі судини та численні порушення цілісності інтими аорти (фіг. 2) порівняно зі щурами з контрольної групи (фіг. 1). За умов застосування засобу С-145 протягом двох місяців упорядковане індукування атеросклерозу спостерігають видимі нормалізацію товщини стінки аорти (фіг. 3). Кількісний аналіз із використанням пакета програм Image J показує достовірне потовщення стінки аорти у щурів із експериментальним атеросклерозом та зменшення товщини стінки аорти в групі щурів із експериментальним атеросклерозом за умов перорального введення їм засобу С-145 (фіг. 4). Водночас, у медіа стінки аорти щурів за умов розвитку атеросклерозу спостерігають видозмінену тканину: це білі ділянки, які не профарбувалися, а отже містять елементи сполучної тканини або ліпіди. На межі просвіту судини ці ділянки зовні вкриті тонким шаром ендотелію (фіг. 2). Введення засобу С-145 зменшує не лише набряк медіа аорти, але й кількість видозміненої тканини (фіг. 3). Це спостереження було підтверджено за результатом обчислення відсотку видозміненої тканини в медіа аорти за площею білих включень у програмі ImageJ (фіг. 5). Таким чином, введення засобу С-145 щурам за умов розвитку експериментального атеросклерозу запобігає дегенеративним змінам у стінці аорти, не впливаючи при цьому на процеси ліпідного обміну, що дозволяє уникнути побічних ефектів його застосування як антиатеросклеротичного засобу.

Приклад 2. Вплив засобу С-145 на агрегаційну здатність тромбоцитів щурів з експериментальним атеросклерозом

Для поглибленої характеристики дії засобу С-145 на клітинну ланку системи гемостазу та на прокоагулянтний потенціал системи зсідання крові оцінюють агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів за умов індукованого атеросклерозу (змодельованого як описано у Прикладі 1). Агрегатометрію виконують у перші три години після забору крові на фотооптичному агрегатометрі "SOLAR AP2110" (Солар, Білорусь) за методом Born [25]. У кювету для агрегатометра вносять 200 мкл збагаченої тромбоцитами плазми крові і 25 мкл 0,025 М CaCl_2 та інкубують ех темного протягом 5 хв при температурі 37 °С. Агрегацію тромбоцитів ініціюють внесенням аденозиндифосфату у концентрації 12,5 мкМ. Процес агрегації реєструють протягом 10 хв у режимі роботи без нормування результатів вимірів за початковим рівнем світлопропускання. Аналіз даних агрегатометрії виконують за допомогою пакета програм Солар 2.01. Оцінюють ступінь агрегації за максимальним рівнем світлопропускання збагаченої тромбоцитами плазми крові після внесення індуктора агрегації; швидкість агрегації за швидкістю зміни світлопропускання збагаченої тромбоцитами плазми крові після внесення індуктора агрегації за перші 30 с; час агрегації як час досягнення максимального ступеню агрегації. У групі щурів за умов розвитку експериментального атеросклерозу спостерігають значне достовірне зростання ступеня та швидкості агрегації тромбоцитів. Обидва показники достовірно нормалізуються за умов введення засобу С-145 (фіг. 6, 7). Таким чином, введення засобу С-145 щурам за умов розвитку експериментального атеросклерозу запобігає розвитку

гіперреактивності тромбоцитів, перешкоджаючи порушенню цілісності ендотелію на початкових етапах розвитку атеросклерозу, а також інгібуючи патологічну активацію системи зсідання крові та тромбогенез.

Приклад 3. Вплив засобу С-145 на час зсідання плазми крові щурів із експериментальним атеросклерозом

Для визначення загального ефекту засобу С-145 на активацію системи гемостазу оцінюють час зсідання плазми крові щурів у тесті АЧТЧ за умов індукованого атеросклерозу, змодельованого як описано у Прикладі 1. Для цього до 0,1 мл плазми крові додають АЧТЧ-реагент ("РенаУ", Україна) та інкубують суміш протягом 3 хв при температурі 37 °С, після чого ініціюють процес полімеризації 0,1 мл розчином CaCl_2 (0,025 М) ("РенаУ", Україна). Фіксують час утворення згустку за допомогою коагулометра "Солар" ("Солар", Білорусь). У групі щурів з експериментальним атеросклерозом спостерігають значне скорочення часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ, що вказує на підвищення прокоагулянтного потенціалу плазми крові. Застосування засобу С-145 відновлює показник часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ практично до норми (фіг. 8).

Таким чином, створено ефективний і безпечний засіб, що заявляється, який проявляє комплексну антиатеросклеротичну дію для запобігання атеросклерозу, а саме:

- запобігає дегенеративним змінам, викликаним атеросклерозом у стінці аорти, не впливаючи при цьому на процеси ліпідного обміну;

- інгібує агрегаційну здатність тромбоцитів і нормалізує прокоагулянтний потенціал системи зсідання крові, що вносить суттєвий вклад у запобігання розвитку атеросклерозу, дозволяє уникнути побічних ефектів його застосування як антиатеросклеротичного засобу.

Засіб, що заявляється, розроблено та апробовано в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та Інституті органічної хімії НАН України.

Підписи до фігур креслення

1. Репрезентативний зріз аорти контрольного лінійного спонтанно гіпертензивного щура.

2. Репрезентативний зріз аорти лінійного спонтанно гіпертензивного щура з експериментальним атеросклерозом.

3. Репрезентативний зріз аорти лінійного спонтанно гіпертензивного щура з експериментальним атеросклерозом за умов введення засобу С-145.

4. Товщина стінки аорти щурів з експериментальним атеросклерозом (Атеросклероз) та за умов введення засобу С-145 (Засіб С-145) порівняно з контролем.

- * Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,00308$ (результат достовірний при $p<0,05$).

- # Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,0083$ (результат достовірний при $p<0,05$).

- @ Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,0271$ (результат достовірний при $p<0,05$ (порівняно з групою "Атеросклероз").

5. Відсоток жирових і сполучнотканинних включень у стінці аорти щурів з експериментальним атеросклерозом (Атеросклероз) та за умов введення засобу С-145 (Засіб С-145) порівняно з контролем.

- * Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,11876$ (результат достовірний при $p<0,5$).

- @ Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,0096$ (результат достовірний при $p<0,05$ (порівняно з групою "Атеросклероз").

6. Ступінь агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів із експериментальним атеросклерозом (Атеросклероз) та за умов введення засобу С-145 (Засіб С-145) порівняно з контролем.

- * Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,00054$. Результат достовірний при $p<0,05$.

- @ Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,00096$. Результат достовірний при $p<0,05$ (порівняно з групою "Атеросклероз").

7. Швидкість агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів з експериментальним атеросклерозом (Атеросклероз) та за умов введення засобу С-145 (Засіб С-145) порівняно з контролем.

- * Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,01208$ (результат достовірний при $p < 0,05$).

- # Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,04036$ (результат достовірний при $p<0,05$).

8. Час зсідання плазми крові щурів з експериментальним атеросклерозом (Атеросклероз) та за умов введення засобу С-145 (Засіб С-145) порівняно з контролем в тесті активованій частковий тромбопластиновий час.

- * Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,00262$. Результат достовірний при $p<0,05$.

- @ Відповідно до критерію Манна-Вітні $p=0,0006$. Результат достовірний при $p<0,05$.

Джерела інформації:

1. L Badimon, G Vilahur. Thrombosis Formation on Atherosclerotic Lesions and Plaque Rupture // J Intern Med. 2014;276(6):618-32. doi: 10.1111/joim.12296.

2. Thompson WD, Smith EB. J Atherosclerosis and the coagulation system // Pathol. 1989 Oct; 159(2):97-106.

3. Cholesterol does not cause coronary heart disease in contrast to stress // Rosch PJ. Scand Cardiovasc J. 2008 Aug; 42(4):244-9.
4. Borissoff JI, Spronk HM, Ph.D., ten Cate H. The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis // N Engl J Med 2011; 364:1746-1760 May 5, 2011.
5. Borissoff JI, Heeneman S, Kilinc E, et al. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state // Circulation 2010;122:821-830.
6. Ten Cate H, Hemker HC. Thrombin Generation and Atherothrombosis: What Does the Evidence Indicate? // J Am Heart Assoc. 2016 Aug 8;5(8). pii: e003553.
7. Kalz J, Ten Cate H, Spronk HM. Thrombin generation and atherosclerosis // Thromb Thrombolysis. 2014 Jan;37(1):45-55. doi: 10.1007/s11239-013-1026-5.
8. Громов А. А., Кручинина М. В., Шварц Я. Ш., Кручинин В. Н., Рыхлицкий С. В. Система гемостаза и атерогенез // Атеросклероз. 2016;12(3):39-60.
9. Пат. RU 2586286, опубл. 10.06.2016, Бюл. № 16.
10. Пат. UA 5407, опубл. 15.03.2005. Бюл. № 3.
11. А. В. Хапалюк Механизмы атерогенеза и статины // Лечебное Дело, № 2 (30), 2013.
12. Пат. RU 2560440, опубл. 20.08.2015 Бюл. № 23.
13. Pat. US 20050227930A1, 13.10.2005.
14. Gainer J.L. et al. - Experience, 1992, v. 31, № 5, p. 548-549. Назва статті?
15. Pat. GB 232522A, 18.11.1998.
16. Пат. UA 97011, опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.
17. Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) // Fifth revised edition. United Nations, New York and Geneva, 2013.
18. Стефанов О. В. Доклінічне дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації // Київ; Авіцена. - 2001, 85 с.
19. Chernyshenko VO, Korolova DS, Dosenko VE, Pashevin DO, Kalchenko VI, Pirogova LV, Chernyshenko TM, Lugovska OE, Kravchenko NA, Makogonenko YM, Lugovskoy EV, Komisarenko SV. Calix[4]arene C-145 Effects on Plasma Haemostasis // Pharmaceutica Analytica Acta. - 2015. - 6(8).-1-5.
20. Cappelli-Bigazzi M, Rubattu S, Battaglia C, Russo R, Enea I, Ambrosio G, Chiariello M, Volpe M. Effects of high-cholesterol and atherogenic diets on vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats // Am J Physiol. 1997 Aug;273(2):H647-54.
21. Tumanovska LV, Swanson RJ, Serebrovska ZO, Portnichenko GV, Goncharov SV, Kysilov BA, Moibenko OO, Dosenko VE. Cholesterol enriched diet suppresses ATF6 and PERK and upregulates the IRE1 pathways of the unfolded protein response in spontaneously hypertensive rats: Relevance to pathophysiology of atherosclerosis in the setting of hypertension // Pathophysiology. 2019 May 29.
22. Pashevin DO, Honcharov SV, Tumanovs'ka LV, Dosenko V, Moibenko OO. The changes in the activity of tripeptidyl peptidase II in experimental atherosclerosis and hypertension. Fiziol Zh. 2014;60(3):27-31.
23. Tulis DA. Histological and morphometric analyses for rat carotid balloon injury model. Methods Mol Med. 2007; 139: 31-66.
24. Tkachenko O. S., Hudz Ie.A., Kosiakova H. V., et al. Protective action of N-stearoyl ethanolamine on blood coagulation and arterial changes in spontaneously hypertensive rats fed cholesterol-rich diet // Ukr.Biochem.J. 2020; Volume 92, Issue 2, Mar-Apr, pp. 60-70.
25. Born GV. Changes in the distribution of phosphorus in platelet-rich plasma during clotting // Biochem J. 1958 Apr;68(4):695-704.

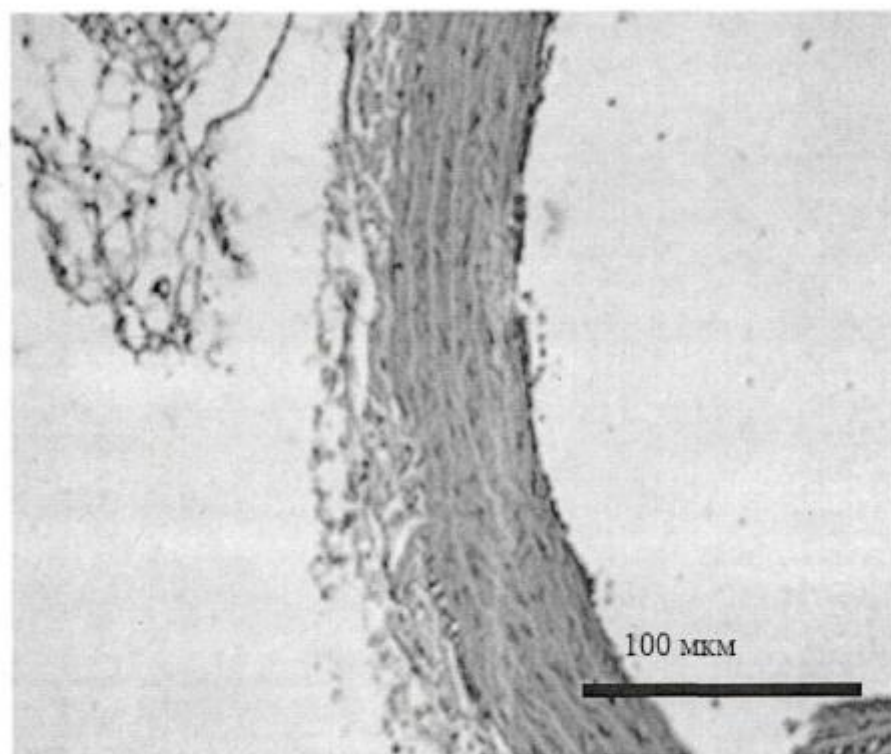


Fig. 1

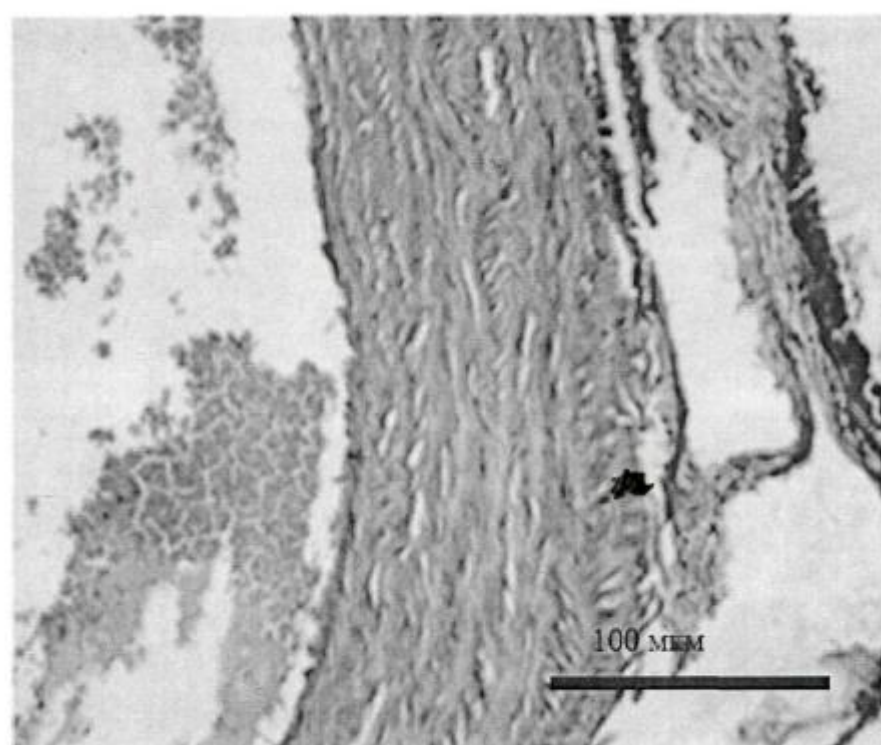


Fig. 2

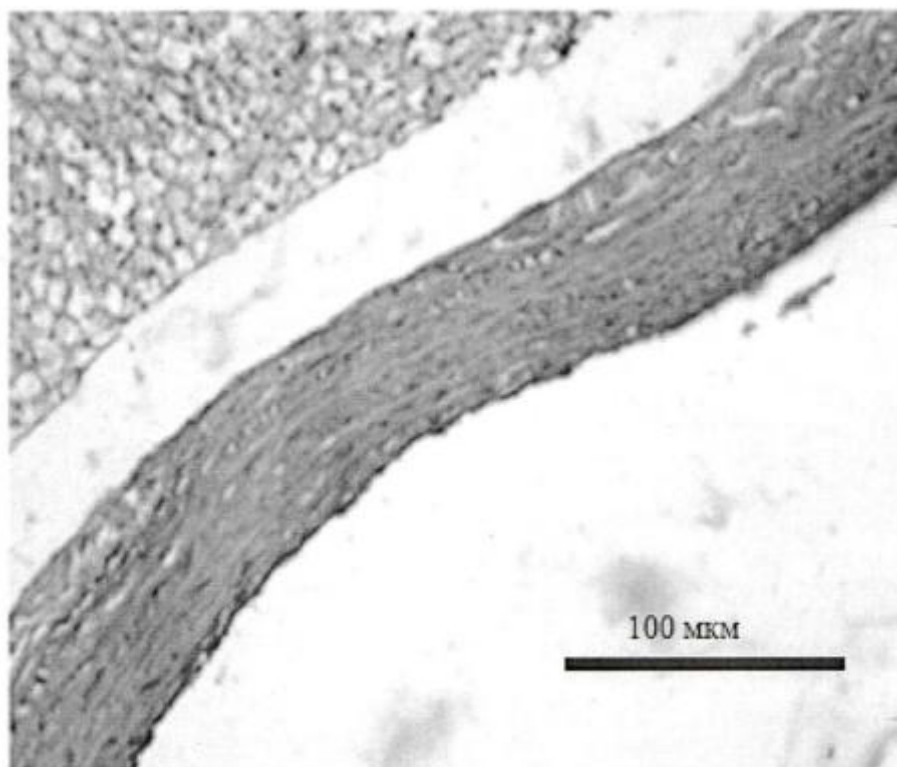


Fig. 3

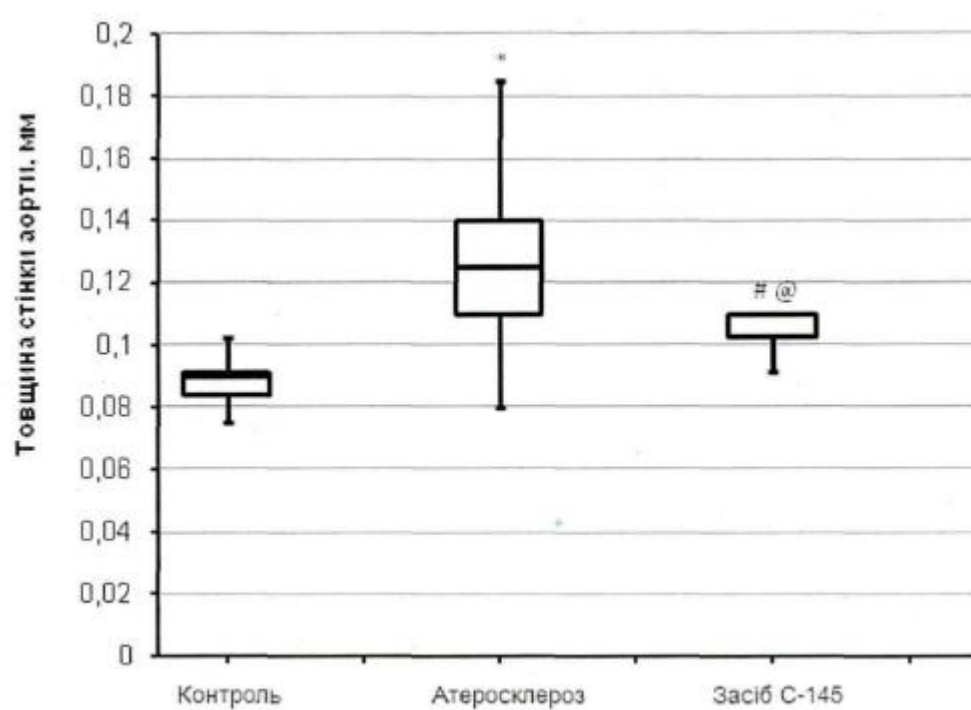


Fig. 4

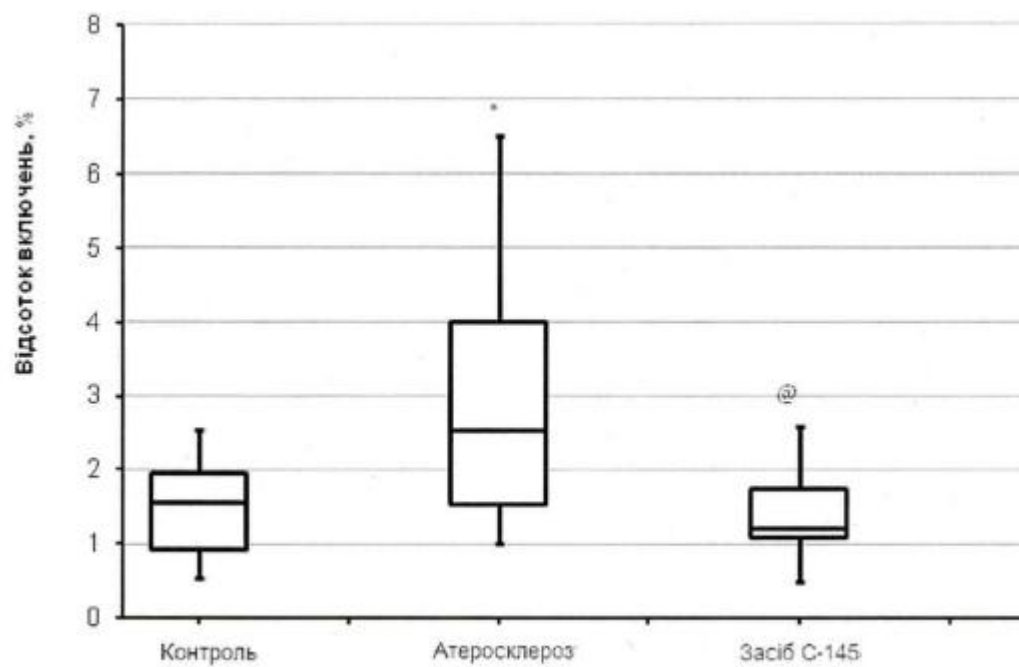


Fig. 5

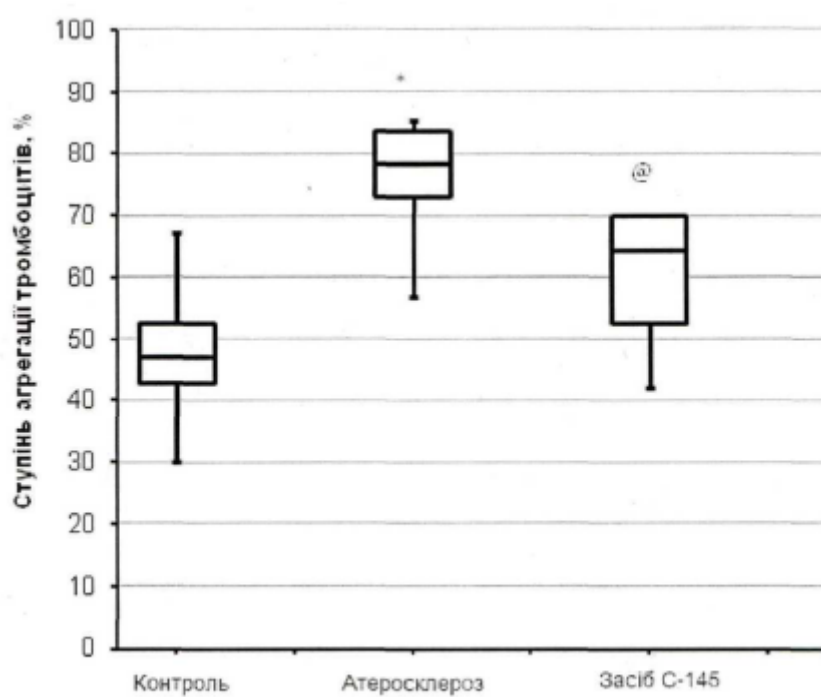


Fig. 6

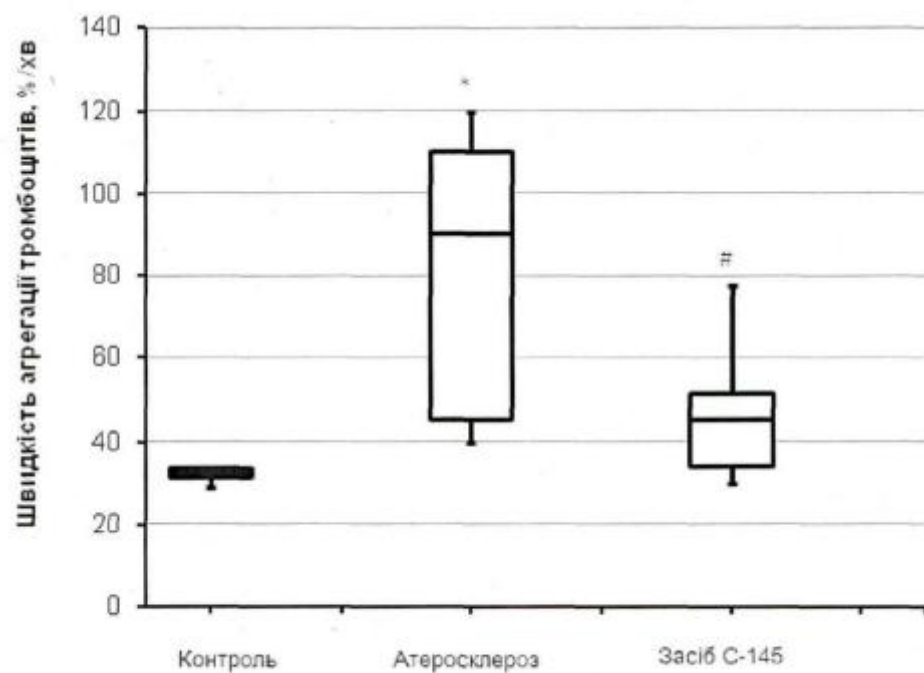


Fig. 7

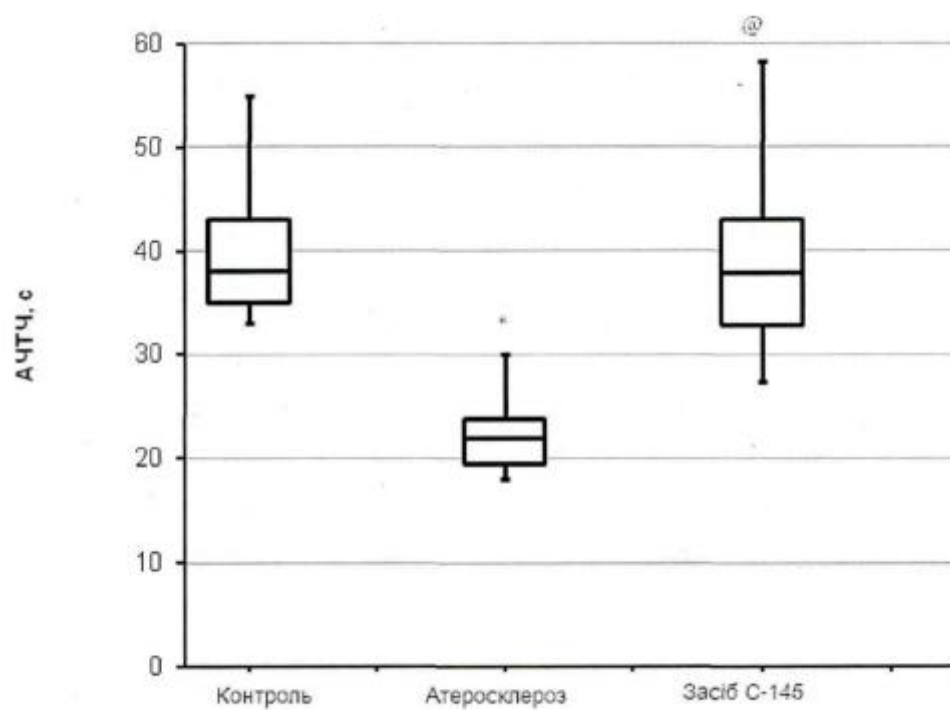


Fig. 8