



(19)

LATVIJAS REPUBLIKAS  
PATENTU VALDE

(11) LV 15531 A

(51)

Starpt.pat.kl. A61K31/7034  
A61P9/00

Latvijas patenta pieteikums  
2007g. 15.februāra Latvijas Republikas likums

(12) Īsziņas

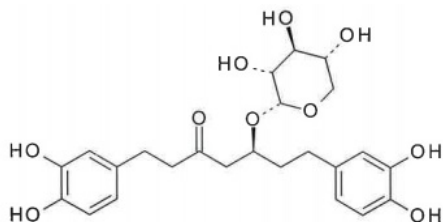
(21) Pieteikuma numurs:	P-19-25	(71) Pieteicējs(i):	RĪGAS STRADIŅA UNIVERSITĀTE, Dzirciema iela 16, Rīga, LV
(22) Pieteikuma datums:	08.05.2019	(72) Izgudrotājs(i):	Desislava ABADJIEVA (BG) Elena KISTANOVA (BG) Elena STOYANOVA (BG) Gaļina TELIŠEVA (LV) Jeļena KRASIŅNIKOVA (LV) Laurent-Emmanuel, Jean-Baptiste, Alexandre MONFOULET (FR) Līga LAUBERTE (LV)
(41) Pieteikuma publikācijas datums:	20.11.2020	(74) Pilnvarnieks vai pārstāvis:	Ludmila IVANOVA, Dzirciema iela 16, Rīga, LV

(54) Izgudrojuma nosaukums:

LĪDZEKLIS MONOCĪTU ADHĒZIJAS PIE ENDOTĒLIJA ŠŪNĀM PAZEMINĀŠANAI  
AGENT FOR DECREASING THE ADHESION OF MONOCYTES TO ENDOTHELIAL CELLS

(57) Kopsavilkums:

Izgudrojums attiecas uz vielām, kas pazemina monocītu adhēziju pie endotēlija šūnām. šāda viela var būt oregonīns ar formulu:



## LĪDZEKLIS MONOCĪTU ADHĒZIJAS PAZEMINĀŠANAI PIE ENDOTĒLIJA ŠŪNĀM

[001] Izgudrojums attiecas uz medicīnas jomu, farmaceitisko un ķīmisko rūpniecību, kā arī ir saistīts ar līdzekļu izstrādi, kas pazemina monocītu adhēziju pie endotēlija šūnām.

### TEHNIKAS LĪMENIS

[002] Asinsvadu gultnes endotēlija šūnas veic lokālo mediatoru sintēzi. Mediatoru produkcijas traucējums izraisa oksidējoša stresa (oksidatīvā stresa) procesu, mainot asinsvadu sienīņu struktūru. Rodas endotēlija disfunkcija. Endotēlija struktūras izmaiņu rezultātā palielinās asinsvadu sienīņu caurlaidība, paaugstinās holesterīna līmenis asinīs, parādās asinsvadu slimības – arteriālā hipertensija, ateroskleroze, kardiomiopātija, cukura diabēts, aptaukošanās u.c..

[003] Asinsvadu sienīņās tiek atzīmēta monocītu kopa (putojošas šūnas), kuras iesūcas endotēlijā un iegūst makrofāgu īpašības. Makrofāgi “saķer” lipīdus, stimulē fibrosfēru proliferāciju, notiek saistaudu sintēze. Ap lipīdu un saistaudu uzkrāšanas zonu tiek atzīmēta fibrozes aterosklerotisko plātnīšu veidošanās. Pašlaik pieņemta aterosklerozes koncepcija, kurai raksturīgas iekaisuma likumsakarības – bojājošie faktori (oksidēti komponenti), palielinās monocītu adhēzija pie endotēlija šūnām, šūnu infiltrācija, fagocitoze un saistaudu veidošana [1,2].

[004] Oksidatīvā stresa procesā endotēlija šūnas sekretē interleikīnu-1 (IL-1), kas aktivizē T-limfocītus, IL-1 iedarbina un pastiprina iekaisumu asinsvadu sienīņās. Interleikīns-1 un audzēja nekrozes faktors-alfa (*TNF-α*) ir citokīni, kas stimulē un nodrošina monocītu adhēziju (piesaisti) pie endotēlija [3,4].

[005] *TNF-α* satura palielināšanās asinīs tiek uzskatīta par prognostiski nelabvēlīgu artēriju aterosklerozes attīstības faktoru [5].

[006] Zināmi sintētiskie benzitiofēna, benzofurāna heterocikliskie atvasinājumi leukocītu adhēzijas inhibēšanai pie endotēlija šūnām iekaisumu slimību gadījumos [6,7].

[007] Zināms līdzeklis naringīns – augu flavonoīds. Naringīns ir konstatēts citrusaugļos, to lieto pārtikas piedevās, lai samazinātu holesterīna līmeni asinīs, kā arī svara samazināšanai [8,9,10,11].

[008] Zināms augu izcelsmes līdzeklis – diarilheptanoīds oregonīns (*Diarylheptanoid Oregonin*), kuru lieto par hepatoprotektoru līdzekli [12].

[009] Zināma monocītu šūnu līnija THPI (ACC, Manassas, VA) pētījumu veikšanai [13,14].

[010] Nav zināms augu izcelsmes līdzeklis, kas pazemina monocītu adhēziju pie endotēlija šūnām.

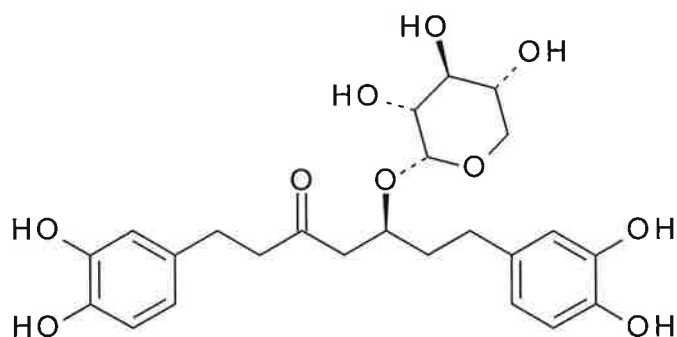
[011] Zināms plūsmas citometrs šūnu skaitīšanai un datoru programmatūra CellQuest Pro software iegūto rezultātu statistiskai apstrādei [15,16].

[012] Zināma šūnu līnijas HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) izmantošana endotēlija funkcionēšanas dažādu aspektu pētījumos [17,18].

[013] Zināms statistiskās ticamības noteikšanas paņēmieni kā vidējās vērtības ar standarta novirzi (neparametriskais tests), pētīt šūnu daudzumu ar plūsmas citometru [15,16,19].

[014] Izgudrojuma mērķis ir izstrādāt augu izcelsmes līdzekli, kas pazemina monocītu adhēziju pie endotēlija šūnām. Izvirzītais mērķis ir sasniegts, pateicoties tam, ka par līdzekli, kas pazemina monocītu adhēziju pie endotēlija šūnām, izmanto oregonīnu ar strukturālo formulu (I).

(I)



[015] Eksperimenta apraksts.

[016] Pētījumu veikšanai sākotnēji tika sagatavota monocītu šūnu līnija THPI (ACC, Manassas, VA) [13,14]. Endotēlija adhēzijas īpašību novērtēšanai tika izmantota monocītu šūnu līnija THPI (ACC, Manassas, VA). Pirms eksperimenta sākuma šūnu līnija THPI (ACC, Manassas, VA) tika kultivēta šūnu vidē RPMI 1640 (PAN biotech, Germany), kas papildināta ar 10 % liellopa augļa serumu RPMI 1640 (PAN biotech, Germany) un 1 % penicilīna/streptomcīna šķīdumu RPMI 1640 (PAN biotech, Germany).

[017] Eksperimenta veikšanai līnijas HUVECs (Lonza, Amboise, Francija) cilvēka nabas saites vēnas endotēlija šūnas tika iesētas 4 barotnēs, katrā barotnē bija 24 iedobes, pārklātas ar 0,2 % želatīna šķīdumu. Šūnu blīvums bija 50 000 šūnas vienā iedobē 400  $\mu$ L 2 % IMDM (Iscove's Modified Dulbecco medium) šķīdumā [17,18]. Šūnas kultivēja endotēlija šūnu augšanas vidē, bez fenola (Gibco, ThermoSciences, Francija) klātbūtnes. Šūnas tika kultivētas visās 4 barotnēs 37 ° C temperatūrā mitrā atmosfērā 5 % ogļskābās gāzes vidē (CO<sub>2</sub> inkubators, Thermo Scientific, Francija). Kad vairojošās šūnas piepildīja 60 – 70 % iedobju virsmas, tās mazgāja 24 stundas ar šūnu barotnes šķīdumu, kas saturēja 0,2 % liellopa augļa serumu RPMI 1640 (PAN biotech, Vācija). Pēc tam 4 barotnes ar mazgātām šūnām tika sadalītas: 1. un 2. barotne pieņemta kā eksperimentālā; 3. un 4. barotne pieņemta kā kontroles.

[018] Pirmās eksperimentālās barotnes iedobēs pievienoja šūnu vidi ar 7,5  $\mu$ M oregonīna. Otrās eksperimentālās barotnes iedobēs pievienoja šūnu vidi ar 10  $\mu$ M oregonīna. Trešās un ceturtais kontroles barotnes iedobēs pievienoja tikai šūnu vidi.

[019] Visās četrās barotņu iedobēs iedarbība turpinājās 3 stundas. Pēc trīs inkubācijas stundām pirmās un otrās eksperimentālās barotnes iedobēs, kā arī trešajā kontroles barotnes iedobēs pievienoja audzēja nekrozes faktoru TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) (Miltenyl Biotec SAS, Parīze, Francija) ar koncentrāciju 1 ng / ml. Audzēja nekrozes faktora TNF- $\alpha$  iedarbība turpinājās 4 stundas [14]. Pēc TNF- $\alpha$  iedarbības šūnu vide tika atdalīta, un visu četru barotņu iedobēs pievienoja  $2,5 \times 10^5$  THP1 šūnas IMDM vidē (Gibco, Thermo Scientific, Francija). Visas šūnas inkubēja 15 minūtes.

[020] Monocīti, kas nebija absorbēti pie endotēlija šūnām, tika nomazgātas ar buferšķīdumu (PBS, Sigma-Aldrich, Francija). Monocīti, kas bija absorbēti pie endotēlija šūnām, tika atdalīti no tām, izmantojot tripsīnu (PAN biotech, Vācija), fiksēti 1 % formaldehīda šķīdumā (PFA, Sigma-Aldrich, Francija) un sagatavoti imunoloģiskai iekrāsošanai. Šūnu imunoloģiskā iekrāsošana tika veikta saskaņā ar anti-CD45 antivielu ražotāja (Miltenyl Biotec SAS, Parīze, Francija) norādījumiem. Fiksētās šūnas tika savāktas, centrifugējot 10 minūtes 4 ° C temperatūrā, pēc tam 30 minūtes apstrādātas ar FcR bloķējošo reagentu un iekrāsotas tumsā ar CD45 antivielu, konjugētu ar FITC (Miltenyl Biotec SAS, Parīze, Francija). IgG2a antivielas, konjugētas ar FITC (Miltenyl Biotec SAS, Parīze, Francija), izmantoja negatīvai kontrolei.

[021] CD45-pozitīvo šūnu (THP1) un neiekrašoto šūnu (HUVECs) daudzumu saskaitīja plūsmas citometrā BD FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA). Izpētīja 20 000 šūnas, izmantojot CellQuest Pro programmatūru, versija 5.1.1 (BD Bioscience, San Jose, CA), Macintosh programma.

[022] Monocītu adhēzijas procents pie endotēlija šūnām tika aprēķināts kā attiecība starp monocītu skaitu un HUVECs šūnu skaitu.

[023] Izpētot dažādas oregonīna koncentrācijas un attiecīgus iedarbības apstākļus, eksperimentus atkārtoja 26 reizes. Rezultātus prezentēja kā vidējās vērtības ar standarta novirzi. Rezultātu statistiskai apstrādei tika izmantota GraphPad Prism programmatūra. Ticamības pakāpe tika noteikta, izmantojot bezparametru testu, rezultāti tika uzskatīti par ticamiem pie  $p < 0,05$ .

[024] Endotēlija šūnu apstrāde ar TNF- $\alpha$  izraisa iekaisuma procesu, kas ticami palielina monocītu adhēziju procentu pie tām no normas  $56,7 \pm 8,0$  % līdz  $100 \pm 15,1$  % provocētajās šūnās kā iekaisuma stresa rezultātu.

[025] 7,5  $\mu$ M oregonīna pievienošana endotēlija šūnām pirms iekaisuma stresa izraisīšanas noved pie adhēzijas samazināšanās no  $100 \pm 15,1$  % līdz  $60,6 \pm 10,3$  % (par 39,6 % pie  $p = 0,0349$ ) salīdzinājumā ar kontroles šūnām, kas nesaņēma oregonīnu.

[026] 10  $\mu$ M oregonīna pievienošana endotēlija šūnām pirms TNF- $\alpha$  iedarbības ticami samazina endotēlija šūnu spēju piesaistīt monocītus no  $100 \pm 15,1$  % līdz  $48,1 \pm 10,0$  % (par 51,9 % ar  $p = 0,0004$ ) salīdzinājumā ar kontroles šūnām, kas nesaņēma oregonīnu.

[027] Endotēlija šūnu apstrādāšana ar oregonīnu 7,5  $\mu$ M un 10  $\mu$ M devās izraisīja aizsargājošu efektu pret izraisīto iekaisuma stresu, ticami samazinot to spēju piesaistīt asins šūnas - monocītus.

#### RŪPNIECISKĀ IZMANTOŠANA

[028] Lai izpētītu monocītu adhēziju pie endotēlija šūnām, tika veikti 104 eksperimenti. Visi laboratorijas testi un darbu eksperimentāli metodiskā daļa tika veikta pēc Eiropas standartizētās metodes Rīgas Stradiņa universitātes Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedrā, Bulgārijas Zinātņu akadēmijas Bioloģijas un reprodukcijas imunoloģijas institūtā un Unité de Nutrition Humaine in INRA Centre de recherches Auvergne-Rhône-Alpes Francijā.

[029] Pašlaik pieņemta aterosklerozes koncepcija, kurai raksturīgas iekaisuma likumsakarības – bojājošie faktori (oksidēti komponenti), palielinās monocītu adhēzija pie endotēlija šūnām. Eksperimentāli pierādīts, ka augu izcelsmes līdzeklis oregonīns ļauj samazināt monocītu adhēziju pie endotēlija šūnām, tādā veidā samazinot aterosklerozes attīstību. Oregonīnu saturošs preparāts tika iegūts Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūtā.

[030] Jāatzīmē, ka izejmateriāls, no kura iegūts šis preparāts ir alksnis (*Alnus*), aug Latvijā un visā Baltijas reģiona Eiropas teritorijā, ir pieejams ražošanai un izmantošanai.

[031] Medicīnā un farmaceitiskajā rūpniecībā augu izcelsmes līdzekļu izstrāde, kas ļauj samazināt aterosklerozes sākuma stadijas attīstības risku, ir ļoti aktuāla.

#### Literatūras avoti:

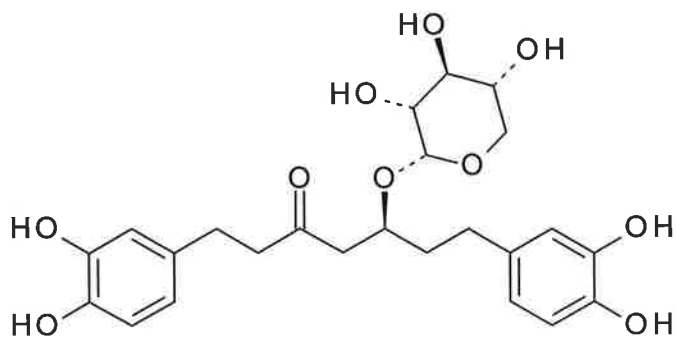
1. S.Sitia, L.Tomasoni, F.Atzeni, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis, Autoimmunity reviews 9(12) (2010) 830-4
2. <http://ultrasound.net.ua/materiali/organi-ta-sistemi/endoteli/klinicheskoe-znachenie-i-...> 24.01.2019
3. S.Cejková, I. Králová-Lesná, R.Poledne. Monocyte adhesion to the endothelium in an initial stage of atherosclerosis development. Cor et Vasa 58 (2016) e419-e425.
4. <https://centr-hc.ru/diseases/vasculitis2.htm...> 24.01.2019

5. <https://medic.studio/kardioonkologya/fno-ateroskleroz-serdechno-sosudistyie-75649...>  
24.01.2019
6. Pat. WO 95/24408, A1, 1995, A61K31/34
7. Pat. RU 2144033, C1, 2000, C07D487/04, A61K31/55
8. Pat. WO 98/16221, A1, 1998, A23L1/222
9. Pat. RU 2174393, C2, 2001, A61K31/335
10. Wang X, et al. Flavonoid intake and risk of CVD; A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr* 2014; 111:1-11
11. Chanet A, Milenkovic D, et al. Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *J.Nutr Biochem.* 2012 May; 23(5):469-77
12. <https://www.researchgate.net/publication/324086696,gepatoprotektoryi-effekt-oreg...>  
29.01.2019
13. Ferrero et al. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 68:1208-14
14. Del Bo'C et al. Different effects of anthocyanins and phenolic acids of wild blueberry on monocytes adhesion to endothelial cells in a TNF- $\alpha$  stimulated proinflammatory environment. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, 60(11):2355-2366
15. <http://chem21.info/info/19319...> 29.01.2019
16. <https://www.biotecha.lt/plusmas-citometrija-sunu-attelveidosana-un-skaitisana/> 29.01.2019
17. Forchhammer, L., S. Loft, M. Roursgaard, Y. Cao, I.S. Riddervold, T. Sigsgaard, and P. Møller. 2012. Expression of adhesion molecules, monocyte interactions and oxidative stress in human endothelial cells exposed to wood smoke and diesel exhaust particulate matter. *Toxicology letters.* 209:121-128
18. Danielsen, P., Y. Cao, M. Roursgaard, P. Møller & S. Loft. 2015. Endothelial cell activation, oxidative stress and inflammation induced by a panel of metal-based nanomaterials. *Nanotoxicology* 9:813-824
19. Wihelmsen et al. Quantitative in vitro assay to measure neutrophil adhesion to activated human microvascular endothelial cells under static conditions. *J. Vis. Exp.* 2013, 78, e50677

**PRETENZIJA**

Oregonīns ar formulu (I)

(I)



lietošanai par līdzekli monocītu adhēzijas pazemināšanai pie endotēlija šūnām.