

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ АТЕРОГЕННЫХ МИКРОРНК-24, МИКРОРНК-125 И ИНДУЦИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ АНТИАТЕРОГЕННЫХ МИКРОРНК-126, МИКРОРНК-222, МИКРОРНК-let7b

5 Изобретение относится к области клинической медицины, а именно к возможности влияния на профиль экспрессии определённых микроРНК в плазме крови человека посредством приема экстракта дудника, что позволит использовать в дальнейшем экстракт дудника в качестве защитного средства от действия определённых эпигенетических
10 атерогенных факторов в плазме крови человека.

Из уровня техники известен следующий метод применения экстракта дудника «Средство для предотвращения старения кожи или улучшения состояния её состояния на фоне старения» [US20040223942A1, 6.03.2003, Япония]. Данный метод подразумевает использование экстракта дудника в
15 составе композиции компонентов, влияющих на функциональное состояние фибробластов кожи за счёт повышения экспрессии Rho киназы или киназы лёгкой цепи миозина. Основным отличием данного метода является отсутствие эффекта от применения дудника на эпигенетические атерогенные и антиатерогенные факторы, в частности, на уровень
20 экспрессии в плазме крови атерогенных микроРНК-24,-125 и антиатерогенных микроРНК -126,-222,-let7b.

Техническим результатом заявленного способа является возможность влияния на профиль экспрессии определённых микроРНК (микроРНК-24, -125, -126, -222, -let7b) в плазме крови за счёт ингибирования экспрессии
25 атерогенных микроРНК (микроРНК-24, -125) и индуцирования экспрессии антиатерогенных микроРНК (микроРНК-126, -222, -let7b) посредством приема экстракта дудника.

Вышеприведённый технический результат достигается благодаря тому, что способ включает последовательное выполнение следующих стадий: 1) получение экстракта дудника; 2) приём полученного экстракта дудника по 5 капель на 10 кг веса ежедневно в течение 4 недель.

- 5 Получают экстракт дудника путем сушки корней растения дудник в течение недели при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, затем измельчают высушенные корни до порошкообразного состояния, далее к 100 г измельчённого дудника добавляют 100 мл дистиллированной воды, перемешивают, затем полученную смесь кипятят на водной бане в течение 1-3 часа, до
10 уменьшения объёма жидкости в 10 раз, проводят его центрифугирование при 15000 оборотах/минуту в течение 30 минут при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, затем полученный супернатант фильтруют на фильтре Whatman №1, далее раствор концентрируют с помощью роторного испарителя Concentrator plus (Eppendorf) и насоса WP6122050 (Millipore) при следующих условиях:
15 1400 оборотов/мин., температура 30°C , в течении 16 часов, уровень вакуума 10 мбар.

- Отбирают 5 мл из полученного водного экстракта дудника и разводят 1:5 в физиологическом растворе (0,9 % водном растворе хлорида натрия) и рекомендуют к приёму *per os* в объёме 5 капель на каждые 10 кг веса
20 пациента.

- Пример «Ингибирование экспрессии атерогенных микроРНК-24, -125 и индуцирование экспрессии антиатерогенных микроРНК-126, -222, -let7b по данным исследования микроРНК плазмы крови человека на фоне приёма экстракта дудника ежедневно в течение 4 недель в дозировке 5 капель на
25 10кг веса».

Мужчина 55 лет 82кг и женщина 43 лет 75кг принимали водный экстракт дудника, приготовленный вышеприведенным способом, ежедневно в течение 4 недель в дозировке 5 капель на 10кг веса. Уровень

экспрессии атерогенных и антиатерогенных микроРНК в плазме крови определяли на 1-ый и на 28-ой день приёма водного экстракта дудника.

Для оценки уровня экспрессии атерогенных и антиатерогенных микроРНК проводили выделение микроРНК из периферической венозной крови (5мл, собрана в вакуумную пробирку с антикоагулянтом) на наборах RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия), затем проводили реакцию обратной транскрипции на наборах miScript II RT kit (Qiagen, Германия) и постановку ПЦР в реальном времени с праймерами к микроРНК- 24, 125, 126, 222, let-7b, 16. Уровень экспрессии приведён относительно уровня экспрессии микроРНК16 (miRNeasy Mini Kit, miScript II RT Kit, Qiagen, Германия). Значения микроРНК представлены в виде отношения уровня экспрессии исследуемой микроРНК, представленного в виде число копий исследуемой микроРНК/мкл к уровню экспрессии микроРНК16, также представленному в виде число копий микроРНК16/мкл. Данный подход является общепринятым для отражения динамики уровней экспрессии микроРНК, т.к. уровень экспрессии микроРНК16 является стабильным относительно уровней экспрессии остальных микроРНК и может выступать в качестве референсного, относительно которого оцениваются уровни экспрессии остальных микроРНК и может происходить оценка уровней экспрессии микроРНК между разными объектами (клеточными линиями, культурами, живыми организмами).

Полученные значения уровней экспрессии атерогенных и антиатерогенных микроРНК на фоне приёма водного экстракта дудника отражены в таблице.

Таблица «Уровень экспрессии атерогенных микроРНК-24, -125 и антиатерогенных микроРНК-126, -222, -let7b на 1ый и 28ой день приёма *per os* экстракта дудника».

Уровень микроРНК	экспрессии (микроРНК	Контроль (1-ый день приёма экстракта	Эксперимент (28- ой день приёма
---------------------	-------------------------	---	------------------------------------

исследуемая/микроРНК16)	дудника)		препарата)	
Изменение уровня экспрессии атерогенных микроРНК				
микроРНК-24	мужчин	женщи	мужчин	женщи
	а	на	а	на
	12,1	5,4	10,4	7,2
микроРНК-125	7,5	7,6	5,8	6,0
Изменение уровня экспрессии антиатерогенных микроРНК				
микроРНК-126	мужчин	женщи	мужчин	женщи
	а	на	а	на
	4,5	5,1	6,0	6,6
микроРНК-222	3,8	5,8	6,7	7,1
Let-7b	2,2	7,9	4,9	10,3

Уровень экспрессии атерогенных микроРНК в плазме крови на фоне 4 недель приёма экстракта дудника в дозировке 5 капель на 10 кг веса снизился: микроРНК-24 снизилась с 12,1 до 5,4 у мужчины и с 10,4 до 7,2 у женщины; микроРНК-125 с 7,5 до 5,8 у мужчины и с 7,6 до 6,0 у женщины. Уровень экспрессии антиатерогенных микроРНК в плазме крови на фоне 4 недель приёма экстракта дудника повысился: микроРНК-126 с 4,5 до 5,1 у мужчины и с 5,1 до 6,6 у женщины; микроРНК-222 с 3,8 до 6,7 у мужчины и с 5,8 до 7,1 у женщины и let-7b с 2,2 до 4,9 у мужчины и с 7,9 до 10,3 у женщины.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ ингибирования экспрессии атерогенных микроРНК-24, микроРНК -125 и индуцирования экспрессии антиатерогенных микроРНК-126, микроРНК -222, микроРНК -let7b в плазме крови человека, при
5 котором получают препарат путем сушки корней растения дудник в течение недели при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, затем измельчают высушенные корни до порошкообразного состояния, далее к 100 г измельчённого дудника добавляют 100 мл дистиллированной воды, перемешивают, затем полученную смесь кипятят на водной бане в течение 1-3 часа, до
10 уменьшения объёма жидкости в 10 раз, проводят его центрифугирование при 15000 оборотах/минуту в течение 30 минут при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, затем полученный супернатант фильтруют на фильтре Whatman №1, далее раствор концентрируют с помощью роторного испарителя Concentrator plus (Eppendorf) и насоса WP6122050 (Millipore) при следующих условиях:
15 1400 оборотов/мин., температура 30°C , в течении 16 часов, уровень вакуума 10 мбар, затем 5 мл полученного водного экстракта растворяют в 0,9 % водном растворе хлорида натрия в соотношении 1:5, затем полученный препарат вводят пациенту *per os* в объеме 5-ти капель на каждые 10 кг его веса раз в сутки в течение 4-х недель.

20