



УКРАЇНА

(19) UA (11) 145102 (13) U

(51) МПК (2020.01)

A61K 31/196 (2006.01)

A61P 21/00

A61P 29/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 02899

(22) Дата подання заявки: 14.05.2020

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:

(46) Публікація відомостей 25.11.2020, Бюл.№ 22 про державну реєстрацію:

(72) Винахідник(и):

Капелька Ігор Геннадійович (UA),
Міщенко Марія Віталіївна (UA),
Штриголь Сергій Юрійович (UA),
Голота Сергій Миколайович (UA),
Лесик Роман Богданович (UA),
Лозинський Андрій Володимирович (UA)

(73) Володілець (володільці):

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ДАРБУФЕЛОНУ МЕТАНСУЛЬФОНАТУ ЯК ЗАСОБУ ФРИГОПРОТЕКТОРНОЇ ТА ПРОТИСУДОМНОЇ ДІЇ

(57) Реферат:

Застосування дарбуфелону метансульфонату як засобу фригопротекторної та протисудомної дії.

UA 145102 U

UA 145102 U

Корисна модель належить до фармації і медицини, а саме до засобів із фригопротекторною та протисудомною дією.

Дарбуфелон - нестероїдний протизапальний препарат (НПЗП), який здатний одночасно інгібувати циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2) і 5-ліпоксигеназу (5-ЛОГ). Препарат створений з метою досягнення протизапального ефекту класичних НПЗП, але дозволяє уникнути побічних ефектів останніх. Застосування подвійного інгібітору ЦОГ-2/5-ЛОГ сприяє нормалізації порушень у системі L-аргінін/NO, що супроводжується зниженням активності iNOS, вмісту нітрогену оксиду та зростанням вмісту L-аргініну. Це вказує на антиоксидантні та цитопротекторні властивості дарбуфелону [8].

Значну роль у патогенезі ХТ відіграють продукти метаболізму арахідонової кислоти, а саме простагландин F_{2α} (PGF_{2α}) та тромбоксан A₂(TXA₂). Вони особливо активно виділяються після завершення реакції Льюїса, посилюючи вазоконстрикцію, агрегацію тромбоцитів та, відповідно, ішемію, а також беруть участь у розвитку запальної реакції. Поряд з тим зростає утворення простатікліну (PGI₂), який є функціональним антагоністом вищезазначених сполук та дещо сповільнює ішемізацію тканини[4,5,6]. З урахуванням механізму розвитку ХТ можна вважати перспективними фригопротекторами НПЗП, які пригнічують синтез простагландинів. Доведено, що прийом ацетилсаліцилової кислоти (АСК) та ібuproфену покращують прогноз лікування ХТ [5]. Було доведено наявність фригопротекторних властивостей у препаратів целекоксибу та мелоксикаму [1, 7].

Відома роль нейрозапалення у механізмі розвитку епілепсії, де беруть участь простагландини та лейкотриєни [12]. Встановлено, що судоми спричиняють активацію мікроглії та індукцію прозапальних цитокінів у ЦНС, які, в свою чергу, посилюють судомну активність [15]. Проте немає інформації щодо можливої участі інгібіторів синтезу лейкотриєнів як протисудомних агентів.

Задачею корисної моделі є розширення арсеналу ефективних лікарських засобів з фригопротекторною та протисудомною активністю.

Поставлена задача вирішується шляхом застосування дарбуфелону метансульфонату як засобу фригопротекторної та протисудомної дії.

Авторами вперше було виявлено фригопротекторну та протисудомну активність дарбуфелону метансульфонату на моделях гострого охолодження та судом індукованих пентілентетразолом у мишей. Фригопротекторні та протисудомні властивості дарбуфелону невідомі з джерел літератури.

Корисна модель ілюструється такими прикладами.

Приклад 1. Поставлено завдання порівняння сили фригопротекторного ефекту таких засобів: АСК, целекоксиб, диклофенак натрію та дарбуфелон метансульфонат на моделі гострого загального охолодження. АСК, целекоксиб та диклофенак натрію були вибрані як препарати порівняння з урахуванням даних щодо їхньої фригопротекторної активності [10].

Дослідження фригопротекторної активності проводили на 36 білих нелінійних миших обох статей масою 20-22 г, яких утримували за стандартних санітарно-гігієнічних умов у віварії Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету. Під час виконання експерименту дотримано норми та принципи, затверджені Гельсінською декларацією щодо гуманного поводження з тваринами (2000 р.) та Директивою Ради Європейського Союзу щодо захисту тварин, що використовуються з науковою метою (2010 р.). Робота виконана на базі Навчально-наукового тренінгового центру медико-біологічних досліджень Навчально-наукового інституту прикладної фармації.

Для моделювання гострої ХТ мишей вміщували до пластикових кліток без обмеження доступу до повітря та розташовували в морозильній камері "Nord Inter-300" (-18 °C) з прозорою кришкою. Інтегральний показник фригопротекторної дії - час життя тварин в умовах гострого охолодження.

У дослідженні використовували такі препарати: таблетки Аспірин (діюча речовина: АСК; "Bayer", Німеччина), таблетки Целебрекс (діюча речовина: целекоксиб; "Pfizer", США), таблетки Вольтарен (діюча речовина: диклофенак натрію; "Novartis", Швейцарія), порошок дарбуфелону метансульфонату - водорозчинна сіль дарбуфелону. Таблетки і порошок подрібнювали та суспендували з додаванням твіну-80, вводили у вигляді водного розчину крізь зонд внутрішньошлунково (в/ш) в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси тіла тварини у профілактичному режимі за 30 хв до ХТ, як зазвичай прийнято в разі вивчення фригопротекторних властивостей [9]. Тварин розділили на 6 груп: 1 група - контрольна патологія (ХТ)(n=6); 2 група -АСК, 50 мг/кг + ХТ (n=6); 3 група - целекоксиб, 74 мг/кг + ХТ (n=6); 4 група -диклофенак натрію, 14 мг/кг + ХТ (n=6); 5 група - дарбуфелону метансульфонат, 20 мг/кг; 6 група - дарбуфелону метансульфонат, 40 мг/кг. Дозу АСК в 50 мг/кг вибрано, виходячи з досліджень Є. В. Бондарєва [3].

Для статистичної обробки використовували Т-критерій Стьюдента та дисперсійний аналіз ANOVA у разі нормального розподілу, за його відсутності -У-критерій Манна-Вітні та критерій Краскела-Уолліса. Аналіз проводили за допомогою програми Statistica 13.5. Відмінності вважали статистично значущими за $p < 0,05$ [11].

5 Результати дослідження гострої ХТ наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Час життя мишів за умов гострої ХТ

Препарат	Доза, мг/кг	Час, хв		Відмінність з контролем, %	
		M±m	M[Q ₁ ; Q ₃]	M±m	M[Q ₁ ; Q ₃]
Контрольна патологія	-	44,8±2,5	42[40;52]	0	0
АСК	50	52,1±1,6*	53[49;57]	+16	+26
Целекоксиб	74	52,9±2,2*	51[50;56]	+18	+21
Диклофенак натріо	14	58,6±4,8*	54[51;68]	+30	+29
Дарбуфелону метансульфонат	20	63,7±4,3**/&	61,5[57;76]	+42	+46
Дарбуфелону метансульфонат	40	69,5±3,1**/&	70[64;78]	+55	+67
Дарбуфелону метансульфонат	100	65,9±1,3**/&	66[63;68]	+47	+57

Примітка. Статистично значущі відмінності: *-з групою контрольної патології, $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; & - з групою АСК 50 мг/кг, $p < 0,05$.

Як видно з таблиці 1, АСК та целекоксиб виявили помірний позитивний вплив на тривалість життя, збільшили його на 16 % та 18 % відповідно.

10 За результатами дослідження, дарбуфелону метансульфонат чинив виразний фригопротекторний вплив. У дозах 20 мг/кг, 40 мг/кг та 100 мг/кг він дозонезалежно збільшував час життя тварин на 42 %, 55 % та 47 % відповідно у порівнянні з групою контрольної патології та демонстрував достовірно кращі результати у порівнянні як з групою контрольної патології, так і з АСК - препаратом з доведеними фригопротекторними властивостями. Крім того, подвійний блокатор ЦОГ-2/5-ЛОГ на рівні тенденції перевершував за фригопротекторною дією інші засоби з доведеними властивостями - високоселективний інгібітор ЦОГ-2 целекоксиб та невібірковий інгібітор ЦОГ диклофенак натріо.

15 Ці результати вперше засвідчили важливість блокади ліпоксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти та утворення лейкотрієнів для збільшення стійкості організму до впливу холоду.

20 Приклад 2. Завданням було дослідити протисудомну активність заявленої сполуки на моделі пентілентетразолових судом. Як препарати порівняння вибрано класичний антиконвульсант валпроат натрію та целекоксиб - селективний інгібітор ЦОГ-2, для якого доведена протисудомна активність [12].

25 Антиконвульсантні властивості заявленої сполуки вивчали на 46 білих нелінійних миших обох статей масою 20-22 г на базовій скринінговій моделі судом, спричинених PTZ, відповідно до методичних рекомендацій [13, 14]. Під час виконання експерименту дотримано норми та принципи, затверджені Гельсінською декларацією щодо гуманного поводження з тваринами (2000 р.) та Директивою Ради Європейського Союзу щодо захисту тварин, що використовуються з науковою метою (2010 р.). Робота виконана на базі Навчально-наукового тренінгового центру медико-біологічних досліджень Навчально-наукового інституту прикладної фармації.

30 Тварини були рандомізовані на групи: 1 група - контрольна патологія (КП) ($n=7$ в одному досліді та $n=7$ в іншому досліді, які виконували в різний час), 2 група - тварини із модельними судомами, що отримували валпроат натрію, 300 мг/кг в/ш ($n=12$), 3 група - тварини, що отримували целекоксиб, 4 мг/кг в/ш ($n=6$), 4 група - тварини, яким вводили дарбуфелону метансульфонат, 100 мг/кг в/ш ($n=9$).

35 PTZ (Коразол, Sigma, США) вводили через 30 хв у вигляді водного розчину в дозі 90 мг/кг підшкірно (п/ш). Кожну мішу вміщували в окремий прозорий циліндричний контейнер об'ємом 5 л та безперервно спостерігали за твариною протягом 60 хв. Протисудомну активність

досліджуваних сполук оцінювали за такими показниками: тривалість латентного періоду судом, кількість клоніко-тонічних судом на 1 тварину, % мишей у групі окрім з клонічними та тонічними судомами, тяжкість судом у балах (1 бал -поодиноке здригання, 2 бали - "манежний" біг, 3 бали - клонічні судоми, 4 бали - клоніко-тонічні судоми, 5 балів - тонічна екстензія, 6 балів - тонічна екстензія, що призвела до загибелі тварини), тривалість судомного періоду, час життя тварин до загибелі та летальність. У випадку, якщо судоми не спостерігалися протягом 1 год., вважали, що латентний період дорівнює 60 хв [13].

Для статистичної обробки використовували Т-критерій Стьюдента у разі нормального розподілу, за його відсутності -U-критерій Манна-Вітні. Аналіз проводили за допомогою програми Statistica 13.5. Відмінності вважали статистично значущими за $p < 0,05$ [11].

Результати дослідження протисудомної активності наведено у табл.2 та табл. 3.

Таблиця 2

Вплив валпроату натрію на перебіг пентилентетразолових судом у мишей ($M \pm m$)

Показники	Контроль патології (пентилентетразол, 90 мг/кг), n=7	Вальпроат натрію (300 мг/кг), n=12
Латентний період, хв.	5,63±0,76	34,06±7,87**
Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	3,42±0,47	1,42±0,53*
% мишей з судомами		
- клонічними	100	50**
- тонічними	91,67	33,33**
Тяжкість судом, бали	5,58±0,29	2,00±0,64**
Тривалість судомного періоду, хв	9,68±1,96	5,10±2,24*
Час життя тварин до загибелі, хв	15,71±2,70	20,9
Летальність, %	83,33	8,33**

Примітка. Статистично значущі відмінності з групою контрольної патології: * - $p < 0,05$;
** - $p < 0,01$.

Як свідчить табл.2, референс-препарат валпроат натрію у дозі 300 мг/кг виявив виразну протисудомну дію: достовірно щодо групи КП знижував латентний період розвитку судом у 6 разів (34,06±7,87 проти 5,63±0,76, $p < 0,01$), кількість клоніко-тонічних судом на одну тварину в 2,4 разу (1,42±0,53 проти 3,42±0,47, $p < 0,05$), відсоток мишей з клонічними та тонічними судомами (50 % проти 100 % та 33,33 % проти 91,67 %, $p < 0,01$) відповідно, тяжкість судом у 2,8 разу (2,00±0,64 балу проти 5,58±0,29 балу, $p < 0,01$), тривалість судомного періоду в 1,9 разу (5,10±2,24 хв проти 9,68±1,96 хв, $p < 0,05$) та летальність - у 10 разів (8,33 проти 83,33, $p < 0,01$).

Результати впливу подвійного інгібітору ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону та селективного інгібітору ЦОГ-2 целекоксибу наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив дарбуфелону метансульфонату та целекоксибу на перебіг пентилентетразолових судом у мишей ($M \pm m$)

Показники	Контроль патології (пентилентетразол, 90 мг/кг), n=7	Дарбуфелону метансульфонат (100 мг/кг), n=9	Целекоксиб (4мг/кг), n=6
Латентний період, хв.	4,41±0,94	10,18±2,24*	4,88±0,43
Кількість клоніко- тонічних судом на 1 мишу	2,29±0,52	1,17±0,17	2,00±0,37
% мишей з судомами			
- клонічними	100	100	100
- тонічними	85,71	100	66,67
Тяжкість судом, бали	5,57±0,43	4,00±0,00*	4,67±0,62

Таблиця 3 (продовження)

Показники	Контроль патології (пентилентетразол, 90 мг/кг), n=7	Дарбуфелону метансульфонат (100 мг/кг), n=9	Целекоксиб (4мг/кг), n=6
Тривалість судомного періоду, хв	9,66±4,34	0,99±0,89*	7,78±2,59
Час життя тварин до загибелі, хв	15,44±4,50	—	15,5±0,64
Летальність, %	85,71	0,00**	50,00

Примітка. Статистично значущі відмінності з групою контролю патології: * -p<0,05; ** -p<0,01.

Як видно з табл. 3, целекоксиб у дозі 4 мг/кг не виявив виразного антиконвульсантного ефекту: тенденційно, проте статистично незначуще зменшував частку тварин з тонічними судомами на 19,04 %, летальність тварин на 35,71 %. Отже, целекоксиб, виявляючи протизапальний ефект, помірно гальмує судомну активність, проте цей ефект не є достатнім для виразного захисту.

Дарбуфелону метансульфонат порівняно з групою КП достовірно у 2,3 разу подовжував латентний період розвитку судом, зменшував тяжкість пароксизмів на 28,18 %, скорочував тривалість судомного періоду в 9,76 разу та виявив абсолютний захисний ефект щодо летальності. Він не поступається за інтегральною протисудомною активністю валпроату натрію, який також ефективно запобігає летальності мишей із моделлю судомного синдрому (табл.2). Відносно групи целекоксибу дарбуфелону метансульфонат статистично значуще (p<0,05) подовжував латентний період у 2,09 разу та скорочував тривалість судомного періоду у 7,86 разу (табл.3). Більш виразний протисудомний ефект подвійного інгібітору ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону метансульфонату порівняно з таким селективним інгібітором ЦОГ-2 целекоксибу свідчить, що в механізмі розвитку судом важливу роль відіграють як простагландини, так і лейкотриєни, і подвійне інгібування їх синтезу є більш активною складовою антиконвульсантної активності, ніж інгібування тільки простагландинів.

Таким чином, на підставі результатів дослідження вперше виявлено, що дарбуфелону метансульфонат є високоефективним засобом профілактики холодової травми, який перевершує відомі НПЗП, а також виявляє протисудомні властивості на рівні еталонного протиепілептичного препарату валпроату натрію.

Джерела інформації:

1.Бондарев Е. В. Динамика содержания N-ацетилглюказамина у крыс при острой холодовой травме / Е. В. Бондарев, С. Ю. Штыголь// Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. -2014. -Т. 12. -№3. -С. 30-32.

2. Горелик И. Э. Профилактика некроза при отморожениях конечностей в дреактивном и раннем реактивном периодах: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук: спец. 14.01.17 "Хирургия", 14.03.03 "Патологическая физиология" / Горелик Игорь Эрнестович; Сибирский гос. мед. университет Росздрава. - Кемерово. -2010.-23 с.

3. Бондарев Е. В. Влияние глюказамина гидрохлорида и ацетилсалициловой кислоты на показатели углеводного обмена при острой холодовой травме у крыс / Е.В. Бондарев //Оңтүстік Казахстан мемлекеттік фармацевтика академия сыйхабаршы. - 2015. - №1(70). - С. 22-30.

4. Imray C. Cold damage to the extremities: frostbite and non-freezing cold injuries / C. Imray A. Grieve, S. Dhillon // Postgraduate medical journal.-2009. -№85.-P. 481-488.

5. Wilderness Medical Society Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Frostbite: 2014 Update/ Scott E. McIntosh et al. //Wilderness & Environmental Medicine-2011. -№2(22). -P. 156-166.

6. Christoph Sachs. The Triaging and Treatment of Cold-Induced Injuries / Christoph Sachs, Marcus Lehnhardt, Adrien Daigeler // Deutsches Arzteblatt International. -2015. -№112. -P.741-748.

7. Профилактическое и лечебное средство при сочетанной алкогольно-холодовой травме: пат. 2270013 Россия. № RU 2270013C2; заявл. 10.03.04; опубл. 20.02.06.

8. Хавроня О.П. Вплив подвійного інгібітору ЦОГ-2/ЛОГ-5 на функціонування системи L-apriHm/NOу сироватці крові щурів при експериментальній виразці шлунка / О.П. Хавроня//Буковинський медичний вісник. -2014. - Т.2.№2(70). -С. 249-251.

9. Холодова травма доклінічне вивчення лікарських препаратів з фригопротекторними властивостями / Є. В. Бондарев та ін. НФаУ, 2018. 35 с
10. Капелька І. Г. Скринінгове дослідження фригопротекторних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів за гострого загального охолодження / І. Г. Капелька, С. Ю. Штриголь. //Фармакологія та лікарська токсикологія. -2019. -Т.13. №5. -С. 338-343.
- 5 11. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - Москва: Ремедиум, 2000. - С. 349-354.
- 10 12. Oliveira, M. S., Furian, A. F., Royes, L. F. F., Fighera, M. R., Fiorenza, N. G., Castelli, M., Mello, C. F. (2008). Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures. Epilepsy Research, 79(1), 14-21. doi:10.1016/j.epilepsyres.2007.12.008
- 15 13. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних протисудомних препаратів: методичні рекомендації / Під ред. акад. М. Я. Головенко, проф. Л.О. Громова. К.: ДЦ МОЗ України. 2003. - 46 с
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунятын, А. Н. Васильева и др. - М.: Гриф и К. 2012. - 944 с.
- 15 15. The role of inflammation in epilepsy / A. Vezzani et al. Nature Reviews Neurology. -2011. -Vol. 7.- P. 31-40.

20

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Застосування дарбуфелону метансульфонату як засобу фригопротекторної та протисудомної дії.