УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **145104** (13) **U**

(51) МПК (2020.01)
A61K 31/196 (2006.01)
A61P 29/00
A61P 21/00

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2020 02903**

(22) Дата подання заявки: **14.05.2020**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **26.11.2020**

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

(72) Винахідник(и):
Капелька Ігор Геннадійович (UA),
Міщенко Марія Віталіївна (UA),
Штриголь Сергій Юрійович (UA)

(73) Володілець (володільці):
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

(54) ЗАСТОСУВАННЯ МОНТЕЛУКАСТУ ЯК ЗАСОБУ ФРИГОПРОТЕКТОРНОЇ ТА ПРОТИСУДОМНОЇ ДІЇ

(57) Реферат:

Застосування монтелукасту як засобу фригопротекторної та протисудомної дії.

UA 145104 U

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

Монтелукаст - антилейкотрієновий препарат, що селективно інгібує CysLT1-рецептори цистеніїлових лейкотрієнів. Лейкотрієни - важливі прозапальні медіатори, що синтезуються de novo клітинами дихальних шляхів (альвеолярними макрофагами та тучними клітинами) та запального інфільтрату (еозинофілами та нейтрофілами) за їхньої активації. Ці медіатори опосередкують бронхоконстрикцію, гіперсекрецію слизу, підвищення судинної проникності, зниження мукоциліарного кліренсу, хемотаксис еозинофілів у дихальні шляхи. Крім того, лейкотрієни стимулюють диференціацію міофібробластів, сприяючи розвитку субепітеліального фіброзу [1].

До патогенезу холодової травми (ХТ) долучаються порушення функціонування багатьох органів і систем, у тому числі серцево-судинної та дихальної. При цьому відбувається звуження периферичних судин, зростання частоти серцевих скорочень, підвищення тиску та, як результат, централізація кровообігу. Це відбувається в основному за рахунок активності симпато-адреналової системи, відповідальної за розвиток стрес-реакції. При зниженні температури тіла нижче 10 °С спостерігається парадоксальна реакція Льюїса, що полягає у почерговій зміні актів вазоконстрикції та вазодилятації. Значну роль у патогенезі ХТ відіграють продукти метаболізму арахідонової кислоти, а саме простагландин F_{2a} (PGF_{2a}) та тромбоксан A_2 (TXA_2). Вони особливо активно виділяються після завершення реакції Льюїса, посилюючи вазоконстрикцію, агрегацію тромбоцитів та, відповідно, ішемію, а також беруть участь у розвитку запальної реакції. Поміж тим, зростає утворення простацикліну (PGI_2), який є функціональним антагоністом вищезазначених сполук та дещо сповільнює ішемізацію тканини [2-4]. З урахуванням механізму розвитку ХТ, можна вважати перспективними фригопротекторами препарати, що пригнічують активність прозапальних медіаторів. Доведено, що прийом ацетилсаліцилової кислоти (АСК) та ібупрофену покращують прогноз лікування ХТ [3]. Було доведено наявність фригопротекторних властивостей у нестероїдних протизапальних препаратів целекоксибу та мелоксикаму [5, 6]. Ефективність пригнічення лейкотрієнової ланки каскаду арахідонової кислоти при холодовій травмі залишається невідомою.

Значну патогенетичну роль у розвитку епілепсії відводять нейрозапаленню, яке може виникати внаслідок травм голови, нейроінфекції, інсультів та з інших причин, та може ініціювати запальний каскад у ЦНС, що є предиктором розвитку епілепсії [7]. У той же час судомні напади спричиняють активацію імунної системи та призводять до дисбалансу про- та протизапальних цитокінів [8]. Внаслідок цього виникає синдром системної запальної реакції, що призводить до несприятливих дизрегуляторних явищ з подальшим ушкодженням різних органів та систем [7]. Ефективність пригнічення лейкотрієнової ланки каскаду арахідонової кислоти як шляху впливу на запальний процес при судомному синдромі залишається невідомою.

В основу корисної моделі поставлено задачу розширення арсеналу ефективних лікарських засобів фригопротекторної дії для поліпшення якості профілактики та лікування холодових травм та епілепсії.

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

Авторами вперше було виявлено фригопротекторну та антиконвульсантну активності монтелукасту на моделях гострого загального охолодження та судом, що індуковано пентилентетразолом (PTZ) у мишей. Фригопротекторні та протисудомні властивості монтелукасту невідомі з джерел літератури.

Корисна модель ілюструється такими прикладами:

Приклад 1

Завданням прикладу було виявлення фригопротекторного ефекту монтелукасту на моделі гострого загального охолодження. Як препарати порівняння вибрано АСК, целекоксиб та диклофенак натрію з урахуванням відомих даних щодо їхньої фригопротекторної активності [9].

Досліди проводили на 36 білих нелінійних мишах 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.).

Для моделювання гострої ХТ мишей поміщали до індивідуальних прозорих пластикових контейнерів, які не обмежують рухливість тварин і доступ повітря, та розташовували в морозильній камері "Nord Inter-300" (-18 °С) з прозорою кришкою. Інтегральний показник фригопротекторної дії - час життя тварин в умовах гострого охолодження [10].

У дослідженні використовували такі препарати: таблетки Аспірин (діюча речовина: ацетилсаліцилова кислота; "Bayer", Німеччина), таблетки Целебрекс (діюча речовина: целекоксиб; "Pfizer", США), таблетки Вольтарен (діюча речовина: диклофенак натрію; "Novartis", Швейцарія), таблетки Сингуляр (діюча речовина: монелукаст; "Merck Sharp & Dohme Corp.", США). Таблетки 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 [10]. Тварин випадковим чином 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 - монтелукаст, 1 мг/кг; 6 група - монтелукаст, 2 мг/кг. З урахуванням даних [11] вибрано дозу АСК 50 мг/кг як таку, що виявляє виразну фригопротекторну активність. Дози целекоксибу 74 мг/кг та диклофенаку натрію 14 мг/кг є найбільш ефективними при ХТ [9].

Для статистичної обробки використовували Т-критерій Стьюдента та дисперсійний аналіз ANOVA у разі нормального розподілу, за його відсутності - U- критерій Манна-Вітні та критерій Краскела-Уолліса. Аналіз проводили за допомогою програми Statistica 13.5. Кількісні результати наведено як M±m та M[Q_{25};Q_{75}] з огляду на розбіжності характеру розпроділу. Відмінності вважали статистично значущими за $p<0,05$ [12].

Результати дослідження наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив монтелукасту, ацетилсаліцилової кислоти, целекоксибу та диклофенаку натрію на час життя мишей при гострій холодовій травмі (M±m; M[Q_{25};Q_{75}])

Група тварин, препарат	Доза, мг/кг	Час, хв.		Відмінність З контролем (%)	
		M±m	M[Q_{25};Q_{75}]	M+m	M[Q_{25};Q_{75}]
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 натрію	14	58,6±4,8*	54[51;68]*	+31	+29
Монтелукаст	1	51,7±2,3	51,5[46;57]	+15	+23
Монтелукаст	2	58,7+2,7**	61[57;62]**	+31	+45

Примітки. *Вірогідно щодо групи контрольної патології, $p<0,05$;
**вірогідно щодо групи контрольної патології, $p<0,01$.

Як видно з таблиці 1, АСК та целекоксиб виявили помірний, але статистично значущий ($p<0,05$) позитивний вплив на тривалість життя, збільшуючи його проти показника групи контрольної патології відповідно на 16 % і 18 % за середніми значеннями та на 26 % і 21 % за медіанними.

Диклофенак натрію продемонстрував більшу фригопротекторну активність, достовірно ($p<0,05$) збільшуючи тривалість життя тварин на 31 % за середнім та на 29 % за медіанним значенням.

Монтелукаст виявив дозозалежний фригопротеткорний вплив. У дозі 1 мг/кг цей вплив полягав у тенденційному збільшенні тривалості життя на 15 % за середнім і на 23 % за медіанним значенням. У дозі 2 мг/кг монтелукаст з високою достовірністю ($p<0,01$) збільшував тривалість життя тварин на 31 % за середнім та на 45 % за медіанним значенням щодо показника групи контрольної патології. За цим ефектом монтелукаст (2 мг/кг) переважав відомі фригопротектори з доведеним ефектом - АСК та целекоксиб, і не поступався диклофенаку натрію в дозі 14 мг/кг. При цьому блокада CysLTl-лейкотриєнових рецепторів є раніше невідомим підходом до підвищення опірності організму до дії холоду.

Приклад 2

Дослідження протисудомної активності монтелукасту на моделі індукованих судом, що їх індуковано пентилентетразолом (PTZ). Як препарат порівняння вибрано класичний протисудомний препарат вальпроат натрію (Депакін, "Санофі-Авентіс", Франція) в ефективній дозі 300 мг/кг [13, 15, 16].

Антиконвульсантні властивості заявленої сполуки вивчали на 37 статевозрілих білих нелінійних мишах обох статей масою 20-22 г на базовій скринінговій моделі судом, спричинених PTZ, відповідно до методичних рекомендацій [13, 14]. Під час виконання експерименту дотримано принципи Гельсінської декларації щодо гуманного поводження з тваринами (2000 р.) та Директиви Ради Європейського Союзу щодо захисту тварин, які використовуються з науковою метою (2010 р.). Робота виконана на базі Навчально-наукового тренінгового центру медико-біологічних досліджень Навчально-наукового інституту прикладної фармації.

Тварин випадковим чином було розподілено на групи: 1 група - контрольна патологія (КП) - PTZ- індуковані судоми (n=12+7), дві підгрупи цієї групи створено в зв'язку з тим, що дослідження вальпроату натрію та монтелукасту виконували в різні дні, і необхідно було врахувати хронофармакологічний чинник; 2 група - тварини із модельними судомами, що отримували референс-препарат - вальпроат натрію, 300 мг/кг в/ш (n=12),

3 група - тварини із моделлю судом, які отримували монтелукаст, 4 мг/кг в/ш (n=6). Через 30 хв, після введення досліджуваних препаратів у мишей викликали судоми підшкірним (п/ш) введенням PTZ (Коразол, Sigma, США) у вигляді водного розчину в дозі 90 мг/кг [13, 15, 16]. Кожну тварину поміщали в окремий прозорий контейнер об'ємом 5 л та безперервно спостерігали 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 окремо 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. Кількісні результати наведено як M±m. Відмінності вважали статистично значущими за $p<0,05$ [12]. і

Результати дослідження антиконвульсантної активності вальпроату натрію наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Вплив вальпроату натрію на перебіг пентилентетразолових судом у мишей (M±m)

Показники	КП (PTZ, 90 мг/кг), n=12	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 тонічними	 100 91,67	 50** 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**

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

Встановлено, що вальпроат натрію у дозі 300 мг/кг виявив виразну антиконвульсантну активність: достовірно щодо показників групи КП знижував латентний період розвитку пароксизмів у 6,05 разу (34,06±7,87 проти 5,63±0,76, $p<0,01$), кількість клоніко-тонічних судом на одну мишу у 2,4 разу (1,42±0,53 проти 3,42±0,47, $p<0,05$), відсоток тварин з клонічними та тонічними судомами (50 % проти 100 % та 33,33 % проти 91,67 %, $p<0,01$) відповідно, тяжкість пароксизмів у 2,8 разу (2,00±0,64 бала проти 5,58±0,29 бала, $p<0,01$), 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 селективного блокатора лейкотрієнових рецепторів монтелукасту на перебіг судом у мишей наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив монтелукасту на перебіг пентилентетразолових судом у мишей (M±m)

Показники	КП (PTZ, 90 мг/кг), n=7	Монтелукаст (4 мг/кг), n=6
Латентний період, хв	4,41±0,94	4,87±0,61
Кількість клоніко-тонічних судом на 1 мишу	2,29±0,52	1,83±0,40
% мишей з судомами клонічними тонічними	 100 85,71	 100 66,67
Тяжкість судом, бали	5,57±0,43	4,33±0,56
Тривалість судомного періоду, хв	9,66±4,34	6,49±2,90
Час життя тварин до загибелі, хв	15,44±4,50	9,97±3,54
Летальність, %	85,71	33,33*

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

Як видно з результатів дослідження, монтелукаст тенденційно зменшував кількості клоніко-тонічних судом на одну тварину, частку тварин з тонічними пароксизмами та тяжкість судом. Монтелукаст статистично достовірно відносно групи КП знижував головний інтегральний показник тяжкості перебігу судом - летальність тварин - у 2,57 разу (85,71 % проти 33,33 %, p<0,05). За цим показником він не має статистично значущих відмінностей від препарату порівняння вальпроату натрію, який забезпечив виживання 8,33 % (p>0,05). Отже, результати експерименту доводять, що в механізмі розвитку судом важливу роль відіграють лейкотриєни, і блокада лейкотриєнових рецепторів є ефективним шляхом антиконвульсантного впливу.

Таким чином, результати свідчать, що монтелукаст є високоефективним засобом профілактики холодової травми та виявляє протисудомну активність.

Джерела інформації:

1. Куличенко Т.В. Монтелукаст в лечении аллергических болезней / Т.В. Куличенко. // Педиатрическая фармакология. - 2006. - С. 32-40.

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

3. Wilderness Medical Society Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Frostbite: 2014 Update / [E. Scott et al. // Wilderness & Environmental Medicine. - 2011. - P. 156-166.

4. Sachs C. The Triaging and Treatment of Cold-Induced Injuries / C. Sachs, M. Lehnhardt, A. Daigeler. // Deutsches Arzteblatt International. - 2015. - P. 741-748.

5. Ефективність лікування потерпілих від холодової травми / О.В. Андреев, Г.Є. Самойленко, О.В. Синяченко, Є.Д. Єгудіна. // Оригінальні дослідження. - 2016. - С. 87-92.

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

7. Kleen J.K. Brain inflammation initiates seizures / Kleen J.K., Holmes G.L. //Nature Medicine. - 2008. - Vol. 14. - P. 1309-1310.

8. Вастьянов Р.С. Патогенетична роль системи цитокінів при хронічному судомному синдромі. / Р.С Вастьянов, Ю.С. Стрельнікова // Експериментальна і клінічна медицина. - 2016. - Т. 2, № 71. - Р. 36-40.

9. 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.

10. Холодова травма: доклінічне вивчення лікарських препаратів з фригопротекторними властивостями (Методичні рекомендації) / Є.В. Бондарев та ін. НФаУ, 2018. 35 с.

11. Бондарев Е.В. Влияние глюкозамина гидрохлорида и ацетилсалициловой кислоты на показатели углеводного обмена при острой холодовой травме у крыс / Е.В.Бондарев // Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации: матер, республиканской научно-практической конференции с междунар. уч., г. Ташкент. - Ташкент, 2015. - С. 358-359.

12. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов / Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - Москва: Ремедиум, 2000. - С. 349-354.

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. Бунятян, А.Н. Васильева и др. - М.: Гриф и К. 2012. - 944 с.

15. Thiazole-Bearing 4-Thiazolidinones as New Anticonvulsant Agents / M. Mishchenko, S. Shtrygol', D. Kaminskyy, R. Lesyk. // Sci. Pharm. - 2020. - № 88 (1). - P. 16. doi.org/10.3390/scipharm88010016

16. Патент UA 137726 Україна: МПК C07D 277/00, A61K 31/425, A61P 25/08. № u 2019 03066. Тіазолзаміщені похідні 2,4-тіазолідиндіону, що виявляють антиконвульсантну дію / М.В. Міщенко, С.Ю. Штриголь, Р.Б. Лесик, Д.В. Камінський; заявл. 28.03.2019; опубл. 11.11.2019, Бюл. № 21.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Застосування монтелукасту як засобу фригопротекторної та протисудомної дії.

ДП “Український інститут інтелектуальної власності”, вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601