



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59908 (13) A

(51) 7 A61K38/43, A61K35/72

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ З КАРДІОПРОТЕКТОРНОЮ, АНГІОПРОТЕКТОРНОЮ ТА ІМУНОКОРЕГУЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ**

1

2

(21) 2002129594

(22) 02 12 2002

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл № 9, 2003 р

(72) Деримедвідь Людмила Вггалівна, Дроговоз
Світлана Мефодівна, Куценко Тетяна Олек-
сандрівна(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ(57) Використання рекомбінантної Cu-Zn суперок-
сиддисмутази як лікарського засобу з
кардіопротекторною, ангіопротекторною та
імунокорегуючою активністю

Винахід відноситься до медицини та фармації, а саме до засобів з кардіопротекторною, ангіопротекторною та імунокорегуючою дією, зокрема до ендогенних антиоксидантних ферментів - до класу супероксиддисмутази

У кардіологічній практиці досить широко використовуються препарати - антиокисники, які гальмуючи процеси вільно-радикального окиснення (ВРО) переважно на стадії перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), зменшують цитодеструктивні процеси [1]

Так, відомий антиоксидант рослинного походження кверцетин використовується в комплексній терапії при ішемічній хворобі серця (ІХС), міокардитах, атеросклерозі, гіпертонічній хворобі [2-4]

До недоліків препарату можна віднести те, що по-перше він застосовується тільки перорально, що робить неможливим його використання в екстрених станах, що супроводжуються активацією процесів ВРО. По-друге, кверцетин діє на більш пізніх стадіях ВРО, коли патологічний процес вже запущений. Все вище наведене лімітує клінічну ефективність кверцетину

Як антиоксидант у кардіології використовується токоферола ацетат [5, 6]. Він застосовується при тих же показаннях, що і кверцетин. До недоліків препарату можна віднести те, що він, як і кверцетин, гальмує більш пізні стадії ВРО. Парентерально токоферола ацетат застосовується тільки підшкірно та внутрішньом'язово, що знов таки робить неможливим його використання в екстрених станах, що супроводжуються активацією процесів ВРО. При інфаркті міокарду, важкому кардіосклерозі використання токоферола ацетата обмежено

При кардіологічних захворюваннях (ІХС, інфекційному ендокардиті) використовується і церулоплазмін ліофілізований для ін'єкцій [7]

До недоліків препарату слід віднести те, що він застосовується тільки внутрішньовенно крапельно та одержують його з відходів виробництва препаратів крові, що збільшує ризик алергічних та інфекційних ускладнень

Cu-Zn - супероксиддисмутаза (СОД) є одним з найбільш активних антиоксидантних ферментів з антирадикальним механізмом дії. Вона перетворює високо реакційноспроможну форму активного кисню - супероксидний аніон-радикал в менш реакційноспроможний перекис водню, і цим перешкоджає генерації процесів ВРО [8]

Є декілька джерел отримання СОД - з еритроцитів великої рогатої худоби (препарати пероксинорм, орготен) та людини (препарат ерисод), а також методом генної інженерії (препарат рексод)

Препарати пероксинорм та орготен використовуються як протизапальні та радіопротекторні засоби [9]

Недоліком цих препаратів є висока алергічна спроможність, що послужило приводом для обмеження їх використання у медичній практиці (Інформаційне повідомлення ВОЗ №2 від 12 квітня 1994р). Крім того, вважаючи на ризик пріоних інфекцій застосування препаратів крові тваринного походження обмежено

Ерисод - препарат, отриманий з еритроцитів людини використовується як антиглаукоматозний [10] та гепатозахисний засіб [11]. Недоліком препарату є його здатність викликати алергічні реакції. Крім того, незважаючи на ступінь очистки

(19) UA (11) 59908 (13) A

препарату, у ньому можливі гормональні домішки, інфекційні агенти, тощо

Дослідження рекомбінантної СОД (СОД_{гес}), отриманої методом генної інженерії, виявили такі види її активності як гепатозахисна [12] та проти-запальна [13]. Проте нема даних про наявність у рекомбінантної Cu-Zn СОД кардіопротекторних, ангіопротекторних та імунорегулюючих властивостей.

Завданням винаходу є розширення арсеналу засобів з кардіопротекторною, ангіопротекторною та імунорегулюючою дією.

Поставлена задача вирішується шляхом використання рекомбінантної Cu-Zn СОД у якості лікарського засобу з кардіопротекторною, ангіопротекторною та імунорегулюючою активністю.

Нові види фармакологічної активності рекомбінантної Cu-Zn СОД визначені експериментальним шляхом.

На думку авторів, кардіопротекторна, ангіопротекторна та імунорегулююча дія рекомбінантної Cu-Zn СОД обумовлені, не тільки її антирадикальною дією, але і здатністю (при застосуванні у малих дозах від 0,001 до 0,065 мг/кг) стимулювати активність ендогенних антиокисних систем організму, і насамперед, ендогенної СОД. Згідно даних літератури, при введенні в організм ендогенних речовин (гормонів, ферментів та ін.) та їхніх структурних аналогів, виділення цих речовин організмом гальмується (принцип "зворотного зв'язку"). У той же час, як свідчать результати дослідів, використання надто малих доз СОД_{гес} приводить до стимулюючого ефекту. Цей ефект призводить до зменшення кардіодеструктивних процесів, зменшує ліпоперекисне пошкодження ендотелію, покращує функціонування імунної системи організму.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1

Кардіопротекторну активність рекомбінантної Cu-Zn СОД (СОД_{гес}) вивчали на моделі адриаміцинової кардіоміодістрофії (КМД) у щурів. Усі тварини були розподілені на групи інтактні тварини, неліковані тварини з КМД, тварини, з КМД, ліковані СОД_{гес} та тварини з КМД, ліковані кверцетином.

Моделю КМД викликали шляхом однократного внутрішньом'язового введення адриаміцину у дозі 20 мг/кг. Рекомбінантну Cu-Zn СОД, отриману методом генної інженерії з культури штаму дріжджів-продуцентів *Saccharomyces cerevisiae* Y-2134 у Санкт-Петербурзькому НДІ особливо чистих біопрепаратів, вводили внутрішньом'язово у дозі 0,020 мг/кг за 1 годину до застосування адриаміцину. Препарат порівняння кверцетин вводили перорально у дозі 5 мг/кг за 1 годину до введення адриаміцину. У міокарді та сироватці крові дослідних тварин оцінювали інтенсивність процесів ВРО за рівнем малонового діальдегіду (МДА), та дієнових кон'югат (ДК). Ефективність функціонування антиокисної системи оцінювали за рівнем каталази, відновленого глутатіону (G-SH) та активністю СОД. Результати дослідів представлено у таблицях 1 та 2. Як видно з наведених у таблиці 1 даних, при адриаміцинової КМД спостерігається порушення функціональної активності міокарду (табл 1). Зменшилась скорочувальна

функція міокарду (зубець R), порушилась передсердя (PQ) та шлуночкова провідність (QRS), змінилась збудливість передсердь (P), потенціал реполяризації шлуночків (T), а також з'явилися явища ішемії міокарду (сегмент ST нижче ізолінії), та виникла тахікардія (за показником ЧСС). Усе це супроводжувалось значною активацією активація процесів ВРО. Рівень МДА у міокарді контрольних (не лікованих) тварин у порівнянні з інтактом зріс в 2,8 рази, ДК - у 3,4 рази, активність СОД зменшилась у 2,4 рази, а рівень каталази збільшився у 2,8 рази, рівень G-SH зменшився у 2,5 рази (табл 2). У сироватці крові спостерігаються аналогічні тенденції: рівень МДА збільшився у 2,1 рази, ДК у 2,6 рази, а активність ендогенної СОД компенсаторно збільшилась у 1,5 рази, каталази - у 1,6 рази, G-SH - у 2,5 рази.

Використання СОД_{гес} та кверцетину привело до зменшення інтенсивності процесів ВРО.

Під впливом СОД_{гес} спостерігається покращення функціонального стану серцевого м'язу. Про це свідчить відновлення часу розповсюдження потенціалу у передсердях (PQ), зменшенням електрокардіографічних показників ішемії (підйом сегменту ST над ізолінією), нормалізацією шлуночкової провідності (QRS), та ін показників ЕКГ (табл 1). Під впливом СОД_{гес} рівень МДА у міокарді зменшився у 1,7 рази, ДК - у 1,86 рази. Активність ендогенної СОД збільшилась у 1,7 рази, вміст G-SH зріс у 1,9 рази, а рівень каталази у міокарді майже не змінився (табл 2). У сироватці крові рівень МДА та ДК під впливом СОД_{гес} зменшився у 1,4 рази, вміст каталази зменшився у 1,13 рази, GSH - у 1,3 рази, а активність СОД збільшилась у 1,3 рази.

Під впливом кверцетину вміст МДА у гомогенаті міокарду зменшився у 1,2 рази, ДК - у 1,3 рази, рівень G-SH збільшився у 1,6 рази. Активність ендогенної СОД під впливом кверцетину збільшилась у 1,2 рази, рівень каталази дещо зменшився (табл 2). У сироватці крові у тварин з модельною КМП, що отримували кверцетин, рівень МДА зменшився у 1,2 рази, ДК - у 1,3 рази. При застосуванні препарату порівняння також декілька зменшився вміст G-SH та каталази (у 1,2 рази), активність ендогенної СОД збільшилась у 1,1 рази. Покращення цих біохімічних показників під впливом кверцетину супроводжувалось покращенням і функціонального стану міокарду, однак за впливом на систолічний показник (СП) та за спроможністю зменшувати явища ішемії міокарду (зубці R, підйом сегменту ST над ізолінією) (табл 1) кверцетин поступався препарату рекомбінантної СОД.

Очевидно, не однотипні результати дії антиокисників при модельній КМД обумовлені тим, що СОД_{гес} та кверцетин мають різні механізми реалізації антиокислювальної дії. СОД_{гес} дисмутуючи високо реакційно-спроможну форму активного кисню - супероксидний аніон-радикал, перетворює його в менш реакційноздатний перекис водню [8, 10-13], який подальше каталізується каталазою та глутатіон - пероксидазою до H₂O та O₂. Це попереджає процес ВРО - деструкції кардіоміоцитів, який спричиняється дією адриаміцину, що і підтверджено у наших дослідях. СОД_{гес} також че-

рез вищезазначений механізм дії, зменшує пошкоджуючий вплив продуктів ВРО на активні центри ферментів - антиокисників, і цим захищає їх від пошкодження Кверцетин, майже за всіма показниками, що досліджувались, поступався СОД_{rec}, що очевидно, обумовлено тим, що він діє переважно

на стадії перекисного окислення ліпідів, коли процес деструкції кардіоміоцитів вже запущено [2,3]

Таким чином, дослідження показали, що за ступенем інгібування процесів ВРО у міокарді та сироватці крові при адриаміциновій КМД, Cu-Zn СОД_{rec} перевищує дію кверцетину

Таблиця 1

Дія препаратів СОД_{rec} та кверцетину на показники ЕКГ та ВКС при МКД у щурів

Показник	Інтактні тварини	Контрольні (не ліковані тварини)	КМД+СОД _{rec}	КМД+кверцетин
ВКС	0,31±0,01	0,53±0,01*	0,4610,02**	0,48±0,01**
ЧСС, уд/хв	401,8±9,4	358,1±15,1*	481,2±12,1**	452,8±21,1**
СП, %	51,40±42,4	40,5±10,1	46,2±1,4**	55,2±1,9,
RQ, сек	0,06±0,002	0,045±0,001*	0,048±0,002**	0,04±0,003*
QRS, сек	0,02±0,001	0,013±0,002	0,015±0,003	0,02±0,003**
QT, сек	0,063±0,002	0,05±0,005	0,051±0,001	0,072±0,004**
R, мВ	0,73±0,033	0,40±0,084*	0,641 ±0,08**	0,84±0,09**
P, мВ	0,112±0,007	0,069±0,019*	0,100±0,01**	0,096±0,016**
T, мВ	0,161±0,012	0,025±0,04*	0,152±0,003**	0,140±0,019*
Підйом ST над ізолінією	1,4±0,16	-0,42±0,31*	1,00±0,1*	-0,38±0,2

*p ≤ 0,05 вірогідно у порівнянні з інтактом,

**p ≤ 0,05 вірогідно у порівнянні з контролем

Таблиця 2

Вплив рекомбінантної СОД та кверцетину на показники ВРО та ЕАОС при адриаміциновій КМД, (М±m)

Умови дослуду	Гомогенат міокарду					Сироватка крові				
	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л	СОД, мккат/л	Каталаза, УО	G-SH, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л	СОД, мккат/л	Каталаза, УО	G-SH, мкмоль/л
Інтактні тварини, n=10	61,9±4,3	4,2±0,3	0,9±0,09	59,0±3,0	3,01±0,4	2,0±0,05	0,05±0,01	0,4±0,03	91,1±2,7	1,2±0,1
Контрольні (не ліковані тварини), n=10	172,4±9,2*	15,1±2,4*	0,37±0,02*	151,2±9,8*	1,2±0,1*	4,2±0,2*	0,13±0,03*	0,6±0,05*	119,8±9,3*	2,7±0,38*
СОД _{rec} , n=10	101,2±6,1**	8,1±2,1**	0,63±0,02**	148,1±4,9**	2,3±0,3**	3,0±0,3**	0,09±0,001	0,8±0,05**	105,4±9,1	2,0±0,3**
Кверцетин, n=10	146,1±7,8	11,3±3,2	0,45±0,05	148,0±2,9**	2,0±0,4**	3,4±0,4**	0,1±0,02	0,7±0,04**	100,1±2,3	2,2±0,4

n-кількість тварин у групі

*p ≤ 0,05 вірогідно у порівнянні з інтактом

**p ≤ 0,05 вірогідно у порівнянні з контролем

1 Застосування СОД_{rec} при модельній КМД призвело до покращення функціональної активності міокарду, зменшило інтенсивність кардіодеструктивних процесів, нормалізувало активність ендогенної антиокисної системи

2 За всіма показниками, що досліджувались, дія СОД_{rec} переважала дію кверцетину

3 Кардіопротекторний ефект СОД_{rec} спостерігається при застосуванні СОД_{rec} У Дозі в 250 раз меншій, ніж у кверцетина, що традиційно використовується в терапії КМД

Приклад 2

Метою наших дослідів було вивчення впливу застосування антиокисників - рекомбінантної супероксиддисмутази (СОД_{rec}) та α-токоферолу ацетату на стан ендогенної антиокисної системи крові, інтенсивність процесів ВРО та вміст ліпідів та ліпопротеїдів сироватки крові та визначення ангіпротекторної дії рекомбінантної СОД при модельному холестеринозі у кролів

Досліди проводились на 30 кролях-самцях вагою 2,5-2,8кг Експериментальну

дісліпопротеїнемію викликали шляхом трьохмісячного перорального введення холестерину у дозі 0,3г/кг у вигляді олійного розчину через зонд [3] Усі тварини були розділені на 4 групи 1 група (6 кролів) - інтактні тварини, яким через зонд вводили еквівалентний об'єм соняшникової олії, 2 група (8 тварин) - контрольні, неліковані тварини, 3 група (8 тварин) -яким на фоні застосування холестерину, внутрішньом'язово вводили рекомбінантну СОД у дозі 0,065мг/кг, 4 група (з 8 кролів), який на фоні введення холестерину внутрішньом'язово вводили α-токоферолу ацетат у дозі 25мг/кг Дози рекомбінантної супероксиддисмутази - СОД_{rec} та α-токоферолу ацетату (вітаміну Е) вибрані з урахування попередніх експериментальних досліджень На протязі дослуду проводили постійний нагляд за тваринами та з метою корекції доз застосування препаратів, проводили щотижневе зважування кролів

В результаті гістологічних досліджень встановлено, що в групі тварин лікованих Cu-Zn СОД_{rec}

товщина судинної стінки менша, ніж у неліквованого контролю. Усі три оболонки дуги аорти більш виразні. На окремих ділянках спостерігається помірне розпушення субендотеліального шару, набряк окремих ептеліальних клітин. Структура міокарду у групі тварин, яким вводили СОД_{гес}, не змінена. Артерії дрібного калібру у внутрішніх шарах міокарду характеризуються менш виразним набряком інтими у порівнянні з неліквованим контролем. У групі тварин, яким вводили α-токоферол ацетат, в інтими спостерігається потовщення. Клітини епітелію в цих ділянках набрякли, дистрофічно змінені. Субендотеліальний шар дещо розпушений. Структура міокарду не змінена, набряк інтим коронарних артерій менший, чим у неліквованого контролю.

1 В результаті проведеного дослідження встановлено наявність у Cu-Zn СОД_{гес} ангіопротекторної дії.

2 Аналіз результатів гістологічних досліджень свідчить про те, що за ангіопротекторною активністю СОД_{гес} перевищує дію препарату, що традиційно використовується в комплексній терапії гіперліпідемій - α-токоферол ацетат.

Приклад 3

Імунокорегуючу дію СОД_{гес} вивчали на моделі ізадринного міокардиту (ІЗМ) у щурів. Патологію викликали шляхом внутрішньом'язового введення ізадрину в дозі 60мг/кг на протязі 4 діб. Усі тварини були розподілені на 4 групи: інтактні тварини, неліквовані тварини з ІЗМ, тварини з ІЗМ, ліковані СОД_{гес} у дозі 0,020мг/кг та тварини з ІЗМ, ліковані α-токоферол ацетатом у дозі 25мг/кг. По закінченні дослідів у тварин вивчали стан імунної

системи загально прийнятими методами. Результати досліджень наведено у таблиці 3.

Як видно з представлених у табл. 3 даних, ізадринний міокардит супроводжується значними змінами з боку імунної системи: рівень загального комплементу виріс у 2,1 раз, активність фагоцитозу збільшилася в 1,3 рази (на 30хв дослідів) і 1,4 рази (на 90 хвилину дослідів). Під впливом ізадрину збільшилося число Е-РОК (у 1,6 рази), що очевидно зв'язано з впливом ізадрину на інтенсивність проліферативних процесів у імунокомпетентних тканинах (табл. 3). Паралельно з цим відзначається значне збільшення кількості ЦІК-низькомолекулярних у 4,5 рази, високомолекулярних - у 5,2 рази. Описані зміни відповідають показникам імунограми при токсико-алергічних міокардитах.

Використання СОД_{гес} привело до зменшення активності фагоцитозу в 1,3 рази (30хв) і в 1,5 разів (90 хвилини), зменшило рівень загального комплементу в 1,7 рази, ЦІКів - низькомолекулярних - у 2,2 рази, високомолекулярних - у 1,7 разів (табл. 3), число Е-РОК під впливом СОД_{гес} наблизилося до нормальних величин.

У той же час вплив α-токоферолу на описані вище імунологічні показники встановлено, що за всіма показниками, що досліджувались, він дещо поступався СОД_{гес}. Менше впливав на вміст загального комплементу, рівень ЦІК і активність фагоцитозу (табл. 3), однак по ступені впливу на рівень Е-РОК ефекти СОД_{гес} та α-токоферолу ацетату були аналогічні.

1 В результаті дослідів встановлено імунокорегуючу активність СОД_{гес}.

Таблиця 3

Вплив СОД_{гес} та α-токоферол ацетату на показники імунограми при ІЗМ

Умови дослідів	Активність фагоцитозу, %		Загальний комплемент, умов гемоліт ОД	ЦІК, ОД		Е-РОК, абс число
	30хв	90хв		Низькомолекулярні	Виськомолекулярні	
Інтакт	70,1±1,3	68,4±0,82	40,1±2,0	0,062±0,004	0,048±0,004	30,6±1,72
ІЗМ	89,8±2,4*	93,2±2,1*	84,5±8,1*	0,28±0,02*	0,25±0,03*	49,5±0,9*
СОД _{гес}	68,1±1,0**	62,4±1,3**	45,3±3,1**	0,13±0,03**	0,12±0,006**	3,48±1,5**
α-токоферол ацетат	80,5±1,7	87,8±1,4	71,6±8,5	0,19±0,01**	0,22±0,04	37,1±1,1

*p ≤ 0,05 вірогідно у порівнянні з інтактом **p ≤ 0,05 вірогідно у порівнянні з контролем (ІЗМ)

2 За ступенем впливу на показники неспецифічної імунорезистентності та специфічної імунореактивності ефективність СОД_{гес} вище, ніж α-токоферолу ацетату.

3 Імунокорегуючий ефект СОД_{гес} спостерігається при застосуванні СОД_{гес} у дозі в 1250 раз меншій, ніж у α-токоферолу ацетату.

Список джерел інформації

1 Горчакова Н.О., Олійник С.А., Гаркава К.Г., Купраш Л.П., Чекман І.С., Туманов В.А., Горбань Є.М., Гарник Т.П., Барабой В.А. Антиоксидантні засоби - необхідні компоненти комплексної фармакотерапії //Фітотерапія в Україні - 2000 - №1 - С 7-13

2 Колчин Ю.Н., Попович Л.Ф., Грабовский А.Н. и др. Влияние блокатора 5-липоксигеназы кверцетина на функциональные и морфологические проявления поражения миокарда при ишемии и реперфузии сердца //Кардиология - 1990 - Т 30, №3 - С 72-75

3 Яковлева Л.В., Горбань Є.М., Сахарова Т.С. Експериментальне вивчення кардіопротекторної активності альтану порівняно з кверцетином //Одеський мед. журнал, 2002 - №1(69) - С 19-22

4 Ковалев В.Б., Ковган В.В., Колчина Е.Ю. Механізми ліцебного действа биофлованоида кверцетина (обзор литературы) //Український медичний альманах - 2000 - Т 2, №4 - С 176-183

5 Машковский М Д Лекарственные средства В 2 т Т 2 - М ООО "Издательство Новая Волна", 2000 - С 91

6 Абрамченко В В Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве (Оксидативный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами) - СПб Изд-во ДЕАН, 2001 - С 129

7 Абрамченко В В Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве (Оксидативный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами) - СПб Изд-во ДЕАН, 2001 - С 134

8 Абрамченко В В Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве (Оксидативный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами) - СПб Изд-во ДЕАН, 2001 - С 22

9 Справочник Видаль Лекарственные препараты в России Справочник - М АстраФармСервис, 1995 - С 723

10 Алексеев В Н , Мартынова Е Б , Чурилова И В Способ лечения первичной открытоугольной глаукомы Патент РФ на изобретение №2144343 от 20 января 2000г , по заявке №97118811 от 17 ноября 1997г

11 Деримедвидь Л В Фармакологічне вивчення гепатозахисних властивостей супероксиддисмутази Автореф дис канд мед наук - Харків - 1996 - 21с

12 Деримедвидь Л В Фармакологічне дослідження гепатозахисної дії рекомбінантної супероксиддисмутази при хронічних гепатитах //Ліки -1999 -№3-4 -С 14-17

13 Черепак Л Н , Деримедведь Л В Хронофармакологическая зависимость противовоспалительного действия супероксиддисмутазы// Таврический медикобиологический вестник - 2000 - №1-2 - Т 33 - С,132-134