



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129441** (13) **U**
(51) МПК
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2018 05817	(72) Винахідник(и): Супрун Еліна Владиславівна (UA), Терещенко Сергій Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.05.2018	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.10.2018	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.10.2018, Бюл.№ 20	

(54) СПОСІБ ЦИТОКІНОВОЇ ЕНДОТЕЛІЙТРОПНОЇ НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

(57) Реферат:

Спосіб цитокінової ендотеліятропної нейропротекції при цукровому діабеті, при якому вводять внутрішньом'язово рекомбінантний інтерлейкін-2 (Ронколейкін) у дозі 0,01 мг/кг один раз на добу протягом 18 днів.

UA 129441 U

Корисна модель належить до медицини та фармації, зокрема до фармакотерапії, і може бути використана в комплексному лікуванні хворих з цукровим діабетом.

Цукровий діабет (ЦД) - неухильно прогресуюче захворювання, що вражає переважно осіб працездатного віку і швидко приводить до розвитку системних ускладнень. ЦД посідає третє місце в статистиці смертності після серцево-судинних і онкологічних захворювань. Основною причиною інвалідизації і летальності при ЦД є мікро- і макросудинні ускладнення, що призводять до розвитку серцево-судинних та цереброваскулярних захворювань. При ЦД індукований гіперглікемією оксидативний стрес призводить до ендотеліальної дисфункції, активації тромбоцитів і моноцитів, проліферації гладком'язових волокон, в подальшому - до розвитку діабетичних ангіопатій, формуванню гіпоксії/ішемії та постгіпоксичних ускладнень [1]. Висока частка ускладнень ЦД зумовлена порушеннями тканинного метаболізму з масштабним ушкодженням мікрокапілярного русла органів, що призводить до формування мультиорганної патології, в тому числі неврологічних ускладнень ЦД: мікро- і макроангіопатії, енцефалопатії, дистальних невротатій, інсульту [2]. Таким чином, головним завданням ефективної терапії та профілактики неврологічних ускладнень ЦД є блокування взаємообумовлених ланок патогенезу - судинних, метаболічних і феномена оксидативного стресу, у зв'язку з чим значна увага приділяється пошуку ефективних нейропротекторів та антигіпоксантів з ендотеліопротективною дією [3].

На даний момент з метою фармакологічної корекції ендотеліальної дисфункції застосовують лікарські засоби, здатні заміщати природні протекторні ендотеліальні субстанції; інгібітори або антагоністи ендотеліальних констрикторних факторів; препарати, що регулюють вироблення NO - основного модулятора всіх "позитивних" функцій ендотелію. Перспективною ланкою пошуку препаратів з ендотеліопротективними властивостями є група препаратів з метаболічною дією, серед яких такі загальновідомі, як триметазидин, тіотриазолін, L-карнітин, мілдронат, кверцетин, а в неврологічній практиці - актовегін, мексидол, ноотропіл, інстенон, тіотриазолін, що мають найбільшу тропність до нервової тканини [4].

Однак існуючі лікарські засоби мають ряд істотних недоліків, а саме:

- 1) малий перелік препаратів, які використовуються і недостатньо вивчений механізм їх дії;
- 2) фармакологічна дія засобів, що використовуються при ендотеліальній дисфункції, спрямована не на всі ланки патогенезу, а тільки на окремі з них, що значно обмежує ендотеліопротективну активність препаратів;
- 3) існують дані про негативну дію препаратів цих класів на ендотелій, підвищення ризику розвитку серцевої недостатності і аритмій на тлі їх прийому.

Так, відомий енергомобілізуєчий ноотропний засіб тіоцетам [5] покращує мозковий кровообіг, підвищує стійкість мозку до гіпоксії та агресивних впливів, усуває порушення пам'яті, активує відновлювальні процеси в мозку після черепно-мозкової травми, інсульту, нейроінтоксикації.

Тіоцетам протипоказаний при гострій нирковій недостатності, діабеті, алергічній реакції на препарат, періодах вагітності та лактації, гострих порушення мозкового кровообігу (геморагічний інсульт). Тіоцетам впливає на агрегацію тромбоцитів, тому його необхідно застосовувати з обережністю у хворих з порушенням гемостазу, під час хірургічних втручань та у хворих на цукровий діабет.

Комбінований препарат мілдронат [5], відомий як інгібітор біосинтезу L-карнітину, при ушкодженнях різного генезу позитивно впливає на адаптаційні можливості мозку та регрес неврологічних порушень.

Застосування мілдронату протипоказано при підвищеній чутливості до компонентів препарату та може потенціювати дію нітрогліцерину, ніфедипіну, β -адреноблокаторів, антигіпертензивних засобів і периферичних вазодилаторів.

В основу корисної моделі поставлено задачу експериментальної розробки патогенетично обґрунтованого, вискоєфективного нейропротективного засобу з ендотеліотропною дією.

Рішення поставленої задачі забезпечує розроблений спосіб цитокинової ендотеліотропної нейропротекції при цукровому діабеті шляхом внутрішньом'язового введення рекомбінантного інтерлейкіну-2 (Ронколейкін) у дозі 0,01 мг/кг один раз на добу протягом 18 днів.

Вибір рекомбінантного інтерлейкіну-2 (Ронколейкін) як засіб вторинної церебропротекції здійснено авторами з наступних міркувань. Розвиток ішемічного інсульту супроводжується масивним внутрішньоклітинним надходженням іонів кальцію, стимулює активацію фосфоліпаз і протеїназ та запускає багаторівневий каскад цитокинів, зокрема інтерлейкінів [6]. Інтерлейкін-2 (ІЛ-2) при ішемічному інсульті приймає участь у формуванні швидкої імунної відповіді організму - індукує проліферацію В-лімфоцитів, активує цитотоксичні Т-лімфоцити, стимулює природні кілери, генерує лімфокін-активовані кілери (LAK), бере участь у формуванні "цитокинового

каскаду" шляхом стимулювання синтезу і секреції ряду інших цитокінів - ІЛ-4, ІЛ-6, гамма-інтерферону, колоній-стимулюючих факторів (CSFs), факторів росту пухлин (THFs).

5 Ронколейкін застосовують для корекції вторинної імунної нестачі - в комплексній терапії сепсису різної етіології та інших гнійно-запальних захворювань, тяжких бактеріальних інфекцій та онкологічних процесів.

Відомості про можливе використання рекомбінантного ІЛ-2 як патогенетичного церебропротектора з ендотеліотропною дією в наявних літературних джерелах відсутні.

10 Як препарат порівняння (референтний препарат) був використаний відомий церебропротектор тіоцетам, які широко застосовуються в комплексній фармакотерапії ішемічних енцефалопатій.

Суть запропонованої корисної моделі пояснюється прикладами.

Приклад 1.

Матеріалом дослідження служив рекомбінантний препарат інтерлейкіну-2 (Ронколейкін), який є структурним та функціональним аналогом ендогенного інтерлейкіну-2.

15 Клініко-фармакологічна група: L03AC01. Інтерлейкін. Препарат з протипухлинною та імунomodуючою активністю.

20 ІЛ-2 продукується субпопуляцією Т-лімфоцитів (Т-хелпери I) у відповідь на антигенну стимуляцію. Синтезований ІЛ-2 впливає на Т-лімфоцити, підсилюючи їх проліферацію та наступний синтез ІЛ-2. Біологічні ефекти ІЛ-2 опосередковуються його зв'язуванням зі специфічними рецепторами, що представлені на різних клітинних мішенях.

В нашому дослідженні використовувався Ронколейкін виробництва ЗАТ "Трудовий колектив Київського підприємства по виробництву бактерійних препаратів "Біофарма" (м. Київ, вул. М. Амосова, 9).

25 Дослідження проводили на білих нелінійних щурах, отриманих з розплідника Інституту фармакології і токсикології АМН України. Розвиток ендотеліальної дисфункції та ендотеліопротективну активність Ронколейкіну оцінювали по морфофункціональних характеристиках ендотеліоцитів капілярної мережі кори головного мозку і судинної стінки судин головного мозку щурів на 18 добу експериментальної гіперглікемії.

30 Дослідження проводилися на 50 білих безпородних щурах масою 250-300 г, що містились в стандартних умовах віварію і були розподілені на 4 групи по десять тварин в кожній. Перша група - інтактні тварини (контроль), друга - тварини з експериментальним алоксановим цукровим діабетом (ЕАЦД), третя - тварини з ЕАЦД, яким вводили Тіоцетам в дозі 500 мг/кг внутрішньом'язово 1 раз на добу (група ЕАЦД+Тіоцетам); четверта - тварини з ЕАЦД, яким в тому ж режимі вводили Ронколейкін в дозі 0,01 мг/кг (група ЕАЦД+Ронколейкін). Тваринам 35 першої та другої груп протягом дослідження у відповідному обсязі внутрішньом'язово вводили стерильний фізіологічний розчин.

40 Після закінчення експерименту, згідно з протоколом дослідження, тварин наркотизували тіопенталом натрію (40 мг/кг), розкривали черепну коробку і витягували головний мозок. Для морфометричних і гістоімунохімічних досліджень головний мозок фіксували в 10 % рідині Буена (24 години) і за стандартною схемою заливали в парафінові блоки, з яких готували серійні фронтальні 5-мікронні гістологічні зрізи. Для вивчення морфофункціонального стану ендотеліоцитів капілярів IV-V шарів кори і стінки судин судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок центральної мозкової і очної артерій (далі по тексту: судин 45 головного мозку) гістологічні зрізи депарафінували за стандартною методикою і фарбували галоціанін-хромовими квасцями по Ейнарсону для специфічного виявлення РНК. Для ендотеліальних клітин судин визначали наступні показники [7]:

площа ядра;

середній діаметр ядра, враховуючи, що ядро ендотеліальної клітини судин в поперечному розмірі має форму сильно витягнутого еліпса, - мінімальний еліптичний діаметр;

50 концентрацію РНК в ядрі (одиниці оптичної щільності, O_{opt}), яку розраховували як логарифм відношення оптичної щільності ядра до оптичної щільності міжклітинної речовини;

щільність ядер ендотеліоцитів як кількість клітин на 1 мм^2 площі зрізу кори мозку в області IV-V шарів кори і стінки судин судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок центральної мозкової і очної артерій.

55 Визначення експресії васкулоендотеліального фактору росту (vascular endothelial growth factor, VEGF) проводили за методикою, в якій використовували первинні антитіла IgG1 миші до ендотеліального фактору росту пацюка/людини (клон СН-10), виробництва Chemicon (кат. № MAB 1665). При цьому вираховували концентрацію VEGF в досліджуваній тканині (одиниці оптичної щільності, O_{opt}), яку розраховували як логарифм відношення статистично значущою 60 інтенсивності флюоресценції до флюоресценції міжклітинної речовини [10]. Статистичну

обробку результатів проводили методами математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм "Біостатистика для Windows, версія 4.03" і "Microsoft Excel 2002". Достовірними вважали відмінності з рівнем значимості більше 95 % ($p < 0,05$).

5 Вивчення судинного компонента кори головного мозку, представленого капілярною мережею, свідчить, що розвиток експериментальної гіперглікемії супроводжувався порушенням функціональної активності ендотелію - спостерігалось значне зниження площі ядер (18 %), діаметра ядер (31 %) та щільності ядер ендотеліоцитів капілярів (21 %) на одиницю площі зрізу кори головного мозку в порівнянні з інтактними тваринами (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристики ендотеліоцитів капілярів IV-V шарів кори головного мозку щурів з АЕЦД ($M \pm m$) (n=10)

Група тварин	Щільність ядер, мкм ²	Площа ядер на 1 мм ² кори	Діаметр ядер, мкм ²	Концентрація РНК в ядрах, О _{ОЦ}
Інтактні тварини	884,00±13,70	8,43±0,13	2,93±0,12	0,29±0,02
Контроль - тварини з ЦД	694,40±11,92*	6,89±0,16*	2,03±0,07*	0,20±0,01*
Тварини з ЦЦ + Тіоцетам	789,80±11,84* ^К	7,46±0,18*	2,74±0,02 ^К	0,30±0,01 ^К
Тварини з ЦД + Ронколейкін	824,09±25,87* ^К	8,38±0,36 ^{КТ}	2,44±0,30 ^К	0,28±0,04 ^К

Примітки:

1. * - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно інтактних тварин;
2. ^К - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи контролю;
3. ^Т - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи Тіоцетаму;
4. n - кількість тварин в групі.

10

Це відображає формування ендотеліальної дисфункції, яка призводить до закриття капілярів і зменшення щільності функціонуючих судин, тобто до процесу прогресуючої ішемізації кори мозку. Моделювання АЕЦД супроводжувалося також падінням концентрації РНК в ядрах ендотеліоцитів капілярів на 27 % в порівнянні з інтактними тваринами.

15

Введення Ронколейкіну надавало ендотеліопротективний ефект щодо ендотеліоцитів капілярів, що проявлялося достовірним збільшенням щільності ядер ендотеліоцитів (19 %) на одиницю площі зрізу кори, гіпертрофією ядер (22 %) і підвищенням в них концентрації РНК на 40 %. Даний факт може свідчити про активну ревазуляризацію і відновлення капілярної мережі в корі головного мозку тварин з експериментальною гіперглікемією, які отримували Ронколейкін.

20

Призначення тваринам з АЕЦД референс-препарату тіоцетаму в дозі 500 мг/кг виявило подібну, але менш виразну протективну дію щодо ендотелію капілярів кори мозку.

Приклад 2.

25

Вивчення стінки судин судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок центральної мозкової і очної артерій (далі по тексту: судин головного мозку) показало, що щільність ядер ендотеліоцитів тут на порядок перевищує аналогічний показник капілярної мережі кори головного мозку. В результаті моделювання АЕЦД на 18 добу експерименту спостерігається зниження щільності ядер ендотеліоцитів на 50 % на одиницю площі стінки судин, зменшення концентрації РНК на 38 % у порівнянні з інтактними тваринами (табл. 2). Це свідчить про пошкодження судин м'язового типу внаслідок гіперглікемії, що невідворотно впливає на функціональний стан мікроциркуляторного русла мозку і формування ендотеліальної дисфункції.

30

Таблиця 2

Характеристики ендотеліоцитів стінки судин головного мозку щурів з АЕЦД ($M \pm m$) (n=10)

Група тварин	Щільність ядер, мкм ²	Площа ядер на 1 мм ² кори	Діаметр ядер, мкм ²	Концентрація РНК в ядрах, ООЦ
Інтактні тварини	14373,80±471,18	7,13±0,14	2,96±0,07	0,30±0,01

Таблиця 2

Характеристики ендотеліоцитів стінки судин головного мозку щурів з АЕЦД ($M \pm m$) (n=10)

Група тварин	Щільність ядер, мкм^2	Площа ядер на 1 мм^2 кори	Діаметр ядер, мкм^2	Концентрація РНК в ядрах, ООЦ
Контроль - тварини з ЦД	7202,10 \pm 270,32*	6,00 \pm 0,09*	2,00 \pm 0,03*	0,19 \pm 0,02*
Тварини з ЦД + Тіоцетам	8902,80 \pm 161,61* ^K	6,90 \pm 0,13 ^K	2,20 \pm 0,08* ^K	0,22 \pm 0,01* ^K
Тварини з ЦД + Ронколейкін	10298,83 \pm 125,58* ^{KT}	7,94 \pm 0,23 ^{KT}	2,52 \pm 0,10 ^K	0,39 \pm 0,73 ^{KT}

Примітки:

1. * - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно інтактних тварин;
2. ^K - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи контролю;
3. ^T - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи Тіоцетаму;
4. n - кількість тварин в групі.

5 На тлі введення референс-препарату Тіоцетаму спостерігається часткове відновлення судинної мережі за рахунок ревазуляризації ішемізованих відділів. Проте, щільність ядер ендотеліоцитів залишається на 38 % менше ніж у інтактних щурів. Курсове введення Ронколейкіну тваринам з АЕЦД призводить до підвищення щільності ядер ендотеліоцитів судинної стінки судин головного мозку на 43 %, достовірного підвищення пулу РНК і практично повного відновлення щільності ендотеліоцитів.

Приклад 3.

10 Для більш детальної характеристики процесів ревазуляризації було вивчено ступінь зв'язування VEGF ендотелію капілярів та стінки судин головного мозку щурів з АЕЦД (табл. 3).

Таблиця 3

Концентрація васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) в ендотеліоцитах капілярів IV-V шарів кори та стінках судин головного мозку щурів з АЕЦД ($M \pm m$) (n=10)

Група тварин	Концентрація VEGF, О _ц	
	Ендотеліоцити капілярів IV-V шарів кори	Ендотеліоцити стінки судин головного мозку
Інтактні тварини	0,81 \pm 0,09	1,37 \pm 0,05
Контроль - тварини з ЦД	0,48 \pm 0,03*	0,68 \pm 0,04*
Тварини з ЦД + Тіоцетам	0,65 \pm 0,03* ^K	1,95 \pm 0,09* ^K
Тварини з ЦД + Ронколейкін	0,69 \pm 0,16 ^{KT}	2,26 \pm 0,15* ^{KT}

Примітки:

1. * - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно інтактних тварин;
2. ^K - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи контролю;
3. ^T - достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи Тіоцетаму;
4. n - кількість тварин в групі.

15 Встановлено, що на 18-ту добу експериментальної гіперглікемії спостерігалось достовірне зменшення зв'язування VEGF з судинним ендотелієм капілярної мережі кори на 41 % та ендотелієм судин мозку на 50 %. VEGF індукує в мозку зростання нових судин, а також пригнічує запальну реакцію, тому його дефіцит вказує на формування дисфункції ендотелію.

20 Введення Ронколейкіну привело до підвищення концентрації фактора росту ендотелію капілярної мережі кори в 1,5 разу та ендотелію судин мозку в 2,3 разу в порівнянні з нелікованими тваринами на 18-ту добу спостереження. Введення Тіоцетаму впливало на процес зв'язування VEGF з ендотелієм капілярів та судин мозку менш виразно та достовірно відрізнялося від ефектів Ронколейкіну та IL-1ra.

Отже, моделювання експериментальної гіперглікемії супроводжувалось зменшенням таких параметрів ендотеліальних клітин капілярів кори та стінки судин головного мозку як середній

діаметр, площа та щільність ядер, а також до зниження концентрації в них РНК та ступеня зв'язування ендотеліального фактора росту. Курсове введення досліджених препаратів тваринам з АЕЦД призводить до підвищення щільності ядер ендотеліоцитів капілярної мережі кори і судинної стінки судин головного мозку, підвищення пулу РНК і активації трансляційної активності клітин відносно VEGF на 18 добу дослідження. Більш активним за впливом на середній діаметр, площу, щільність ядер, вміст РНК та концентрацію VEGF ендотеліальних клітин капілярів кори та стінки судин головного мозку визнано Ронколейкін.

Таким чином, наведені вище дані свідчать про те, що рекомбінантний інтерлейкін-2 (Ронколейкін) є високоактивним препаратом з виразною ендотеліотропною дією і попереджає розвиток ендотеліальної дисфункції на моделі аллоксан-індукованого цукрового діабету, за силою фармакотерапевтичної дії перевершує препарат порівняння тіоцетам та після поглиблених фармакологічних досліджень може бути використаний як ендотеліопротективний засіб в медичній практиці з метою профілактики та лікування неврологічних ускладнень цукрового діабету.

Джерела інформації:

1. Дедов И. И., Шестакова М. В., Александров А. А. Клинические рекомендации "Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом" (8-й выпуск). Под редакцией И. И. Дедова, М. В. Шестаковой. Сахарный диабет. 2017. № 20 (IS). С. 1-112.

2. Qaseem A., Barry M. J., Humphrey L. L., Forciea M. A. Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Oral Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Practice Guideline Update From the American College of Physicians. Ann. Intern. Med. 2017. Vol. 166 (4). P. 279-290.

3. Gozhenko A. I., Kuznetsova H. S., Kuznetsova K. S., Kuznetsova O; M., Byts T. M., Zukow W. Morpho-functional basis of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. J. of Education, Health and Sport. 2017. Vol. 7 (6). P. 516-524.

4. Adeshara K. A., Diwan A. G., Tipe R. S. Diabetes and complications: cellular signaling pathways, current understanding and targeted therapies. Curr. Drug. Targets. 2016. Vol. 17. P. 1309-1328.

5. Державний формуляр лікарських засобів. К.: ЦФК ДЕЦ МОЗ України, 2013. 1344 с.

6. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с.

7. Чекман И. С, Беленичев И. Ф., Горчакова Н. А. и др. Методические рекомендации. Доклиническое изучение специфической активности эндотелиопротективных препаратов. Киев, 2014. 60 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб цитокинової ендотеліотропної нейропротекції при цукровому діабеті, який **відрізняється** тим, що вводять внутрішньом'язово рекомбінантний інтерлейкін-2 (Ронколейкін) у дозі 0,01 мг/кг один раз на добу протягом 18 днів.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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