



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122200** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
G01N 33/15 (2006.01)
A61D 7/00
A61B 5/11 (2006.01)
A61B 5/113 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2017 07292</p> <p>(22) Дата подання заявки: 11.07.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.12.2017</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2017, Бюл.№ 24</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кабачна Ірина Володимирівна (UA), Дроговоз Світлана Мефодіївна (UA), Кабачний Володимир Іванович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA), Кабачний Володимир Іванович, провулок Електроінструментальний, буд. 6, м. Харків, 61070 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ВІДБОРУ СУБСТАНЦІЙ ДЛЯ ЦІЛЕСПРЯМОВАНОГО ПОШУКУ ОРІГІНАЛЬНИХ ФАРМАКОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК АНАЛЕПТИЧНОЇ ДІЇ НА МОДЕЛІ АЛКОГОЛЬНОГО НАРКОЗУ

(57) Реферат:

Спосіб відбору субстанцій для цілеспрямованого пошуку оригінальних фармакологічно активних сполук аналептичної дії на моделі алкогольного наркозу, при якому виконують відтворення стандартизованої моделі етанолового наркозу на мишах, з подальшим введенням частині з них препарату порівняння, а іншій частині - субстанції, що досліджується. Для відтворення стандартизованої моделі алкогольного наркозу використовують внутрішньочеревинне введення 12,5 % етанолу у дозі 5,5 мг/кг, як препарат порівняння може бути застосований сульфокамфокаїн (20 мг/кг) або інший класичний аналептик, які вводяться внутрішньочеревинно в оптимальній дозі, досліджувана субстанція, як і препарат порівняння, підлягає внутрішньочеревинному введенню на піку наркозу (10-20 хвилина після прийняття тваринами бокового положення) з подальшою фіксацією тривалості наркозу та динаміки частоти дихальних рухів за хвилину, а також візуальною оцінкою психомоторного стану та фізіологічних функцій тварин після пробудження.

UA 122200 U

Корисна модель належить до фармакології, медицини, фармацевтичної промисловості та може бути використана для цілеспрямованого пошуку фармакологічно активних речовин аналептичної дії та розширення вельми необхідної, але критично обмеженої групи лікарських препаратів.

5 Аналептики - лікарські препарати, що чинять загальну стимулюючу дію на ЦНС. В терапевтичних дозах підвищують активність дихального та судинорухового центрів довгастого мозку, виявляють "пробуджуючий" ефект при наркозі [1, 2, 3]. Окрім наркозу аналептики застосовуються також при шоку, колапсі, станах, пов'язаних з асфіксією, гіпоксією і бактеріальною інтоксикацією; при передозуванні наркотичних речовин, отруєнні алкоголем, хімічними та лікарськими засобами, що пригнічують функції ЦНС [4, 5]. Їх застосування спрямоване на зняття інтоксикації і зменшення побічних ефектів, пов'язаних з ураженням ЦНС (запаморочення, головний біль, сплутаність свідомості, нудота, блювання та ін.) [4, 5].

10 Алкогольна інтоксикація та її наслідки породжують цілий ряд соціально-економічних проблем. Серед останніх лідирують дорожньо-транспортний, побутовий, виробничий і кримінальний травматизм, що знижує якість і тривають життя працездатного населення, а також деградація і виродження репродуктивного генофонду, що в найближчій перспективі формує демографічну кризу [6, 7, 8].

Летальність при отруєнні алкоголем займає четверте місце після онкологічних захворювань, патологій серцево-судинної і дихальної систем. В Європі Україна займає друге місце за рівнем смертності від алкоголізму. За даними державної служби статистики загальна кількість зареєстрованих отруєнь різними речовинами на території України в 2015 році становило 1698 випадків, при цьому велика частина з них обумовлена алкоголем, а кількість зареєстрованих пацієнтів була значно менше реальних цифр [7]. Так, у 2012 році в Україні більше 4 тис. людей померли від отруєння алкоголем, але при цьому було зареєстровано всього 2140 випадків звернень за допомогою в спеціалізовані установи [7, 8, 9]. Згідно з опублікованою статистикою [6], 20 % населення України зловживає алкоголем, серед яких 28 % складає молодь 18-29 років.

20 На сьогодні в Росії більше 4-х млн. людей знаходиться на наркологічному обліку, а в США офіційна статистика повідомляє про 9 млн. людей [8]. Крім розвитку хронічного алкоголізму, прийом спиртних напоїв може призвести до гострого отруєння, результат якого залежить від концентрації спирту в крові. Смертельна доза етанолу при одноразовому прийомі становить від 4 до 12 г на 1 кг маси тіла (в середньому 300 мл 96-% спирту при відсутності толерантності) [4, 6, 7]. Алкогольна кома розвивається при 500 мг/%, а летальний результат настає при дозі понад 2000 мг/% [9, 10]. В даний час різко зросла летальність при гострих отруєннях алкогольними (ГОА) сурогатами [7, 9, 10].

25 Класичні реанімаційні заходи при будь-яких отруєннях зводяться до швидкого зменшення концентрації отруйної речовини (ОР) в організмі. Це може реалізовуватися кількома шляхами: промиванням шлунка; активацією блювотного і дихального рефлексів; хімічною реакцією перетворення ОР в менш токсичну структуру, фізичної або хімічної адсорбції його на поверхні сорбенту; стимуляцією систем виділення (кишечнику, нирок, шкіри); метаболічної деструкції ОР за рахунок активації ферментних систем печінки або поєднанням згаданих варіантів. Однак, перераховані вище заходи вимагають для реанімації додаткового обладнання, багато часу, що в кризовій ситуації не реально.

30 В таких випадках особливу важливість набувають препарати, які спроможні захистити від хімічного ураження, швидко та ефективно відновити функціональні можливості дихального та судинорухового центрів ЦНС, тобто - аналептики.

35 За останні 50 років арсенал аналептиків не поповнювався і налічує 6 препаратів: (бемегрид, сульфокамфокаїн, нікетамід, кофеїн, етимізол, коразол) [3, 5]. Однак ризик небажаних побічних ефектів, обмежена широта терапевтичної дії, досить висока токсичність різко обмежують коло їх застосування [3, 5, 10]. У лікарській практиці України застосовуються тільки сульфокамфокаїн, кофеїн і нікетамід, але жоден з них не використовують при ГОА [5, 9].

40 В арсеналі ургентних засобів і заходів для боротьби з ГОА взагалі відсутні оригінальні універсальні нешкідливі аналептичні препарати, що дозволяють швидко (екстемпорально) і ефективно провести захист і дезінтоксикацію самого уразливого органу - головного мозку, що робить їх розробку особливо актуальною проблемою хіміків, фармакологів та клініцистів [5, 8, 9].

45 Наведені вище аспекти використання аналептиків налічують багато джерел літератури з прикладами їх ефективності на фоні алкогольної інтоксикації, але не містять узагальнених стандартних методик, спроможних кількісно (статистично-достовірно) оцінити як рівень активності, так і його механізм (саме частку аналептичної дії), що унеможлиблює їх використання в дослідницькій практиці на етапі первинного фармакологічного відбору.

Таким чином, відсутність узагальненого дослідницького стандарту моделі скринінгу аналептиків (дозо-термінових шляхів застосування досліджуваних речовин і препаратів порівняння) унеможлиблює і не дозволяє:

- 5 - кількісно (статистично-достовірно) оцінити як рівень пробуджуючого ефекту в цілому, так і його механізм (саме частку аналептичної дії); - порівняти в однакових умовах і визначити перспективність та пріоритети подальшого вивчення субстанцій;
- створити теоретичні основи цілеспрямованого пошуку аналептичних засобів;
- оптимізувати наукові досліді (суттєво прискорити і зменшити витрати).
- 10 Існуюча ситуація з наявністю аналептиків:
- обмежує можливості цілої медичної галузі - реаніматології;
- створює кризу вельми актуальної групи препаратів.

Задача корисної моделі є створення стандарту моделі фармакологічного скринінгу аналептиків (антидотів при отруєннях алкоголем).

15 Задача вирішується експериментально відпрацьованим способом відбору субстанцій для цілеспрямованого пошуку оригінальних фармакологічно активних сполук з аналептичною активністю, що включає: відтворення стандартизованої моделі етанолового наркозу на мишах; введення частині з них стандартної дози препарату порівняння (класичного аналептики), а іншій частині - досліджуваної субстанції на піку наркозу з подальшою фіксацією його тривалості та динаміки частоти дихальних рухів, візуальної оцінки психомоторного стану та фізіологічних функцій тварин в наркозі і після пробудження, за умов, що під час експерименту дотримано конкретних дозо-термінових умов введення речовин (пропонуються оптимальні дози та шляхи застосування):

- наркозного препарату (внутрішньочеревинне введення етанолу 12,5 % 5,5 мг/кг тварини);
- препаратів порівняння (внутрішньочеревинне введення сульфокамфокаїну 20 мг/кг або 25 інших класичних аналептиків в оптимальній дозі);
- введення препаратів порівняння та досліджуваних субстанцій на піку наркозу (в інтервалі 10-20 хвилин після прийняття тваринами бокового положення).

30 Запропонований спосіб (модель) фармакологічного скринінгу аналептиків здатен вирішити вищенаведені проблеми, має повну новизну (відсутність стандарту), оригінальність, економічні, екологічні та гуманістичні переваги:

- зменшує кількість та вартість дослідів; кількість, травмованих і утилізованих лабораторних тварин; витрати часу на досліді;
- збільшує інформативність експериментів (можливість якісного і кількісного статистично-достовірного порівняння аналептичного та побічних ефектів);
- 35 - може суттєво прискорити цілеспрямований пошук оригінальних ефективних аналептиків та розширити критично обмежений арсенал препаратів актуальних для використання в екстремальних умовах життєзабезпечення.

Суть корисної моделі ілюструється наступним прикладом.

40 Оцінку антинаркозного (пробуджуючого) ефекту речовин проводили на самцях білих нелінійних мишей масою 20-30 г на моделі етанолового наркозу. Препаратом порівняння був класичний комбінований аналептик сульфокамфокаїн (СКК) [5, 10, 11, 12].

45 Тварин утримували в стандартних умовах Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету (НФаУ) у відповідності з санітарно-гігієнічними нормами: $t=19-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, вологість не більше 50 %, природний світловий режим "день-ніч", у пластикових клітках на стандартному раціоні харчування з вільним доступом до води [13]. Дослідження було виконане відповідно до вимог "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України про "Доклінічні дослідження лікарських засобів" та "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985) [14].

50 Миші були розділені на 3 групи (n=6). Всім внутрішньочеревинно вводили 12,5 % етанол у дозі 5,5 мг/кг тварини [10, 11, 12]. 1-а група мишей служила контролем. Досліджувана речовина (Гетерозид-31) і препарат порівняння також вводили внутрішньочеревинно на 15-й хвилині у третій фазі наркозу (знерухомлене бічне положення з рівномірним уповільненим диханням) [14, 15]. Друга група отримувала Гетерозид-31 в дозі 1,0 мг/кг. Група 3 - сульфокамфокаїн в дозі 20 55 мг/кг [5, 10, 11, 12].

Ефективність досліджуваних речовин оцінювали за тривалістю наркозу (ТН), а їх вплив на дихальний центр визначали по частоті дихальних рухів за хвилину (ЧДР/хв) в різних фазах наркозу до та після їх введення. Контролем служили показники ТН і ЧДР/хв. першої групи.

60 ЧДР підраховували протягом 60 секунд починаючи з прийняття мишами бокового положення (ЧДР 1), ЧДР 2 - на 7-ій, ЧДР 3 - на 14-ій хвилинах наркозного сну, ЧДР 4 заміряли (на 15-ій

хвилині) моментально після введення Гетерозиду-31 або СКК. Подальший облік ЧДР проводили в період пробудження тварин: на 20-ій (ЧДР 5), 25-ій (ЧДР 6) і 30-ій (ЧДР 7) хвилинах відповідно. Останній вимір (ЧДР 8) здійснювали після прийняття положення на чотирьох лапах (повного пробудження) [14-15]. З цього моменту оцінювали психомоторний стан тварин (дезорієнтованість або цілеспрямованість руху); рівень їх постнаркозної адаптації (загальмованість, гіперактивність, цікавість до їжі та води); фізіологічні реакції (гіперсаливація, сечовиділення, дефекація) та інші. Достовірність отриманих результатів оцінювали за параметричним критерієм та Манна-Уїтні за допомогою програми Statistica 10.0 [15].

В ході проведених досліджень було підтверджено, що оптимальна глибина і тривалість етанолового наркозу досягалася при внутрішньочеревинному введенні 12,5 % етанолу у дозі 5,5 мг/кг тварини [11].

Результати наведені в таблиці 1. При цьому Гетерозид-31 виявляв виражену пробуджуючу дію. Максимальна ефективність (18,2 %) досягалася Гетерозидом-31 в дозі 1 мг/кг, в той час як оптимальна доза СКК (20 мг/кг) прискорювала пробудження тварин на 19,5 %. Таким чином, Гетерозид-31 в концентрації в 10 разів менше, ніж у СКК виявляв майже однакову активність.

Таблиця 1

Пробуджуючий ефект досліджуваних субстанцій на моделі алкогольного наркозу.

Групи	Середній час настання бокового положення	Середня тривалість наркозу		Пробуджуючий ефект, %
Етанол (n=6)	2 хв. 02 сек. 115(102;125)	103 хв. 48 сек. 6207(4208;6826)	100 %	0
Етанол + Гетерозид - 31 1,0 мг/кг (n=6)		84 хв. 55 сек. 5041(4999;5241)	81,8 %	18,2
Етанол + Сульфоксамфокаїн 20 мг/кг (n=6)		83 хв. 36 сек. 4676 (3888;5550*)	80,5 %	19,5
p	0,1641	0,4594		

Примітки:

p - рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок за допомогою дисперсного аналізу ANOVA,

* рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок досліджуваних груп з групою контролю за допомогою критерію Ньюмана-Кейлса,

n - кількість мишей в групі.

Кількісні характеристики експерименту були адекватні поведінковим реакціям тварин. Так група Гетерозиду-31 після пробудження характеризувалася доброю координацією рухів (переміщення по прямій лінії в швидкому темпі), активним вживанням води та їжі, посиленням діурезом. Миші з групи СКК, після повного пробудження переміщувалися повільніше з частими падіннями, найчастіше по периметру клітини, без особливої цікавості до води та їжі, сечовипускання було рідким. Тварини контрольної групи після етанолового наркозу тривалий час (103 хв. 48 сек.) були загальмовані і дезорієнтовані (завмирили або повільно переміщалися, падали з одного боку на інший, здійснювали кругові рухи, у них була відсутня цікавість до води та їжі), що повністю збігається з класичним симптомокомплексом алкогольної інтоксикації [8, 9, 11, 12].

Для визначення механізму пробуджуючої дії Гетерозиду-31 динаміку зміни ЧДР тварин під його дією вивчали паралельно з СКК - класичним аналептиком, який впливає на дихальний і судиноруховий центри довгастого мозку.

Порівняння результатів вимірювання ЧДР в різних фазах етанолового наркозу з ТН (табл. 2, мал. 1) показало, що після введення етанолу ЧДР 1 -ЧДР 4 достовірно ($p < 0,05$) знижується відповідно з 115, 107, 104 до 76 ДР/хв, досягаючи мінімуму в контрольній групі на 15-ій хвилині наркозу. В цей же час, після введення Гетерозиду-31 і СКК, моментально (на кінчику голки) відзначалося істотне збільшення ЧДР 4 відносно групи контролю на 57,8 % і 38 % відповідно. Потім показники ЧДР розподілялись наступним чином: ЧДР 5 - на 30,5 % і 31,5 %; ЧДР 6 - на 25 % і 26 %; ЧДР 7 - на 15,8 % і 16,8 %; ЧДР 8 - на 5,1 % і 6,8 % відповідно. Отримані результати збігаються з класичними уявленнями про механізми дії етанолу [8, 9, 11] як засобу, що пригнічує

ЦНС в цілому і ДЦ зокрема, а також класичного аналептика - СКК [5, 10], що експериментально підтверджує адекватність вибраної моделі досліджень і підкреслює об'єктивність і оптимальність вибраного часу введення досліджуваних субстанцій (в період максимальної глибини наркозу).

- 5 Звертає на себе увагу той факт, що відразу після введення Гетерозиду-31 вже протягом 1-ої хвилини ЧДР 4 достовірно ($p < 0,05$) збільшується в 2,1 рази в порівнянні з контрольною групою. При цьому максимум (133) ДР/хв в групі препарату порівняння досягається тільки через 6 хвилин (ЧДР 5), що свідчить про 6-кратну перевагу Гетерозиду-31 за швидкістю стимуляції ДЦ і дозволяє віднести останній до ряду перспективних аналептиків.
- 10 Подальша синхронна стабілізація ЧДР під впливом СКК і Гетерозиду-31 відбувалася вже на 20-й хвилині (ЧДР 5), аж до повного пробудження тварин (ЧДР 8), що може пояснюватися компенсаторними реакціями організму.

Таблиця 2

Вплив речовин, що досліджуються на частоту дихальних рухів мишей на моделі етанолового наркозу (n=6).

Група ЧДР	Контрольна патологія	Етанол + Гетерозид-31	Етанол + Сульфокамфокаїн	P
ЧДР 1		115(108;120)		0,1797
ЧДР 2		107(100;118)		0,0240
ЧДР 3		104(94;110)		0,2023
ЧДР 4	76(66;90)	120(114;124)*	105(100;108)*/**	0,0021
ЧДР 5	95(78;104)	124(122;124)	125(112;130)	0,0782
ЧДР 6	96(82; 110)	120(116;120)*	121(112;124)*	0,0150
ЧДР 7	107(106;110)	124(118;126)*	125(116;136)	0,0229
ЧДР 8	117(116;132)	123(114;138)	125(116;136)	0,7860

Примітки:

p - рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок за допомогою дисперсного аналізу ANOVA,

* - рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок досліджуваних груп з групою контролю за допомогою критерію Крускал-Уоліса,

* * - рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок з групою Гетерозиду-31 за допомогою критерію Крускал-Уоліса,

n - кількість мишей в групі.

- 15 Зміна частоти дихання мишей під впливом досліджуваних субстанцій при етаноловому наркозі приведено на графіку (креслення).

Зіставлення показників ЧДР 8 свідчить про те, що контрольна група (101 ДР/хв) навіть після повного пробудження (103 хв. 48 сек.) так і не досягла рівня результатів групи Гетерозиду-31 (123 ДР/хв), що пробудилася на 48 хв. 46 сек. і групи СКК - (125 ДР/хв) на 83 хв. 36 сек. Це підтверджує наявність вираженої інтоксикації етанолом ЦНС в цілому і ДЦ зокрема (креслення).

20 Результати проведеного експерименту підтверджують адекватність відтворення методики етанолового наркозу, що дозволяє об'єктивно оцінювати рівень пробуджуючої дії перспективних речовин і класичних аналептиків, а також кількісно оцінювати їх вплив на ЦНС і ДЦ.

Джерела інформації:

- 25 1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М., 2014. - Т. 1.
 2. Харкевич Д.А. Фармакология. - М, 2001.
 3. Дроговоз С.М. Фармакология в помощь студенту, провизору и врачу: Учебник-справочник / С.М. Дроговоз, С.Ю. Штрыголь, Е.Г. Щекина. - Х.: Титул, 2013. - 900 с.
 4. Li G, Warner M, Lang BH, Huang L, Sun LS: Epidemiology of anesthesia-related mortality in the United States, 1999-2005. *Anesthesiology* 2009; 110: 759-765.
 5. Режим доступа: http://compendium.com.ua/search_full.
 6. О-75. Основні причини високого рівня смертності в Україні / Здоров'я людини та демографія // . - К.: Версо-04 - 2010. - 60 с.
 7. Режим доступа: <http://www.ukrstat.gov.ua> / - державна служба статистики України ©
 35 Держстат України, 1998 - 2016. Дата останньої модифікації: 7/09/16.

8. Разводовский, Ю.Е. Алкоголь и фатальный травматизм / Ю.Е. Разводовский // Медицинские новости. - 2011. - № 3. - С. 51-53.

9. Василевич, Н.В. Острые отравления алкоголем и суррогатами алкоголя в клинической практике врача на стационарном этапе лечения / Н.В. Василевич, Э.Н. Платошкин, Д.В. Запольский // Проблемы здоровья и экологии. - 2012. - № 4. - С. 38-44.

10. Кишкун, А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики / А.А. Кишкун - ГЭОТАР медицина, Москва, 2009, С. 701-703.

11. Миронов, А.В. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.В. Миронов [и др.] - Москва, 2012, С. 312-317.

12. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. 149 Р. У. Хабриева. - 2-изд., перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - 832 с.

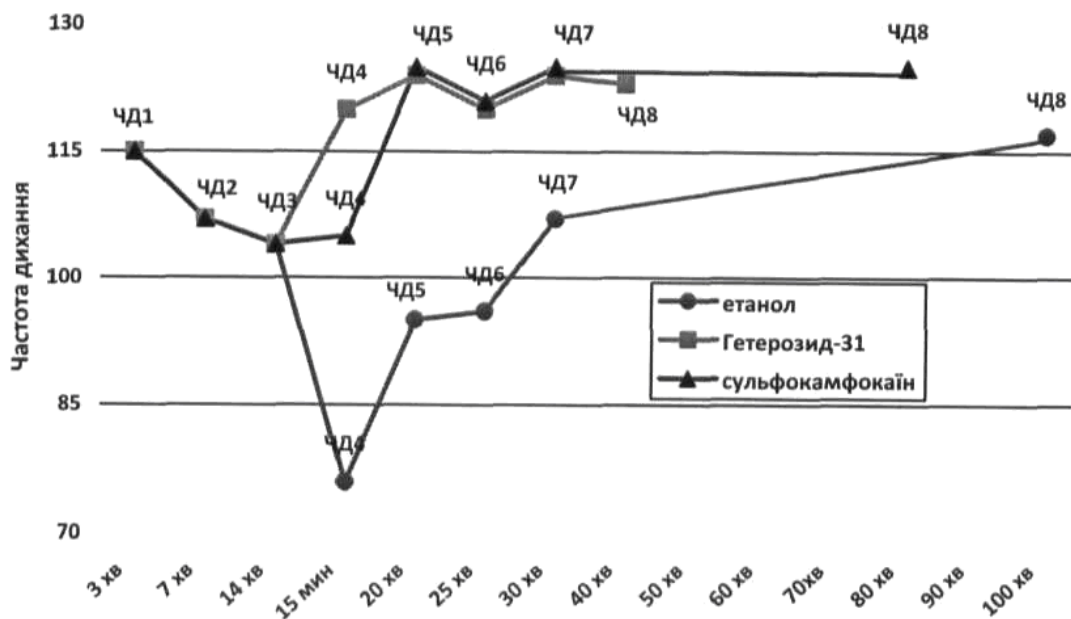
13. Deacon R.M. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments / R. M. Deacon // Nature Protocols. - 2006. - V. 1. - № 2. - P. 936-946.

14. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідах // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - 2003. - № 2 (22). - С. 108-109.

15. Прозоровский В.Б. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов / В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М.: Ремедиум, 2005. - С. 763-827.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

25 Спосіб відбору субстанцій для цілеспрямованого пошуку оригінальних фармакологічно активних сполук аналептичної дії на моделі алкогольного наркозу, при якому виконують відтворення стандартизованої моделі етанолового наркозу на мишах, з подальшим введенням частині з них препарату порівняння, а іншій частині - субстанції, що досліджується, який **відрізняється** тим, що для відтворення стандартизованої моделі алкогольного наркозу використовують внутрішньочеревинне введення 12,5 % етанолу у дозі 5,5 мг/кг, як препарат порівняння може бути застосований сульфокамфокаїн (20 мг/кг) або інший класичний аналептик, які вводяться внутрішньочеревинно в оптимальній дозі, досліджувана субстанція, як і препарат порівняння, підлягає внутрішньочеревинному введенню на піку наркозу (10-20 хвилини після прийняття тваринами бокового положення) з подальшою фіксацією тривалості наркозу та динаміки частоти дихальних рухів за хвилину, а також візуальною оцінкою психомоторного стану та фізіологічних функцій тварин після пробудження.



Комп'ютерна верстка В. Мацело

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