



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108412** (13) **U**

(51) МПК (2016.01)

G09B 23/28 (2006.01)

A61K 31/00

A61P 29/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 01336**

(22) Дата подання заявки: **15.02.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.07.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.07.2016, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Ільків Ірина Ігорівна (UA),
Лесик Роман Богданович (UA),
Склярів Олександр Якович (UA)**

(73) Власник(и):

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА
ГАЛИЦЬКОГО,
вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)**

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ УЛЬЦЕРОГЕННОЇ ДІЇ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ У ЩУРІВ

(57) Реферат:

Спосіб зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів включає використання протизапальної сполуки, яка сприяє вивільненню H_2S . Експериментальним тваринам вводять похідне 4-тіазолідинону - сполуку Les-5054 [5-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідрокси-бензиліден)-2-тіоксо-тіазолідин-4-он] у дозі 10 мг/кг перорально, щоденно протягом 3 днів на фоні деструктивних уражень, викликаних введенням індометацину в дозі 35 мг/кг підшкірно упродовж 72 годин.

UA 108412 U

Корисна модель належить до медицини та біохімії і може використовуватись для корекції терапії запальних захворювань.

Різноманітні екзогенні (використання нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), дія стресу, ксенобіотиків) та ендогенні чинники можуть призводити до виникнення запальних процесів, які супроводжуються розвитком деструктивних ушкоджень у слизовій оболонці травного каналу.

НПЗП є найбільш широко використовуваною групою лікарських засобів, які застосовуються при різних патологічних станах (болях різного походження, запальних захворюваннях рухового апарату, ревматичних хворобах, гарячці тощо). Однак застосування НПЗП викликає побічну дію та небажані ефекти, серед яких значне місце займає розвиток ульцерогенних ушкоджень та кровотечі у слизових оболонках шлунка та тонкої кишки, а також гепато- та кардіотоксичний вплив.

Механізм дії усіх НПЗП полягає в інгібуванні ензиму циклооксигенази, відповідальної за синтез простагландинів (ПГ). Саме з інгібуванням синтезу останніх пов'язують підвищену гастро- та ентеротоксичність НПЗП, адже ПГ у фізіологічних концентраціях мають цитопротективну дію. НПЗП реалізують свою дію, взаємодіючи із двома ізоформами циклооксигенази (ЦОГ): ЦОГ-1 - ензим, що конститутивно експресується у більшості тканин, та ЦОГ-2, експресія якого значно зростає за умов запалення. Більшість існуючих НПЗП (аспірин, диклофенак, напроксен, тощо) неселективно блокують синтез обох ізоформ ензиму, внаслідок чого фізіологічні ефекти ПГ, що продукуються ЦОГ-1, нівелюються і, як наслідок, розвивається виразка шлунка та ушкоджується слизовий бар'єр кишки. Враховуючи те, що у синтезі прозапальних ПГ залучена здебільшого ЦОГ-2, а також з метою зниження гастро- та ентеротоксичності було створено нові НПЗП - коксиби, що з високою селективністю інгібують ЦОГ-2. Проте невдовзі було показано, що при застосуванні окремих представників цього класу ліків значно зростає ризик ускладнень зі сторони серцево-судинної системи. Окрім цього, дослідженнями останніх років було показано, що ЦОГ-2 також конститутивно експресується у багатьох тканинах, у тому числі в слизовій оболонці тонкої кишки (СОТнК), тож, імовірно, ПГ, які синтезуються ЦОГ-2, мають певні фізіологічні ефекти за умов норми, а відтак, інгібування активності ЦОГ-2 може мати негативні наслідки і для травної системи.

Дія стресу зумовлює розвиток виразкових ушкоджень слизової оболонки органів травної системи, викликаючи зміни мікрогемодинаміки, моторики, секреції, вісцеральної чутливості, проникності мембран клітин тощо. Домінуючим фактором у механізмі впливу стресу є дія катехоламінів, які зумовлюють вазоконстрикцію, і, як наслідок, виникнення гіпоксії, зростання рівня нітрато-оксидативних процесів. За умов стресу підвищується синтез рівня прозапальних цитокінів та продукція простагландину-Е₂ ЦОГ-2, що призводить до підвищення процесів ліпопероксидації, продукції активних радикалів нітрогену оксиду, порушення цілісності мембран клітин та кровоносних судин, інфільтрації слизової оболонки нейтрофілами та виникнення деструктивних змін у слизовій оболонці.

У регуляції процесів цитопротекції значну роль відіграють газові медіатори, до яких належать нітроген (II) оксид (NO), оксид вуглецю (CO) і гідроген сульфід (H₂S). NO регулює процеси секреції, моторику, всмоктування, кровоплин, бере участь у підтриманні структури та функції слизового бар'єру, процесах міжклітинної інтеграції, передачі інформації в ентєральній нервовій системі. За умов розвитку ентеропатій, зокрема зумовлених дією НПЗП чи стресових чинників, відзначається різке зростання експресії індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) та, як наслідок, підвищення продукції NO, який перетворюється на високотоксичні радикали, зокрема на пероксинітрит. H₂S бере активну участь у механізмах захисту СОТнК при дії чинників агресії, діючи як вазодилатор, нейромодулятор. Окрім цього, H₂S виявляє антиоксидантну, антиапоптичну та протизапальну дії. Доведено, що введення НПЗП, як неселективних, так і інгібіторів ЦОГ-2, у переважній більшості випадків супроводжується інгібуванням цистатіонін β-синтази та цистатіонін γ-ліази і, відповідно, синтезу H₂S. Таким чином, цитопротективні ефекти останнього суттєво знижуються, що може бути однією з причин розвитку ентеропатій при вживанні НПЗП.

Найближчим аналогом запропонованого способу вибрано спосіб зниження ульцерогенної дії НПЗП шляхом підвищення цитопротективної активності НПЗП з використанням на тлі стресу ковалентно модифікованого НПЗП - H₈-зв'язаного напроксену [Fomenko I. Effects of conventional and hydrogen sulfide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rats with stress-induced epinephrine-induced gastric damage / I. Fomenko, A. Sklyarov, T. Bondarchuk, [et al.] // Stress. - 2014.- Vol. 17, № 6. - P. 528-537]. Останній, за рахунок вивільнення "газового медіатора" H₂S, знижував інтенсивність процесів ліпопероксидації при стресових моделях виразки шлунка

у щурів. Недоліком цього способу є недостатня цитопротективна активність та не визначений його вплив на систему L-аргінін/NOS/NO у слизовій оболонці тонкої кишки.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів шляхом застосування протизапальної сполуки, яка сприяє вивільненню H_2S на тлі індометацин індукованих уражень слизової оболонки тонкої кишки щурів

Поставлена задача вирішується тим, що у способі зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів, що включає використання протизапальної сполуки, яка сприяє вивільненню tbS , згідно з корисною моделлю, експериментальним тваринам вводять похідне 4-тіазолідинону - сполуку Les-5054 [5-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідрокси-бензиліден)-2-тіоксо-тіазолідин-4-он] у дозі 10 мг/кг перорально, щоденно протягом 3 днів на фоні деструктивних уражень, викликаних введенням індометацину в дозі 35 мг/кг підшкірно упродовж 72 годин.

Похідні 4-тіазолідинону коригують вміст H_2S , тому використання цих сполук може мати низку переваг, серед яких - зниження цитотоксичності, протизапальна та антиоксидантна дії. Індометацин - неселективний блокатор ЦОГ-1/ЦОГ-2, який широко використовується у експериментальній гастроентерології для моделювання ульцерогенних ушкоджень слизової оболонки шлунка та тонкої кишки.

Пропонований спосіб здійснюють таким чином. Експериментальним тваринам (щурам), з дотриманням міжнародних вимог щодо проведення дослідів, вводять неселективний ЦОГ інгібітор - індометацин та похідне 4-тіазолідинону - сполуку Les-5054 [5-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідрокси-бензиліден)-2-тіоксо-тіазолідин-4-он] в дозі 10 мг/кг перорально щоденно протягом 3 днів на фоні індометацин-індукованих уражень у дозі 35 мг/кг підшкірно упродовж 72 годин.

Експериментальні дослідження були проведені на 3 групах тварин (нелінійних щурів, по 8 особин в кожній групі): перша група - контрольні тварини, тваринам другої і третьої груп моделювали деструктивні ураження слизової оболонки тонкої кишки шляхом введення індометацину у дозі 35 мг/кг підшкірно упродовж 72 годин [Ярушкіна Н.И., Багаева Т.Р., Филаретова Л.П. Соматическая болевая чувствительность крыс в условиях повреждающего действия индометацина на желудочно-кишечный тракт // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2014. - № 100. - С. 73-85]. Тваринам 3-ої групи вводили сполуку Les-5054 в дозі 10 мг/кг перорально, щоденно протягом 3 днів на тлі попередньо введенного індометацину.

Через 72 год. після введення індометацину тварин декапітували під тіопенталовим наркозом, розкривали черевну порожнину, розрізали тонку кишку, промивали її фізіологічним розчином і проводили макроскопічну оцінку ступеня ушкодження.

Для оцінки стану NO-синтазної (NOS) системи в гомогенатах СОТнК визначали активність NO-синтаз [Раваева М.Ю., Чуян Е.Н. Изменения активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения. Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия". - 2011. - Т. 24(63). - № 4. - С. 201-210], аргінази [Geyer J.W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates // Anal. Biochem. - 1971. - Vol. 39, № 2. - 412-417], у плазмі крові - L-аргініну [Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биохимии. - М.: Высшая школа, 1988. - 239 с]. Процеси ліпопероксидації аналізували за вмістом продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) [Тимурбулатов М.А., Селезнев Е.И. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лабораторное дело. - 1981. - № 4. - С. 209-211]. Концентрацію tbS визначали за реакцією з N, N-диметил-пара-фенілєндіаміном за присутності $FeCl_3$ [Ольховський О.С., Заїчко Н.В. Вплив пропаргілгліцину та натрію гідрогенсульфіду на вміст H_2S і показники про-антиоксидантної системи в міокарді щурів різного віку // Мед. хімія. - 2013. - № 4. - С. 10-15].

У контрольній групі активність загальної NOS становила $815,5 \pm 49,8$ нмоль/ хв·г, активність iNOS- $66,16 \pm 24,9$ нмоль/хв·г, активність ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) - $728,63 \pm 66,11$ нмоль/ хв·г, активність аргінази - $0,21 \pm 0,034$ мкмоль/ хв·г, а концентрація L-аргініну в плазмі крові - $40,7$ мкмоль/мл. (Табл. 1) (Табл. 2)

За умов дії індометацину упродовж 72 годин у тварин розвивалися структурно-геморагічні ураження (СГУ) у дистальному відділі тонкої кишки. Середня площа СГУ поверхні СОТнК становила $74 \pm 5,9$ мм². Зміни системи L-аргінін/NO-синтаза/NO за умов індометацин-індукованих уражень характеризувались наступним: активність iNOS зростала у 3 рази ($P < 0,01$), активність eNOS знижувалась у 2 рази ($P < 0,01$), порівняно з показниками контролю (Табл. 1). Концентрація L-аргініну в плазмі крові знижувалася на 33 %, при цьому активність аргінази знижувалась у 4 рази ($P < 0,01$). Водночас рівень ТБК-активних продуктів зріс на 56 % ($P < 0,01$), вказуючи на активування процесів ліпопероксидації. Внаслідок інгібування продукції

ейкозаноїдів під дією індометацину відзначалося зниження вмісту H_2S у плазмі крові на 10 % ($P < 0,05$).

За умов введення сполуки Les-5054 на фоні індометацин індукованих уражень площа СГУ була суттєво нижчою (на 63 %), порівняно з показниками при самостійній дії індометацину. Вплив сполуки Les-5054 призводив до зменшення концентрації ТБК-активних продуктів на 31 % ($P < 0,01$). При дії Les-5054 знижувалась активність iNOS на 35 % ($P < 0,01$), підвищувалась активність eNOS на 52 % ($P < 0,01$), активність аргінази зростала втричі ($P < 0,05$), порівняно з показниками тварин з індометацин-індукованими ураженнями. Вміст H_2S у плазмі крові збільшився на 24 % ($P < 0,05$), порівняно з показниками другої групи.

Таблиця 1

Зміни активності NO-синтаз, аргінази та ТБК-активних продуктів у СОТнК за умов впливу похідних 4-тіазолідинону та індометацин-індукованих уражень

Показники	Групи тварин		
	Інтактні тварин	Індометацин	Індометацин + Les-5054
ТБК-активні продукти (мкмоль/г)	186,6±8,1	291,4±26,7**	199,1±11,1 ^{##}
Нітрит аніон $\mu\text{mol/g}$	1,2±0,1	2,8±0,2**	1,8±0,2
NOS (нмоль/хв · г)	815,5±49,8	595,5±73,1	637,9±42,8
iNOS (нмоль/хв · г)	66,1±24,9	203,6±26,8**	132,9±27,5 ^{##}
eNOS (нмоль/хв · г)	728,6±66,1	331,9±62,5**	506,3±45,3 ^{##}
Аргіназа (мкмоль/хв · г)	0,2±0,03	0,05±0,02**	0,15±0,04 [#]

Примітка: $P < 0,05$ (*), $0,01$ (**) - порівняно з контролем, $P < 0,05$ ([#]), $0,01$ (^{##}) - порівняно з індометацин-індукованими ураженнями.

Таблиця 2

Вміст L-аргініну та FbS у плазмі крові

Показники	Групи тварин		
	Інтактні тварини	Індометацин	Індометацин + Les-5054
L-Аргінін (мкмоль/мл)	46,7±3,6	31,2±2,8	42,6±4,1 ^{##}
H_2S (мкмоль/г)	88,4±2,7	79,5±1,0*	98,5±2,6 [#]

Примітка: $P < 0,05$ (*), $0,01$ (**) - порівняно з контролем, $P < 0,05$ ([#]), $0,01$ (^{##}) порівняно з індометацин-індукованими ураженнями.

Введення похідного 4-тіазолідинону за умов індометацин-індукованих уражень призводить до зменшення площі деструктивних ушкоджень СОТнК, зниження активності iNOS, інтенсивності перекисного окислення ліпідів та підвищення вмісту H_2S , що пов'язано із зростанням рівня H_2S у крові та його цитопротекторними ефектами, а також зі структурою похідного 4-тіазолідинону, який також володіє антиоксидантними властивостями. Таким чином, сполука Les-5054 сприяє зниженню нітрово-оксидативних процесів, викликаних застосуванням НПЗЗ у СОТнК.

Запропонований спосіб може бути використаний для зниження ульцерогенної дії НПЗП та може бути рекомендований до подальших клінічних випробувань при лікуванні запальних захворювань органів травлення.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів, що включає використання протизапальної сполуки, яка сприяє вивільненню H_2S , який **відрізняється** тим, що експериментальним тваринам вводять похідне 4-тіазолідинону - сполуку Les-5054 [5-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідрокси-бензиліден)-2-тіоксо-тіазолідин-4-он] у дозі 10 мг/кг перорально, щоденно протягом 3 днів на фоні деструктивних уражень, викликаних введенням індометацину в дозі 35 мг/кг підшкірно упродовж 72 годин.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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