



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112513** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)

A61K 9/00

A61K 31/00

A61K 31/405 (2006.01)

A61K 31/41 (2006.01)

A61P 25/00

A61P 25/28 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2016 04961</p> <p>(22) Дата подання заявки: 04.05.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.09.2016</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 24.06.2016, Бюл.№ 12</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.09.2016, Бюл.№ 17</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кучеренко Людмила Іванівна (UA), Борсук Сергій Олександрович (UA), Бєленічев Ігор Федорович (UA), Мазур Іван Антонович (UA), Стеблюк Віктор Сергійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАУКОВО- ВИРОБНИЧЕ ОБ'ЄДНАННЯ "ФАРМАТРОН", вул. Червоної Кінноти, 23, м. Запоріжжя, 69096 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 92872 C2, 10.12.2010 RU 2248203 C2, 20.03.2006 RU 2430728 C1, 10.10.2011 RU 2268711C2, 27.01.2006 Создание антиангинальных и аритмических средств на основе фиксированных комбинаций с антиоксидантами / Беленичев И. Ф. и др. // Газета «Новости медицины и фармации». – 2008. – 16 (255). – С. 1 - 6. Фармакологические эффекты тиотриазолина в гепатологической клинике / Цыркунов В. М. и др. // Рецепт. – 2008. - № 1 (57). – С. 69 – 74. Про- та антиоксидантна системи і патологічні процеси в організмі людини / Резніков О. Г. та ін. // Вісн. НАН України. – 2014. - № 10. – С. 17 – 25. К вопросу создания препаратов нейтропротекторного действия / Мазур І. та ін. // Вісник фармакології та фармації. – 2006. - № 4. – С. 28 – 31. Експериментальне дослідження ноотропної активності таблеток «Ноотрил» / Беленічев І. Ф. та ін. // Експериментальна фізіологія та біохімія. – 2002. - № 1 (17). – С. 6 – 11.</p>
---	--

(54) КОМБІНОВАНИЙ ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ АНКСІОЛІТИЧНОЇ, СТРЕС-ПРОТЕКТИВНОЇ, НООТРОПНОЇ І АНТИОКСИДАНТНОЇ ДІЇ

(57) Реферат:

UA 112513 C2

Винахід стосується комбінованого лікарського засобу анкіолітичної, стрес-протективної, ноотропної та антиоксидантної дії і містить триптофан і тіотриазолін.

Винахід стосується фармації і медицини, і може бути використаним у фармацевтичній промисловості при виготовленні медикаментозних засобів із комбінованим складом активних компонентів, які застосовуються для лікування і профілактики захворювань центральної нервової системи, що супроводжуються такими станами організму, як тривога, занепокоєння, страх, емоційне напруження, в основі яких лежить стрес. Також дія пропонованого засобу буде спрямована на усунення психосоматичних розладів при неврозах, неврозоподібних станах, абстиненції, алкоголізмі, наркоманії.

Зменшення тривалості, а також погіршення якості життя прямо пов'язане зі збільшенням кількості хворих із захворюваннями ЦНС, в етіогенезі яких лежить стрес [10]. У зв'язку з цим, розробка засобів для фармакологічної корекції емоційного стресу є однією з актуальних задач сучасної медицини. Відомо [1,2,10,11], що однією з ланок патогенезу емоційного стресу є гіперпродукція активних форм кисню (АФК) біоенергетичними і нейрохімічними системами головного мозку. Надлишок АФК в умовах антиоксидантної недостатності призводить до окислювальної модифікації ліпідів, нуклеїнових кислот і білків. Окислювальна модифікація білкових фрагментів рецепторів, іонних каналів, синаптичних структур нейрону призводить до порушення генерації, утворення, провідності нервового імпульсу, порушує синаптичну передачу і, як наслідок, призводить до погіршення когнітивно-мнестичних функцій головного мозку [1,2,13]. Відомо також, що під дією АФК в клітині відбувається активація експресії редокс-чутливих генів, одні з яких необхідні для захисту клітин від токсичних ефектів окисного стресу, а інші, при надлишку АФК, ініціюють апоптоз [1,15]. У зв'язку з вищевикладеним, перспективним напрямком фармакокорекції стресу і його наслідків є застосування антиоксидантів, ноотропів, анксиолітиків [2,3]. Широке застосування в клінічній практиці в якості стреспротекторів і анксиолітиків знайшли структурні аналоги нейротрансмітерів - Ноофен, гліцин, ГАМК, триптофан [2].

Останнім часом також простежується тенденція створення комбінованих лікарських засобів з ноотропною дією, здатних відновлювати порушені мнестичні і розумові функції, знижувати неврологічні дефіцити, а також захищати мозок і підвищувати резистентність організму до екстремальних впливів.

Однак сучасний арсенал анксиолітичних, ноотропних, стрес-протекторних, антиоксидантних засобів не завжди відповідає всім вимогам клініцистів. Найчастіше такі препарати призначаються у вигляді окремих лікарських форм, що призводить до поліпрагмазії, знижує комплаєнс пацієнтів. Іноді препарати бувають недостатньо ефективними. Все це обумовлює необхідність створення нових комбінованих високоефективних і малотоксичних препаратів, які б поєднували в собі позитивні ефекти активних діючих речовин або ж навіть посилювали б їх терапевтичний ефект.

Відомий комбінований препарат Тіоцетам, який в своєму складі містить тіотриазолін і пірацетам (0,05 г тіотриазоліну і 0,2 г пірацетаму). Препарат має виражену антиоксидантну, протиішемічну, ноотропну і церебропротективну дію [2,6,8,9]. Однак Тіоцетам не володіє анксиолітичними властивостями і у нього недостатньо виражена стрес-протекторна активність.

Відомий також засіб Ноофен (активна речовина - фенібут, (γ-аміно-β-фенілмасляна кислота) для перорального застосування (Компендиум - лекарственные препараты online <http://compendium.com.ua/info/262/olajfarm/noofen-sup-sup-500-mg-i-poroshok-i->), який має антигіпоксичну, антиамнестичну і анксиолітичну (транквілізуючу) дію. Ноофен стимулює процеси навчання, покращує пам'ять, підвищує фізичну і розумову діяльність. Також Ноофен має транквілізуючі особливості: усуває психоемоційне напруження, тривожність, страх, емоційну лабільність, дратівливість, покращує сон; подовжує та посилює дію снодійних, наркотичних, нейролептичних і протисудомних засобів. Під впливом Ноофену поліпшуються показники вищої нервової діяльності (увага, пам'ять, швидкість і точність сенсорно-моторних реакцій). Препарат подовжує латентний період і скорочує тривалість і вираженість ністагму, володіє протиепілептичним ефектом. Не впливає на холіно- і адренорецептори. Ноофен помітно зменшує прояви астенії та вазовегетативні симптоми, в тому числі головний біль, відчуття тяжкості в голові. У хворих з астеною і в емоційно лабільних осіб вже з перших днів терапії препаратом поліпшується самопочуття, підвищується інтерес та ініціативність, мотивація до активної діяльності без седативного ефекту чи збудження. Встановлено, що при прийомі Ноофену при черепно-мозковій травмі збільшується кількість мітохондрій в клітинах перифокальних тканин і поліпшуються біоенергетичні процеси в мозку. При наявності порушень діяльності серця і шлунка Ноофен нормалізує процеси пероксидації ліпідів.

Однак спектр ноотропної дії Ноофену досить вузький - препарат проявляє тільки антиамнестичну дію (впливаючи на короткочасну пам'ять), не впливаючи на довготривалу пам'ять, на рівень суджень, кортикальний контроль (<http://gomelpsyhosp.by/?p=1080>). Ноофен

проявляє ряд побічних ефектів, що обмежує його застосування в клінічній практиці, особливо педіатричній і геронтологічній. Препарат може викликати залежність, має синдром відміни (<http://otravleniya.net/ximicheskie-otravleniya/fenibut-privykanie.html>). Є дані, що Ноофен при тривалому застосуванні може негативно впливати на печінку.

Відомий засіб Триптофан (<http://www.likar.info/lekarstva/Triptofan/>) який є попередником нейротрансмітера серотоніну. Триптофан сприяє підвищенню настрою, усуненню тривожності, гіперактивності, нав'язливих станів і синдрому хронічної втоми, усуває відчуття страху і напруги, сприяє гарному засипанню і нормальному сну.

Однак триптофан не має вираженого самостійного ноотропного, стреспротективного і антиоксидантного ефекту.

Безперечний інтерес представляє пошук можливостей посилення протекторних властивостей триптофану за рахунок комбінування з речовинами, здатними покращувати енергозабезпечення головного мозку, проявляти антиоксидантну дію і гальмувати оксидативний стрес і тим самим відновлювати чутливість рецепторів нейрона. До таких речовин відносять тіотриазолін. Тіотриазолін здатний підсилити анксиолітичну дію триптофану, регулюючи Red/Oxi-залежні механізми підвищення афінності до серотонінових рецепторів. Триптофан, в свою чергу, може підсилити антиоксидантну дію тіотриазоліну. Так, триптофан, за допомогою перетворення в організмі в мелатонін, зможе утворити з тіотриазоліном своєрідний тандем з утилізації таких зловісних кисневих радикалів, як гідроксил-радикал і пероксинітрит. Триптофан сумісно з тіотриазоліном здатні впливати на механізми пам'яті, як короткочасної - за рахунок пригамовування амнезії, викликаной надлишком вільних радикалів, так і довготривалої - за рахунок сумісного впливу на АТФ-залежні механізми синтезу білків пам'яті.

Подібну сумісну дію триптофану і тіотриазоліну, спрямовану на регуляцію Red/Oxi-залежних механізмів афінності серотонінових рецепторів, відновлення функції цієї системи (зниження тривоги, страху, порушення сну, занепокоєння), а також на посилення антиоксидантної і енерготропної дії (процеси пам'яті), можна використовувати в профілактиці і лікуванні захворювань, важливою ланкою патогенезу яких є стрес, а це - захворювання центральної нервової і серцево-судинної системи.

В основу винаходу поставлено задачу розробки комбінованого лікарського засобу, який буде мати більш високу анксиолітичну і антиоксидантну активність у порівнянні з відомими засобами, і додатково буде надавати ноотропний і стрес-протективний ефект.

Поставлена задача вирішується тим, що в комбінованому лікарському засобі анксиолітичної, стрес-протективної, ноотропної і антиоксидантної дії, що містить триптофан, новим є те, що він додатково містить тіотриазолін.

Новим також є те, що комбінований лікарський засіб анксиолітичної, стрес-протективної, ноотропної і антиоксидантної дії містить триптофан і тіотриазолін в наступному співвідношенні: триптофан - в межах від 1 до 7 масових часток, тіотриазолін - 1 масова частка.

Новим також є те, що комбінований лікарський засіб анксиолітичної, стрес-протективної, ноотропної і антиоксидантної дії має форму таблеток, капсул, ін'єкційних та інфузійних розчинів.

Виходячи з вивчених нами механізмів дії обох компонентів пропонованого комбінованого засобу, що містить триптофан і тіотриазолін, і припустивши можливість того, що пропонований комбінований засіб може мати більш ефективну анксиолітичну і антиоксидантну дію і додатковий ноотропний, стрес-протективний ефект, нами було проведено експериментальне дослідження в цьому напрямку.

При проведенні нами експериментальних досліджень, які підтвердили наше припущення, нами було виявлена додаткова неочевидна властивість комбінації триптофану з тіотриазоліном - її ноотропна і стрес-протективна дія, а також підсилення анксиолітичного і антиоксидантного ефекту.

Нами були вивчені різні комбінації триптофану з тіотриазоліном - 1:1; 2:1; 4:1; 5:1; 7:1 відповідно, в умовах тесту "підвішування за хвіст". Була виявлена оптимальна комбінація триптофану з тіотриазоліном - 4:1 відповідно. Нижче в таблиці 1 ми наводимо дані, які це підтверджують.

Анксиолітичну дію комбінованого засобу у різних співвідношеннях активних компонентів вивчали на 50 білих нелінійних щурах обох статей масою 170-230 г. Бліц-тестом, застосування якого можливе для визначення рівня тривожності і з'ясування анксиофілії препаратів, є підвішування тварин за хвіст. Метод заснований на спостереженні, що тварини, при їх підвішуванні за хвіст, демонструватимуть відповідний період іммобільності, за тривалістю якого можна судити про рівень тривожності, страху і відчаю. Комбінації тіотриазоліну з триптофаном вводили в дозі 250 мг/кг внутрішньошлунково у вигляді водного розчину за допомогою металевго зонду за 60 хвилин до тестування. Після введення комбінацій, що вивчалися,

тварин витягували з клітки і притримували за хвіст біля тулуба у висячому положенні головою вниз. Реєструвався час, протягом якого тварина буде залишатися іммобільною (тобто до того моменту, поки морда тварини не досягне основи хвоста) [10,14].

Таблиця 1

Вплив різних комбінацій тіотриазоліну і триптофану на тривалість іммобільності тварин в бліц-тесті «підвішування за хвіст»

<i>Групи (N=10)</i>	<i>Час, сек</i>
Контроль	11,7±0,2
комбінований препарат тіотриазолін +триптофан (1:1), 250 мг/кг	14,8±0,3* +26,5%
комбінований препарат тіотриазолін +триптофан (1:2), 250 мг/кг	15,5±0,3* +32,8%
комбінований препарат тіотриазолін +триптофан (1:4), 250 мг/кг	17,5±0,2* +49,5%
комбінований препарат тіотриазолін +триптофан (1:5), 250 мг/кг	16,7±0,2* +42,7%
комбінований препарат тіотриазолін +триптофан (1:7), 250 мг/кг	15,1±0,2* +29,0%

Примітка * - $p < 0,05$ – відносно контролю

- 5 Найбільш активною виявилася комбінація триптофану і тіотриазоліну в співвідношенні 4:1 відповідно, але при цьому комбінації із співвідношенням 1:1; 2:1; 5:1; і 7:1 також є терапевтично ефективними.

- 10 Як відомо (Кукес В.Г. Клиническая фармакология, 4 издание, Москва, "ГЕОТАР-медиа", 2008, с. 164-169; Гилман А.Г. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману, Москва, "Практика", 2006, с. 57), фармакодинамічна взаємодія лікарських засобів може бути спрямована як у бік посилення їх фармакологічних ефектів, так і на їх ослаблення. Тому, хоча тіотриазолін і триптофан надають кожен окремо широкий спектр позитивних фармакологічних ефектів, для спеціаліста не є очевидною можливість використовувати тіотриазолін або триптофан в поєднанні з будь-якими іншими лікарськими засобами.

- 15 Також лікарські засоби можуть мати фізичну несумісність. Вона обумовлена фізичними властивостями інгредієнтів, які входять до складу ліків, і може викликатися нерозчинністю, відволюванням інгредієнтів, іншими процесами.

- 20 Компоненти можливого комбінованого лікарського засобу можуть бути також хімічно несумісними, що обумовлено їх хімічною взаємодією. Це призводить, як правило, до зниження або повної втрати терапевтичної активності лікарського засобу.

- 25 Лікарські речовини можуть діяти антагоністично або взаємно посилювати побічну або токсичну дію один одного, і, таким чином, мати фармакологічну несумісність. Фармакологічна несумісність лікарських речовин у багатьох випадках унеможливорює їх одночасне застосування. Несумісні поєднання компонентів роблять фіксовану лікарську комбінацію неповноцінною в терапевтичному відношенні, а в деяких випадках навіть небезпечною для життя пацієнта.

Також не є очевидним те, що, якщо призначати в схемі лікування лікарські засоби з різними діючими речовинами в різних лікарських формах, і призначити засіб, який містить ці ж діючі речовини, скомбіновані в одній лікарській формі, то ефект буде однаковим.

- 30 Таким чином, можливість створення певного комбінованого лікарського засобу може підтвердити або спростувати лише експериментальне дослідження. У нашому випадку - це поєднання триптофану з тіотриазоліном.

- 35 Говорити про позитивний результат взаємодії згаданих компонентів комбінованого лікарського засобу можна тільки на підставі проведених експериментальних досліджень. Без вивчення результатів таких досліджень думка про можливий високий терапевтичний ефект комбінованого засобу є лише теоретичною передумовою.

В нашій заявці наведені результати наших оригінальних досліджень запропонованої комбінації, які підтверджують високу анксиолітичну, стрес-протекторну, ноотропну та антиоксидантну активність комбінованого препарату, що містить в своєму складі тіотриазолін і триптофан.

- 40 Приклад 1. Антитривожна (анксиолітична) дія

Анксиолітичну дію препаратів і їх комбінацій вивчали на 50 білих нелінійних щурах обох статей масою 170-230 г. Використовувався бліц-тест для визначення рівня тривожності і з'ясування анксиофілії препаратів (підвішування тварин за хвіст). Комбінований засіб тіотриазоліну з триптофаном (1:4) вводили в дозі 250 мг/кг, таблетки Ноофен - у дозі 250 мг/кг, в цій серії досліджень також вивчали як референс-препарат триптофан, який вводили в дозі 250 мг/кг. Після введення препаратів (за 60 хвилин до тестування) тварин витягували з клітки і притримували за хвіст біля тулуба у висячому положенні головою вниз. Реєструвався час, протягом якого тварина буде залишатися іммобільною (тобто до того моменту, поки морда тварини не досягне основи хвоста) [10,14].

В результаті проведених досліджень було встановлено, що при введенні комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) тварини довше перебували при проведенні експерименту в іммобільному стані на 48,7 % ($p < 0,05$), що можна розцінювати як зниження тривожності і страху (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив досліджуваного комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) на тривалість іммобільності тварин в бліц-тесті «підвішування за хвіст»

<i>Групи (N=10)</i>	<i>Час, сек</i>
Контроль	12,1±0,2
комбінований препарат тіотриазолін + триптофан (1:4), 250 мг/кг	18,0±0,2 +48,7%
Ноофен, 250 мг/кг	16,4±0,3* +35,5%
триптофан, 250 мг/кг	15,8±0,2* +30,5%

Примітка * - $p < 0,05$ – відносно контролю;
+ - $p < 0,05$ – відносно Ноофену

Менш виражені зміни тривалості періоду іммобільності відзначалися при введенні Ноофену і триптофану. Так, введення Ноофену призводило до збільшення часу іммобільності на 35,5 % в порівнянні з контролем ($p < 0,05$). Введення триптофану призводило до збільшення часу іммобільності на 30,5 % в порівнянні з контролем ($p < 0,05$). Таким чином, досліджуваний препарат - комбінований засіб тіотриазоліну і триптофану (1:4) знижує рівень тривожності, страху і відчаю значніше, ніж препарати порівняння - анксиолітик і ноотроп Ноофен і анксиолітик триптофан.

Приклад 2. Вивчення стрес-протективної, ноотропної, анксиолітичної і антиоксидантної дії

Експерименти були проведені на 40 щурах-самцях масою 210-230 г у віці 6 місяців. Хронічний іммобілізаційний стрес (ХІС) моделювали жорстокою двогодинною іммобілізацією на спині протягом 10 днів [3,10,12]. Комбінований засіб тіотриазоліну і триптофану (1:4) (НВО "Фарматрон", Україна), еталонний препарат ноотропної, стрес-протективної анксиолітичної дії - Ноофен ("Олайнфарм", Латвія), а також комбінований препарат, що містить еквівалентну кількість тіотриазоліну - Тіоцетам, вводили в дозі 250 мг/кг перорально за допомогою металевого зонда на 0,5 мл води протягом 10 днів, раз на добу за 30 хвилин до іммобілізації. На першу добу експерименту, за 30 хвилин до стресування у тварин виробляли умовну реакцію пасивного уникнення (УРПУ) в двочовниковій камері. Через 10 діб, через 2 години після останнього стресування, у щурів проводили тест "відкрите поле". Протягом 3 хвилин реєстрували кількість вертикальних, горизонтальних рухів, а також кількість заглядань в "норку", грумінг (акти) і кількість дефекацій. У ці ж терміни оцінювали збереження УРПУ по латентному періоду заходу в темний відсік двочовникової камери [10,14]. Потім тварини виводилися з експерименту під нембуталовим наркозом (40 мг/кг). Для біохімічних досліджень мозок промивали в охолодженому фізіологічному розчині KCl (+5 °C), потім гомогенізували в гомогенізаторі Поттера (1500 об./хв.) протягом 3 хвилин в 5 об'ємах буферу, що містить 50 мМ Трис-HCl, 2 мМ ЕДТА і 2 мМ дитіотрейтол (pH 7,4). Аліквоти цих гомогенатів центрифугували 10 хвилин при 11000 g [4].

У супернатанті (5 мг/мл) визначали продукти окисної модифікації білка (ОМБ) за рівнем альдегідфенілгідразонів (АФГ) і кетонфенілгідразонів (КФГ) по реакції взаємодії окислених

амінокислотних залишків з 2,4-дінітрофенілгідрaziном [4]. Також визначали стабільні метаболіти NO за рівнем нітратів в реакції Грісса [4] і активність NO-синтази (NOS). Активність NOS визначали за різницею між швидкістю окислення NADPH, яка реєструється флюорометрично, в двох паралельних зразках, що як не містить, так і містить інгібітор NOS-N-нітро-L-аргінін [4]. Концентрацію білка оцінювали за методом Бредфорда. Ступінь окисної модифікації ДНК визначали по добовій екскреції 8-гідроксігуаніна (8-OHG) в сечі [4].

Результати проведених досліджень показали, що ХІС характеризується зміною рухової активності, що виражається в зниженні горизонтальної активності тварин на 82,3 %, вертикальної - на 77 %, пригніченням дослідницької активності (кількість заглядань) на 90 %, а також підвищенням тривожності, про що свідчило зниження активіт ґрумінгу на 43 % і підвищення активіт дефекації на 112,5 %. Також встановлено, що перенесений ХІС пригнічує когнітивно-мнестичні функції ЦНС, про що свідчило зменшення латентного періоду УРПУ на 79 % і зниження на 70 % кількості навчених тварин. Введення щурів з ХІС комбінованого засобу тіотриазоліну з триптофаном (1:4) статистично достовірно по відношенню до контрольної групи тварин ($p < 0,05$) підвищувало орієнтовно-дослідницьку активність. Так, в цій групі тварин збільшилася кількість горизонтальних рухів в 2,54 рази, вертикальних - в 2,57 рази, що свідчило про підвищення рухової активності. Під дією комбінованого препарату збільшилася кількість заглядань в "норку" в 5,75 разів. Результати введення Ноофену поступалися досліджуваному препарату за ступенем впливу на досліджувані показники орієнтовно-дослідницької активності у тварин з ХІС. Також введення комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) призводило до збільшення активіт ґрумінгу на 57 % і кількості дефекацій на 47 %, що свідчило про зниження тривожності після стресу. Відтворення УРПУ, проведене через 10 діб щоденного стресування, показало, що у контрольних тварин порушено відтворення пам'ятного сліду, про що свідчило зменшення часу УРПУ на 79 %. Майже всі щури цієї групи швидко заходили в темну "небезпечну" камеру. Введення тваринам комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) послаблювало амнезію УРПУ, викликану ХІС, статистично достовірно збільшуючи латентний час рефлексу при відтворенні (табл. 3). Так, введення комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) збільшувало латентний період УРПУ в 2,38 рази, а введення Ноофену - в 1,44 рази. Варто відзначити, що введення комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) достовірно збільшувало кількість навчених щурів в групі до 90 %, а введення Ноофену - до 60 %. Наведені дані підтверджують ноотропну і стрес-протективну активність пропонованого комбінованого засобу.

Таблиця 3

Вплив комбінованого препарату тіотриазоліну і триптофану (1:4) на орієнтовно-дослідницьку активність тварин в умовах ХІС

Серії тварин	Кількість горизонтальних рухів	Кількість вертикальних рухів	Кількість заглядань	ґрумінг	Дефекація
Інтактні	57,2 ± 2,8	18,2 ± 1,9	3,8 ± 0,52	3,7 ± 0,7	1,6 ± 0,3
ХІС (контроль)	10,1 ± 2,1 -82,3%	4,2 ± 0,31 -77%	0,4 ± 0,62 -90%	2,1 ± 0,4 43,2%	3,4 ± 0,4 112,5%
ХІС+комбінований засіб тіотриазолін + триптофан (1:4), 250 мг/кг	35,8 ± 3,2 ⁺⁺ (+254%)	15,0 ± 1,4 [*] (+257%)	2,7 ± 0,25 ⁺⁺ (+575%)	3,3 ± 0,7 [*] (+57%)	1,8 ± 0,3 ⁺⁺ (-47%)
ХІС+Ноофен 250 мг/кг	28,2 ± 2,3 [*] (+179%)	13,2 ± 1,6 [*] (+214%)	1,2 ± 0,18 [*] (+200%)	3,0 ± 0,4 [*] (+43%)	2,5 ± 0,3 [*] (-26%)

*- $p < 0,05$ по відношенню до контролю

+ - по відношенню до Ноофену

Таблиця 4

Вплив комбінованого препарату тіотриазоліну і триптофану (1:4) на збереження умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) у тварин в умовах ХІС

Групи тварин	Латентний період в тесті УРПУ до навчання, сек	Латентний період в тесті УРПУ через 24 години після навчання, сек	Кількість навчених тварин, %
Інтактні	9,8±1,8	171,6±9,7	100
ХІС (контроль)	7,2±0,82	36,1±3,1 -79%	30
ХІС+комбінований препарат тіотриазолін +триптофан (1:4), 250 мг/кг	9,5±1,2	122,2±10,7* ⁺ +238%	90* ⁺
ХІС+Ноофен 250 мг/кг	6,8±0,81	88,2±6,7* +144%	60*

*- $p < 0,05$ по відношенню до контролю

⁺ - по відношенню доНоофену

Моделювання ХІС протягом 10 діб призводило до розвитку оксидативного стресу в головному мозку експериментальних тварин, про що свідчило підвищення рівня маркерних продуктів окисної модифікації білка. Так, концентрація АФГ і КФГ в контрольній групі тварин на 120 % і на 134 % відповідно перевищувала такі показники інтактної групи. Введення комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) достовірно ($p < 0,05$) знижувало концентрацію маркерів ОМБ - АФГ на 46 %, КФГ на 36 %. За ступенем зниження маркерів оксидативного стресу - АФГ і КФГ - досліджуваний комбінований засіб достовірно перевершував ефективність референс-препарату Ноофену, а за ступенем зниження АФГ - і Тіоцетаму. Окислювальна модифікація білків призводить до зниження функції білків в ланцюгу переносників електронів, активності АТФ-ази, вибіркової дії транспортних пор. Зміна Red/Ox - потенціалу мітохондріальної мембрани може впливати на дисфункцію каскаду дихального ланцюга нейрональної клітини. Перераховані вище зміни, в кінцевому підсумку, призводять до порушення секреторної, інкреторної, транспортної функції нейрона, і як наслідок, до розвитку когнітивного дефіциту [1,2,10].

Таблиця 5

Вплив комбінованого препарату тіотриазоліну і триптофану (1:4) на вміст продуктів окислювальної модифікації білка, стабільних метаболітів NO і активність NO-синтази в головному мозку щурів і добову екскрецію 8- OHG в умовах ХІС

Групи тварин	АФГ у.о./г білка	КФГ у.о./г білка	NO ₂ ⁻ мкм/г білка	NOS нмол/мг/ хв	8- OHG нмол/добу
Інтактні	0,7 ± 0,05	0,35 ± 0,02	5,2±0,33	2,7±0,18	91,1±8,6
ХІС (контроль)	1,54±0,11 (+120%)	0,82±0,05 (+134%)	12,1±1,0 (+132%)	7,3±0,44 (+170%)	312,3±21,8 (+242%)
ХІС+комбінований препарат тіотриазолін +триптофан (1:4), 250 мг/кг	0,82 ± 0,052* ⁺ (-46%)	0,52 ± 0,02* ⁺ (-36%)	6,7±0,42* ⁺ (-44%)	3,2±0,21* ⁺ (-56%)	161,4 ±11,7* ⁺ (-48%)

<i>XIC+Ноофен, 250 мг/кг</i>	1,16±0,105* (-24%)	0,71±0,03* (-13%)	12,5±1,5 (+3%)	6,2±0,32* (-15%)	271,2± 15,1* (-13,2%)
<i>XIC+Тіоцетам, 250 мг/кг</i>	0,97±0,043* (-37%)	0,60±0,03* (-27%)	7,4±0,52* (+38%)	4,4±0,35* (-40%)	221,1± 12,4* (-30%)

*- $p < 0,05$ по відношенню до контролю

+ - по відношенню доНоофену

¹ - по відношенню до тіоцетаму

Гіперпродукція NO і OH при деяких патологічних станах (ішемія, стрес, нейродегенеративні захворювання і т. д.) грає ключову роль в молекулярних механізмах окисного стресу і є пусковим механізмом у окислювальній деструкції ДНК клітини [1,2,13]. Окислювальна модифікація ДНК призводить до утворення 8-гідроксигуаніна (8-OHG), який має виражену цито- і геномотоксичну дію, найважливішими наслідками якої є спотворення молекулярно-біологічних процесів в клітині - реплікації і транскрипції. З таблиці 5 видно, що XIC супроводжується значним підвищенням концентрації 8-OHG (в 2,42 рази) в сечі щурів. Введення експериментальним тваринам комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) надавало протективну дію відносно нуклеїнових кислот при оксидативному стресі, про що свідчило зниження добової екскреції 8-OHG на 48 % ($p < 0,05$). Введення Ноофену призводило до зниження 8-OHG на 13,2 % ($p < 0,05$) в сечі. Введення комбінованого препарату, що містить тіотриазолін - Тіоцетаму - знижувало 8-OHG на 30 % ($p < 0,05$) в сечі. Варто відзначити, що згідно даного тесту пропонований комбінований засіб достовірно перевершує ефект Ноофену і Тіоцетаму, що свідчить про більш виражену антиоксидантну і генопротективну дію комбінованого препарату тіотриазоліну і триптофану. Суттєва роль в гіперпродукції NO належить індукцйбельній NO-синтазі, яка експресується під дією факторів транскрипції - JunB; c-Fos; AP-1 [1,2]. Нашими дослідженнями було встановлено, що XIC приводив до активації NO-синтази на 132 % і гіперпродукції NO, про що свідчило підвищення на 170 % в головному мозку щурів його стабільних метаболітів. Призначення експериментальним тваринам комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1:4) призводило до зниження активності NO-синтази на 56 % і гіперпродукції NO на 44 %. Введення Ноофену достовірно не впливало на вміст нітритів і достовірно поступалося за ступенем впливу на активність NO-синтази. Введення Тіоцетаму знижувало активність NO-синтази на 40 % і гіперпродукції NO на 38 %. За ступенем зниження активності NO-синтази комбінований препарат тіотриазоліну і триптофану (1:4) достовірно перевершує Тіоцетам (табл. 5).

Подібний ефект комбінованого засобу тіотриазоліну і триптофану (1: 4) є одним з ключових механізмів його нейропротективної дії, так як від співвідношення внутрішньоклітинних концентрацій NO і АФК залежить характер дії цих сполук на процеси, пов'язані з регулюванням апоптозу в нейрональній клітині [1,2].

Таким чином, досліджуваний препарат - комбінований засіб тіотриазоліну і триптофану (1:4) має виражені стрес-протективні, ноотропні, анкіолітичні і антиоксидантні властивості, і за силою цих фармакологічних ефектів достовірно перевершує референс-препарат Ноофен, а по силі антиоксидантної дії - Тіоцетам.

Проаналізувавши результати проведених досліджень, можна зробити висновок, що пропонований комбінований засіб тіотриазоліну і триптофану забезпечує більш високу анкіолітичну і антиоксидантну активність у порівнянні з препаратами порівняння. Крім того, пропонований засіб проявив нові види активності - ноотропну і стрес-протективну дію, якими окремо компоненти комбінованого засобу - триптофан та тіотриазолін - не мали.

Таблетки, що містять триптофан і тіотриазолін, виготовляють покритими оболонкою або без оболонки. Ядро таблеток виготовляють різними способами, наприклад, шляхом отримання порошкоподібної суміші цих активних інгредієнтів з додаванням достатньої кількості допоміжних речовин і подальшого пресування. До складу таблеток входять різні допоміжні речовини, які впливають на фізико-хімічні властивості, наприклад, поліфункціональні допоміжні речовини, наповнювачі, розпушувачі, антифрикційні речовини і т. ін.

Капсули виготовляють шляхом дозування суміші активних компонентів триптофану і тіотриазоліну і допоміжних речовин в капсули, які можуть містити разову або вищу терапевтичну дозу пропонованого засобу.

Розчин для ін'єкцій, що містить як активні речовини триптофан і тіотриазолін, готують як з використанням стабілізатора, так і без нього. Можливе використання речовин, які дозволяють досягти ізотонічності розчину. Розчин виготовляють різних концентрацій, які містять терапевтичну дозу пропонованого комбінованого лікарського засобу.

Для виготовлення інфузійних розчинів комбінованого препарату триптофану з тіотриазоліном можуть використовуватися фізіологічні розчини різного складу.

Таким чином, використання запропонованого засобу дозволить розширити вітчизняний арсенал лікарських засобів, які можна застосовувати в неврології, і які є безпечними і володіють високою ефективністю.

Література:

1. Беленичев И.Ф., Губский Ю.И Павлов С.В. Токсические последствия окислительной модификации белков при различных патологических /состояниях // Совр. пробл. токсикол.- 2005.- № 3.- С.20-26.

2. Беленичев И.Ф., Черний В.И., Павлов С.В., Кучеренко Л.И. Нейропротекция и нейропластичность.- К.:Логос, 2015.- 512 с.

3. Гойкова Л.А., Зорян Е.В., Анисимова Е.Н. // Фармакологические методы коррекции стресса // Вопр. биол. мед. и фарм. химии.- 2004.- № 3.- С. 3-5.

4. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев, Л.А. Громов и др. - Методические рекомендации Государственного Фармакологического Центра МЗ Украины, Киев.-2010.-81с.

5. Дьюсбери Р. Изучение поведения животных. М.: Наука, 1980.- 376 с.

6. Експериментальне дослідження ноотропної активності таблеток "Тіоцетам"/ Мазур І.А., Беленічев І.Ф., Стець В.Р.// Експер.фізіол.та біохім.-2002.-№ 1.-С. 7-11.

7. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия.- 2002.- Т. 67, № 3.- С. 339-352.

8. Мазур І.А., Беленичев И.Ф. К вопросу создания препаратов нейропротективного действия // Вісник фармакології та фармацевції.-2006.-№ 4.-С. 28-36.

9. Мазур І.А.,Зименковский Б.С., Волошин Н.А., Чекман И.С., Стец В.Р. Тиотриазолин.- Львов: Наутилус, 2005.- 230 с.

10. Калуев А.В. Стресс, тревожность и поведение. Актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных.- Киев, 1998.-95с.

11. Коплик Е.В., Мещеряков А.Ф., Перцов С.С. и др. Влияние дипептида вилонна на устойчивость крыс к эмоциональному стрессу // Росс. физиол. журн. - 2002.- Т.88, № 11.- С. 1440-1452.

12. Стефанов А.В. Доклинические исследования лекарственных веществ.- Киев.: ГФЦ МЗ Украины, 2000.- 540 с.

13. Aruoma O., Halliwell B. Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases-St. Lucia, London: OCIA Int., 1999.- 345 p.

14. Bures J. Cortical spreading depression as a memory disturbing factor / J. Bures, O. Buresude // J. comp. and phisiol. - 1963. - Vol. 56, № 2. - P. 268-272.

15. Mikava S., Kinouchi H., Kami H. et al. Attenuation of acute and chronic damage flowing traumatic brain injuri in copper, zinc-superoxide dismutase transgenic mice // J. Neurosurg. - 1996.- V. 85.- P. 885-891.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Комбінований лікарський засіб анксиолітичної, стрес-протективної, ноотропної та антиоксидантної дії, що містить триптофан, який **відрізняється** тим, що він додатково містить тіотриазолін.

2. Комбінований лікарський засіб анксиолітичної, стрес-протективної, ноотропної та антиоксидантної дії за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить триптофан та тіотриазолін у такому співвідношенні: триптофан - в межах від 1 до 7 масових часток на 1 масову частку тіотриазоліну.

3. Комбінований лікарський засіб анксиолітичної, стрес-протекторної, ноотропної та антиоксидантної дії за пп. 1 і 2, який **відрізняється** тим, що має форму таблеток, капсул, ін'єкційних та інфузійних розчинів.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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