



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41659 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 31/455
A61K 31/15

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІЗОНІАЗИДУ ЯК ПРОТЕКТОРА ПУРИНОБЛОКУВАЛЬНОЇ ДІЇ ПІРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТУ

1

(21) u200901680
(22) 26.02.2009
(24) 25.05.2009
(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.
(72) ГРУША МИХАЙЛО МИХАЙЛОВИЧ, UA,

2

РОМАНЕНКО ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, UA
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, UA
(57) Застосування ізоніазиду як протектора пуриноблокувальної дії піридоксаль-5'-фосфату.

Корисна модель, що заявляється, відноситься до області експериментальної медицини та біології, а саме експериментальної фізіології людини і тварин та фармакології і належить до визначення нових властивостей ізоніазиду, а саме як протектора пуриноблокувальної дії піридоксаль-5'-фосфату (ПФ).

В автономній нервовій системі ссавців окремих видів (в тому числі і людини) одним з головних гальмівних нейромедіаторів є аденозинтрифосфат (АТФ), який здатен взаємодіяти з Р₂-пуринорецепторами плазматичної мембрани. Імуногістохімічними та фізіологічними методами досліджень показано наявність пресинаптичних рецепторів на мембрані нейронів та постсинаптичних рецепторів на поверхні інтерстиціальних клітин Кохала та клітин гладких м'язів (ГМ) стінки кишок [1-3].

В останні роки встановлено, що одне з фосфорильованих похідних вітаміну В₆ ПФ виявляє також властивості блокатора Р₂-пуринорецепторів, локалізованих в різних органах і тканинах ссавців [4, 5]. Нами з'ясовано, що ПФ здатен впливати на неадренергічне синаптичне гальмування в ГМ кишечника людини, імовірно, завдяки взаємодії з чутливими до аденозинтрифосфату пуринорецепторами [6, 7]. При цьому в ізольованих м'язових смужках з тонкої і товстої кишок людини ПФ викликає зменшення амплітуди гальмівних синаптичних потенціалів. З огляду на важливу роль пуринергічної синаптичної передачі у регуляції функцій кишок та відсутність фармакологічних препаратів, що можуть бути використані у сучасній клінічній практиці для впливу на синаптичне пуринергічне гальмування у кишечнику, є доцільним розглянути ізоніазид в якості протектора пуриноблокувальної дії піридоксаль-5'-фосфату.

Ізоніазид (ізонікотинілгідрозид, гідрозид ізонікотинової кислоти) є протитуберкульозним засобом, який вважають одним з найактивніших препаратів по відношенню до мікобактерій туберкульозу і, у той же час, одним з безпечних лікарських засобів, що застосовують при лікуванні різних форм туберкульозу, навіть під час вагітності [8, 9]. Відомо, що тривале використання (упродовж 6-12 місяців) ізоніазиду у людини може обумовлювати виникнення таких реакцій як з боку шлунково-кишкового тракту, так і з боку нервової системи, що нагадують порушення, які спостерігаються у людини при нестачі вітаміну В₆ (піридоксину, піридоксалу). Вказана побічна дія ізоніазиду усувається після введення пацієнтам, які його приймають, вітаміну В₆, тому останній рекомендується і як засіб профілактики небажаних реакцій під час прийому ізоніазиду [10]. Припускається, що вони можуть бути пов'язані з пригніченням ізоніазидом піридоксаль-5'-фосфат-залежних ферментативних реакцій через послаблення перетворення піридоксалу у ПФ [11] або з безпосередньою взаємодією ізоніазиду з ПФ у складі ПФ-залежного ферменту і обумовленим цим порушенням нормального перебігу молекулярних перетворень в активному центрі ПФ-залежного ферменту [12]. Однак, незважаючи на широке використання ізоніазиду, механізм його дії остаточно не з'ясований [13]. Експериментальні дослідження, проведені в останні роки, виявляють нові особливості антимікотичної дії ізоніазиду і його взаємодії з вітаміном В₆ [14] та вказують на здатність ізоніазиду потенціювати ефекти нітровоазодилаторів на ГМ аорти щура [15].

Задача корисної моделі, що заявляється полягає у виявленні властивостей ізоніазиду як протек-

UA (11) 41659 (13) U

тора пуриноблокуючої модулюючої дії ПФ на синаптичне гальмування ГМ товстої кишки людини.

Результат, що досягається полягає в зменшенні пуриноблокуючої дії піридоксаль-5'-фосфату на синаптичне гальмування ентеральних ГМ, отриманні можливості більш досконало здійснювати регуляцію синаптичної передачі у ГМ кишечнику через вплив на пуринергічні механізми синаптичного гальмування та розробляти раціональні методи корекції порушень моторики кишечника.

Експерименти проведені на ГМ кільцевого шару сигмоподібної ділянки ободової кишки людини.

З візуально нормальних повношарових ділянок стінки резекційних фрагментів кишки людей, яким в хірургічних клініках за медичними показаннями було проведено операції отримували ділянку стінки розміром 1020мм В операційній, після вирізання, повношарову ділянку кишки ретельно промивали розчином Кребса, який був кімнатної температури. Склад розчину Кребса містив (ммоль/л): NaCl-120,4, KCl-5,9, NaHCO₃-15,5, NaH₂PO₄-1,2, CaCl₂-2,5, MgCl₂-1,2, глюкоза-11,5. У лабораторних умовах під бінокулярним стереомікроскопом з повношарової ділянки кишки вирізали ізольовані смужки кільцевого шару ГМ розміром 2-10мм. При цьому, послідовно відшаровували слизову оболонку разом з підслизовим шаром. Потім м'язовий препарат стінки кишки знову ретельно промивали розчином Кребса. З цього фрагменту отримували ізольовані гладком'язові смужки кільцевого шару, які занурювали у розчин Кребса, що мав температуру 35-36°C і витримували в ньому не менше ніж 2 години до початку електрофізіологічних досліджень.

Розчини, у яких проводили інкубацію ізольованих м'язових препаратів, містили для попередження холінергічних впливів блокатор М-холінорецепторів атропіну сульфат ($1 \cdot 10^{-6}$ М) ("Дарниця", Україна).

Відведення гальмівних синаптичних потенціалів (ГСП) в м'язових смужках здійснювали з використанням методики одинарного сахарного містка [16]. Для генерації ГСП м'язові смужки інтрамурально подразнювали прямокутними поштовхами електричного струму супрамаксимальної сили тривалістю 0,5-1мс. Ефективність впливу досліджуваних сполук на показники ГСП оцінювали за допомогою параметричних методів прямої та непрямої різниці з використанням t критерію Стюдента.

Згідно отриманих даних 40-хвилинне прикладання ізоніазиду ("Sigma", США) в концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, не впливало на потенціал спокою, спонтанну електричну активність клітин ГМ та на такі показники ГСП як латентний період, амплітуда, швидкість наростання до ½ амплітуди, тривалість спаду до ½ амплітуди. У концентрації $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л ізоніазид обумовлював лише незначне зменшення (до 10%, $P < 0,05$) загальної тривалості ГСП. Наведені дані свідчать, що ізоніазид не чинить суттєвого впливу на синаптичне гальмування ГМ товстої кишки людини, Фіг., де:

1 - ГСП в розчині Кребса (контроль);

2 - ГСП за присутності у розчині Кребса ізоніазиду ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (40хв аплікації);

3 - ГСП за присутності у розчині Кребса піридоксаль-5'-фосфату ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) та ізоніазиду ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (40хв сумісної аплікації);

4 - ГСП за присутності у розчині Кребса піридоксаль-5'-фосфату ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) (40 хв відмивання ізоніазиду ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л)).

На відміну від ізоніазиду ПФ ($1 \cdot 10^{-4}$ М) викликав такі статистично достовірні ($P < 0,05$) зміни в показниках ГСП м'язових смужок порівняно з прийнятими за 100% значеннями у контролі: зменшення амплітуди до $63 \pm 10\%$ і швидкості наростання ГСП до ½ амплітуди до $51 \pm 10\%$ та збільшення латентного періоду до $160 \pm 20\%$. Вказані зміни амплітудно-кінетичних параметрів ГСП вказують на виражену блокуювальну дію ПФ на синаптичне гальмування ентеральних ГМ.

Дослідження дії ПФ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) на синаптичне гальмування в м'язових смужках ободової кишки людини на фоні 40-хвилинного прикладання ізоніазиду в концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л та ізоніазиду в концентрації $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л вказують, що ізоніазид здатен суттєво зменшувати пуриноблокуювальну дію ПФ. Присутність ізоніазиду ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) у розчині Кребса не змінювала характеру впливу ПФ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) на синаптичне гальмування ГМ. За умови присутності ізоніазиду ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) у розчині Кребса модулюючий вплив ПФ на пуринергічне синаптичне гальмування ГМ, порівняно з дією ПФ за відсутності ізоніазиду у середовищі, був суттєво послаблений (див. Рис. 1). Якщо за 100% прийняти значення показників ГСП м'язових смужок у розчині Кребса, то на 30-й хвилині аплікації $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л ПФ у складі цього розчину амплітуда ГСП та швидкість наростання ГСП до ½ амплітуди становили відповідно 47% та 47%. Якщо за 100% прийняти значення показників ГСП м'язових смужок у розчині Кребса, що містив $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л ізоніазиду, то на 30-й хв аплікації $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л ПФ у складі цього розчину, амплітуда ГСП та швидкість наростання ГСП до ½ амплітуди становили відповідно 84% та 84%. Результати статистичного аналізу впливу ізоніазиду на блокуювальну дію ПФ на синаптичне гальмування у м'язових смужках свідчать про статистично достовірні відмінності ($P < 0,05$) у ступіні змін латентного періоду, амплітуди та швидкості наростання ГСП до ½ амплітуди під впливом ПФ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) порівняно з такими під впливом ПФ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) на фоні дії $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л ізоніазиду. При цьому ізоніазид не обумовлює необоротних змін у синаптичному гальмуванні ГМ, про що свідчить ефективний вплив ПФ на синаптичне гальмування ГМ після відмивання ізоніазиду (див. Фіг.).

Таким чином, проведені дослідження показали, що протитуберкульозний препарат ізоніазид має виражену здатність зменшувати блокуювальний вплив піридоксаль-5'-фосфату на пуринергічне синаптичне гальмування гладких м'язів товстої кишки людини.

Література:

1. Gallego D., Hernández P., Clavé P., Jiménez M., P_{2Y1} receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon //

Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. - 2006. - Vol. 291. - P. G584 - G594.

2. Tack. J. Receptors of the enteric nervous system: potential targets for drug therapy // Gut. - 2000. - 47 (Suppl. IV). - P. iv20-iv22.

3. Goyal R.K. Targets of enteric motor neurons: smooth muscle cells // Gut. 2000. - 47 (Suppl. IV). - P. iv38-iv39.

4. Lambrecht G., Braun K., Darner M., et al. Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptors antagonists // Curr. Pharm. Des. - 2002. - Vol. 8, №26. - P. 2371 - 2399.

5. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines // Pharmacol. Rev. - 1998. - Vol. 50, №3. - P. 413 - 492.

6. Романенко О.В., Груша М.М., Фомін П.Д. Блокувальна дія піридоксаль-5'-фосфату на неадеренергічне синаптичне гальмування гладеньких м'язів тонкого кишечника людини // Фізіол. журн. - 2006. - Т. 52, №1. - С. 62 - 70.

7. Romanenko A.V., Grusha M.M. Synaptic inhibition of smooth muscles of the human colon: Effects of vitamin B₆ and its derivatives // Neurophysiology / Neirofizyologiya. - 2006. - Vol. 38, No. 4. - P. 217-227.

8. Єгоров О.М., Панченко М.С., Степаненко Л.В., та ін. Медико-соціальні проблеми туберкульозу (огляд літератури) // Медицина Залізн. Трансп. України. -2004.-№3.-С. 84-87.

9. Савула М.М., Сахелашвілі М.І. Туберкульоз у вагітних: перебіг, лікування // Укр. пульмонолог. журн. - 2004. - №1. - С. 60 - 62.

10. Петрух Л.І., Михалик О.І., Федосеева Л.О. та ін. Метаболічна роль вітамінів при туберкульозі // Вісник Вінницького державного медичного університету. - 2002. - Т. 6, №1. - С.193 - 194.

11. Мецлер Д. Биохимия. Т. 2. - М.: Мир, 1980. - 606с.

12. Губський Ю.І., Гайова Л.В., Бобкова Л.С. Молекулярне моделювання впливу ізоніазиду на біохімічну дію вітаміну В₆ в організмі // Медична хімія. - 2004. -Т.6, №3.-С. 8-13.

13. Люльман Х. Наглядная фармакология / Х. Люльман, К. Мор, Л. Хайн; пер. с нем. Е.А. Кашиной. - М.: Мир, 2008. - 383с.: ил. - (Наглядная медицина).

14. Гайова Л.В., Суслов Є.І., Бобкова Л.С., Клименко М.Т. Вивчення сумісної дії ізоніазиду та вітаміну В₆ на процес лікування легень морських свинок за умов експериментального туберкульозу // Укр. пульмонолог. журн. - 2005. - №3. - С. 48-50.

15. Vidrio H., Fernandez G. Potentiation by isoniazid of induced by nitrovasodilators in rat aorta // J. Cardiovasc. Pharmacol. - 1998. - Vol. 32, №3. - P. 378 -381.

16. Артеменко Д.П., Бурый В.А., Владимиров И.А., Шуба М.Ф. Модификация метода одинарного сахарозного мостика // Физиол. журн. - 1982.-Т. 28, №3.-С. 374-380.

