



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92872 (13) C2  
(51) МПК (2009)  
A61K 31/616 (2006.01)  
A61K 31/41  
A61P 7/02 (2006.01)  
A61P 39/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМБІНОВАНИЙ АНТИАГРЕГАНТНИЙ І АНТИОКСИДАНТНИЙ ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ

1

(21) а200912967

(22) 14.12.2009

(24) 10.12.2010

(46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р.

(72) ЛЕВИХ АНТОН ЕДУАРДОВИЧ, МАМЧУР ВІТАЛІЙ ЙОСИПОВИЧ, МАЗУР ІВАН АНТОНОВИЧ, КУЧЕРЕНКО ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА, ГЕОРГІЄВСЬКИЙ ГЕННАДІЙ ВІКТОРОВИЧ, ТРИГУБЧАК ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАУКОВО-ВИРОБНИЧЕ ОБ'ЄДНАННЯ "ФАРМАТРОН"

2

(56) UA 39673 A, 15.06.2001

UA 65954 A, 15.04.2004

UA 62238 A, 15.12.2003

(57) 1. Комбінований антиагрегантний і антиоксидантний лікарський засіб, що містить як активну основу ацетилсаліцилову кислоту, який **відрізняється** тим, що активна основа додатково містить тіотриазолін.

2. Комбінований антиагрегантний і антиоксидантний лікарський засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить ацетилсаліцилову кислоту в співвідношенні з тіотриазолом 4:1.

Винахід відноситься до медицини й фармації, зокрема, до лікарських засобів, які використовуються для лікування та профілактики захворювань, що характеризуються підвищеною тенденцією до тромбозів (інфаркт міокарду, ішемічний інсульт).

Відомий лікарський засіб «Ацетилсаліцилова кислота» [Машковский М.Д. Лекарственные средства, 15 издание / М.Д. Машковский // М.: Медицина. - 2005. - Т.1. - С.41-42.].

Ацетилсаліцилова кислота (АСК) є одним з найбільш ефективних нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЗЛЗ). В той же час важливою особливістю АСК є її здатність чинити антиагрегантну дію, пригнічувати спонтанну й індуковану агрегацію тромбоцитів. На сьогодні АСК у низьких дозах (75-150 мг) однозначно рекомендується як препарат першого ряду для вторинної профілактики кардіоваскулярних подій і смерті у кардіологічних пацієнтів високого ризику. Сучасні міжнародні рекомендації з лікування різних категорій кардіологічних пацієнтів високого ризику класифікують застосування ацетилсаліцилової кислоти на рівні рекомендацій І класу (безумовно доведена корисність даного терапевтичного підходу) і рівня доказовості А (ефективність і безпечність препарату при даних клінічних станах

доведена мінімум у двох багатоцентричних рандомізованих плацебо контрольованих дослідженнях).

Негативно дією ацетилсаліцилової кислоти є ушкодження слизових оболонок. Використання АСК може привести до виникнення ерозій і виразок слизових оболонок шлунково-кишкового тракту (у першу чергу шлунка й дванадцятипалої кишки), а також кровотеч. Ці побічні ефекти є дозозалежними і частота їх прояву значно зростає при використанні високих доз АСК. Однак навіть при використанні низьких «кардіологічних» доз АСК для антитромбоцитарної терапії порушення з боку шлунково-кишкового тракту залишаються одними з найпоширеніших побічних дій. Крім того, застосування АСК може приводити до розвитку реакцій гіперчутливості (бронхоспазм, набряк, кропивниця та інші шкірні реакції), тромбоцитопенії, порушення функцій печінки й нирок.

Відомий лікарський засіб тіотриазолін [Тиотриазолін / [И.А. Мазур, Н.А. Волошин, И.С. Чекуман и др.]. - Запорожье, Львов. - 2005. - С. 26-40] має яскраво виражені антиоксидантні властивості: реактивує такі антиоксидантні ферменти, як супероксиддисмутаза й каталаза, знижує ступінь окисної модифікації білка й ліпопероксидації, знижує утворення супероксидрадикалу й пероксинітриду. Крім цього, тіотриазолін має виражений енерготропний ефект, що зумовлює поліпшення метабо-

(19) UA (11) 92872 (13) C2

лічних процесів різних органів і систем. Тіотриазолін характеризується наявністю гастропротекторної, гепатопротекторної, кардіопротекторної та нейропротекторної дії.

Враховуючи широке застосування ацетилсаліцилової кислоти як антиагрегантного засобу, нами він прийнятий як прототип.

В основу винаходу поставлено задачу розробити лікарський засіб із широким спектром фармакологічної дії й низькою частотою розвитку побічних ефектів, що перевершує прототип за антиагрегантним ефектом, який досягається при його використанні.

Вирішення поставленої задачі забезпечує комбінований антиагрегантний і антиоксидантний лікарський засіб, що містить як активну основу ацетилсаліцилову кислоту, за рахунок того, що активна основа додатково містить тіотриазолін при співвідношенні ацетилсаліцилової кислоти до тіотриазоліну 4:1.

Фармакологічний ефект від використання винаходу

Використання комбінації ацетилсаліцилової кислоти + тіотриазолін приводить до посилення антиагрегантних властивостей ацетилсаліцилової кислоти. Результати досліджень показали, що на фоні введення досліджуваної комбінації зменшу-

валися ступінь і швидкість індукованої агрегації тромбоцитів при використанні основних індукторів агрегації (колагену, аденозиндифосфату, арахідонової кислоти). Також було відзначено значне зниження ульцерогенних властивостей ацетилсаліцилової кислоти, обумовлених порушенням синтезу гастропротекторних простагландинів у слизовій оболонці шлунка. В результаті скринінгових досліджень вдалося виявити, що найбільш вдалою комбінацією є використання препаратів ацетилсаліцилової кислоти + тіотриазолін у співвідношенні 4:1, при якій кожний з компонентів комбінації використаний у своїй середньотерапевтичній дозі (за антиагрегантною активністю).

Використання запропонованого комбінованого лікарського засобу, відповідно наведеному нижче опису, дозволить підвищити його антиагрегантну активність у порівнянні з ацетилсаліциловою кислотою (табл. 1-3), що обумовлене наявністю власної активності тіотриазоліну у відношенні пригнічення агрегації тромбоцитів, здатністю стабілізувати мембрани тромбоцитів, зменшуючи тим самим виділення з них арахідонової кислоти, у процесі метаболізму якої утворюється один з найбільш потужних індукторів агрегації й вазоконстрикторів - тромбоксан  $A_2$ .

Таблиця 1

Вплив препаратів на максимальний ступінь індукованої агрегації тромбоцитів

Групи	Показники	Індуктор агрегації, що використовується			
		Колаген (2мг/мл)	Арахідонова кислота (1ммоль/л)	АДФ (20 мкмоль/л)	АДФ (5 мкмоль/л)
		Максимальний ступінь агрегації, %			
Контроль (інтактні тварини) (n=6)	M±m	82,0±4,16	82,5±3,67	70,8±3,33	44,5±3,55
Ацетилсаліцилова кислота, 10 мг/кг (n=6)	M±m%	65,6±2,66 - 20,0*	55,6±8,79 -32,6*	56,8±3,82 - 19,8*	42,7±3,68 - 4,0
Ацетилсаліцилова кислота, 10мг/кг+Тіотриазолін, 2,5 мг/кг (n=6)	M±m%	52,4±4,53- 36,1*/**	49,4±6,56-40,1*	35,1±2,9- 50,4*/**	30,5±2,3- 31,5*/**

Примітка: В таблиці зміни показників приведені у відсотках від контрольної групи, які прийняті за 100%.

(+) - збільшення, (-) - зменшення.

\* - відмінності достовірні по відношенню до контрольної групи (P<0,05);

\*\* - відмінності достовірні по відношенню до групи АСК, 10 мг/кг (P<0,05).

Таблиця 2

Вплив препаратів на швидкість (за 30 сек) індукованої агрегації тромбоцитів

Групи	Показники	Індуктор агрегації, що використовується			
		Колаген (2 мг/мл)	Арахідонова кислота (1 ммоль/л)	АДФ (20 мкмоль/л)	АДФ (5 мкмоль/л)
		Швидкість агрегації (%/хв)			
Контроль (інтактні тварини) (n=6)	M±m	16,1±1,27	43,3±3,85	50,3±3,53	45,2±4,07
Ацетилсаліцилова кислота, 10мг/кг (n=6)	M±m %	14,1±1,04 - 12,4	51,5±16,43 +18,9	36,8±1,93 -26,8*	42,1±3,22 -6,9
Ацетилсаліцилова кислота, 10мг/кг + Тіотриазолін, 2,5 мг/кг (n=6)	M±m %	6,7±0,66 - 58,4*/**	59,7±11,01 +37,9	32,7±1,17 -35,0*	29,7±2,42 - 34,3*/**

Примітка: В таблиці зміни показників приведені у відсотках від контрольної групи, які прийняті за 100%.  
(+) - збільшення, (-) - зменшення.

\* - відмінності достовірні по відношенню до контрольної групи ( $P < 0,05$ );

\*\* - відмінності достовірні по відношенню до групи АСК, 10 мг/кг ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 3

Вплив препаратів на час максимуму індукованої агрегації тромбоцитів

Групи	Показники	Індуктор агрегації, що використовується			
		Колаген (2 мг/мл)	Арахідонова кислота (1 ммоль/л)	АДФ (20 мкмоль/л)	АДФ (5 мкмоль/л)
		Час максимуму, с			
Контроль (інтактні тварини) (n=6)	M±m	932±58	318±51	454±34	152±12
Ацетилсаліцилова кислота, 10мг/кг (n=6)	M±m%	717±58- 23,1*	330±163+3,8	364±33-19,8	151±15-0,7
Ацетилсаліцилова кислота, 10мг/кг + Тіотриазолін, 2,5 мг/кг (n=6)	M±m%	649±26 - 30,4*	507±104+59,4	351±28-22,7*	167±18+9,9

Примітка: В таблиці зміни показників приведені у відсотках від контрольної групи, які прийняті за 100%.  
(+) - збільшення, (-) - зменшення.

\* - відмінності достовірні по відношенню до контрольної групи ( $P < 0,05$ );

\*\* - відмінності достовірні по відношенню до групи АСК, 10 мг/кг ( $P < 0,05$ ).

Для реалізації цього завдання мають значення зменшення утворення активних форм кисню й реактивація антиоксидантної системи, а також

гастропротекторна дія, властива тіотриазоліну, що підтверджується нашими даними з вивчення ульцерогенності (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив препаратів на розвиток ушкоджень слизової оболонки шлунка

Показник	Групи тварин			
	1	2	3	4
Виразковий індекс %	10,17 +177,1	4,33 +18,0	3,67 -	0 -

Примітка:

Групи тварин, що отримували препарати (в кожній групі n=6):

1 - ацетилсаліцилова кислота (10 мг/кг);

2 - ацетилсаліцилова кислота (10 мг/кг) + тіотриазолін (2,5 мг/кг);

3 - розчинник в адекватній кількості (контрольна група);

4 - повноцінне харчування, препарати не вводились.

В таблиці зміни показників приведені у відсотках від контрольної групи, які прийняті за 100%.  
(+) - збільшення, (-) - зменшення.

Суть винаходу пояснюється наведеним нижче описом запропонованого лікарського засобу й прикладами його використання при фіксованому співвідношенні активних компонентів і лікарського засобу, прийнятого за прототип.

У результаті дослідження були встановлені особливості проявів антиагрегантної й ульцерогенної дії досліджуваних препаратів та їх впливу на антиоксидантні ефекти. Препарати вводили внутрішньошлунково (per os) на 1% крохмальному слизу щодня протягом 5 днів у дозах, зазначених у таблицях 1-3 та 5. У кожній групі використовувалось по 6 тварин.

Таблиця 5

Вплив внутрішньошлункового введення тіотриазоліну  
на максимальний ступінь АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів

Групи	Показники	Максимальний ступінь агрегації, %
Контроль (інтактні тварини, n=6)	M±m	70,8±3,33
Тіотриазолін, 0,1 мг/кг (n=6)	M±m %	69,9±3,52 -1,3
Тіотриазолін, 0,3 мг/кг (n=6)	M±m %	69,3±2,71 -2,1
Тіотриазолін, 1 мг/кг (n=6)	M±m %	66,2±2,97 -6,5
Тіотриазолін, 3 мг/кг (n=6)	M±m %	59,8±1,89 -15,5*
Тіотриазолін, 10 мг/кг (n=6)	M±m %	54,2±2,53 -23,4*
Тіотриазолін, 30 мг/кг (n=6)	M±m %	53,1±2,82 -25,0*
Тіотриазолін, 100 мг/кг (n=6)	M±m %	52,4±3,25 -26,0*
Тіотриазолін, 300 мг/кг (n=6)	M±m %	51,3±3,04 -27,5*
Тіотриазолін, 1000 мг/кг (n=6)	M±m %	51,1±3,48 -27,8*

Примітка: В таблиці зміни показників приведені у відсотках від контрольної групи, які прийняті за 100%.  
(+) - збільшення, (-) - зменшення.

\* - відмінності достовірні по відношенню до контрольної групи (P<0,05).

Таким чином, запропонований лікарський засіб, згідно з винаходом, проявляє більш високу антиагрегантну активність у порівнянні з відомим препаратом ацетилсаліциловою кислотою, при цьому знижуючи побічні дії ацетилсаліцилової кислоти, тобто в запропонованому лікарському засобі спостерігається збільшення терапевтичного ефекту при тій же дозі ацетилсаліцилової кислоти й з меншим негативним впливом на показники фізіологічної активності організму. Засіб може застосовуватися як лікарський препарат у вигляді таблеток.

Для ілюстрації приводимо наступні приклади вивчення внутрішньошлунково (per os) уведених препаратів за винаходом.

#### Приклад 1

Вивчення дії тіотриазоліну та комбінації препаратів на параметри індукованої агрегації тромбоцитів

Кров для дослідження індукованої агрегації тромбоцитів брали у наркотизованих білих нелінійних щурів масою 220-250 г внутрішньосерцевою пункцією. Згортання попереджувалося 3,8% розчином цитрату натрію, що додавався до крові у співвідношенні 1:9. Для виключення контактної активації тромбоцитів у роботі використовувався тільки пластмасовий посуд (кувети, пробірки). Спочатку кров центрифугували на малих оборотах (15 хвилин при 100g). При цьому відділяється плазма, багата тромбоцитами (ПБТ), яку відбирали в пластмасові пробірки. Потім кров, що залишилася, знову центрифугували, але вже на більш високих оборотах (15 хвилин при 2000g). Верхній шар, що утворюється після повторного

центрифугування, є безтромбоцитарною плазмою, яку також відбирали в пластмасові пробірки. ПБТ використовувалась для дослідження функціональної активності тромбоцитів (вивчення агрегації тромбоцитів), безтромбоцитарна плазма - для калібрування шкали оптичної густини приладу (світлопропускання безтромбоцитарної плазми приймалося за 100% агрегації), і, при необхідності, для розведення багатотромбоцитами плазми до стандартного вмісту клітин, який повинен становити  $200-250 \times 10^9/\text{л}$ . Припустимий строк зберігання ПБТ при кімнатній температурі або у водяній бані при 37°C не більше 3 годин після взяття проби крові, тому дослідження функціональної активності тромбоцитів проводили протягом цього часу.

Дослідження агрегаційної здатності тромбоцитів проводили за методикою G.V.Born на аналізаторі агрегації тромбоцитів «SOLAR AP 2110» (Білорусь), використовуючи в якості індукторів розчини аденозиндифосфату (АДФ) у кінцевих концентраціях 5 і 20 мкМ (НВО «РЕНАМ», Росія), колагену 2 мг/мл (ТОВ «Технологія-Стандарт», Росія) і арахідонової кислоти 1 мМ («Sigma-Aldrich», Німеччина). Визначали ступінь максимальної агрегації, час настання максимуму та швидкість агрегації за 30 сек. Тромбоцити при дослідженні на агрегометрі AP 2110 перебувають в умовах, що наближаються до фізіологічних, у власному мікросвіті, при стандартній температурі 37°C і постійній швидкості перемішування, що моделює кровообіг, в інтактному середовищі (одноразові пластикові кувети). Мірою агрегаційного процесу є графічно реєстроване падіння оптичної

густини плазми крові в результаті споживання тромбоцитів в агрегатах, що утворюються під впливом індукторів агрегації.

Після приготування всіх необхідних розчинів (ПБТ, безтромбоцитарна плазма, індуктори агрегації), вони витримувалися в термостаті при температурі 37°C протягом 3 хвилин. Потім на агрегометрі визначалась оптична густина безтромбоцитарної плазми (її світлопропускання у відносній шкалі приладу приймалося за 100% агрегації). Після цього в агрегометр ставилась кювета із ПБТ і вимірювалась кількість тромбоцитів у зразку плазми (при необхідності проводили корекцію вмісту кров'яних пластинок шляхом розведення ПБТ безтромбоцитарною плазмою) та її оптична густина (світлопропускання ПБТ у відносній шкалі приладу приймалося за 0% агрегації). Після завершення калібрування агрегометра починали вивчення процесу агрегації тромбоцитів під впливом різних індукторів (АДФ, колаген, арахідонова кислота). У кювету до 450 мкл ПБТ додавали 50 мкл розчину індуктора агрегації й фіксували на агрегометрі час додавання. Після ініціації процесу агрегації спостерігали падіння оптичної густини досліджуваного зразка ПБТ, що реєструвалося приладом у вигляді збільшення показника «ступінь агрегації» від 0% і вище (максимум до 100%). При цьому на графіку «ступінь агрегації - час» визначалося 3 показника: рівень максимального підйому кривої (максимальний ступінь агрегації); відповідний їй час (час максимуму) і крутість підйому кривої (швидкість агрегації). Час дослідження кожного зразка становив 10 хвилин.

Результати дослідження впливу внутрішньошлункового введення тіотриазоліну в широкому діапазоні доз (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 і 1000 мг/кг) на АДФ (20 мкмоль/л)-індуковану агрегацію тромбоцитів показали, що зі збільшенням дози препарату величина ефекту, який він чинить, також зростає (табл. 5). При цьому аналіз отриманих даних і побудова кривої залежності «доза - ефект» (фіг. 1) показав, що за даною дією ED<sub>50</sub> тіотриазоліну становить 2,52±0,24 мг/кг. Тому для наступних досліджень була взята доза 2,5 мг/кг.

Аналіз показників агрегатограм виявив, що внутрішньошлункове введення шурам ацетилсаліцилової кислоти (10 мг/кг) та її комбінації з тіотриазоліном (2,5 мг/кг) приводить до достовірного пригнічення агрегації тромбоцитів при використанні всіх основних індукторів (АДФ, колаген і арахідонова кислота). При цьому різні параметри агрегації (максимальний ступінь, час максимуму і швидкість за 30 сек) змінювалися по-різному залежно від індуктора, що застосовувався.

Так, використання в якості індуктора розчину колагену (2 мг/мл) спричиняло достовірне зниження максимального ступеня агрегації на 20,0% (P<0,05) і 36,1% (P<0,05) у тварин, які отримували АСК і комбінований препарат АСК+тіотриазолін відповідно. Час настання максимуму також знижувався на фоні застосування препаратів на 23,1% (P<0,05) і 30,4% (P<0,05) відповідно. Відносно впливу на швидкість агрегації – АСК викликала невелике зменшення цього показника, яке було недостовірним, а комбінація

АСК+тіотриазолін знижувала цей показник на 58,4% (P<0,05).

Використання в якості індуктора агрегації розчину арахідонової кислоти (1 ммоль/л) приводило до зниження основного показника функціональної активності тромбоцитів - ступеня агрегації - на 32,6% (P<0,05) і 40,1% (P<0,05) при застосуванні АСК і АСК+тіотриазоліну відповідно. Комбінований препарат спричиняв уповільнення настання максимуму агрегації на 59,4%, однак ці зміни були недостовірні. Вираженого впливу на швидкість агрегації досліджувані препарати в цьому випадку не чинили.

АДФ може використовуватися в якості індуктора агрегації в різних концентраціях. Так, використання його в більш високій концентрації (20 мкмоль/л) викликає однофазну необоротну агрегацію, яка відбувається з такою силою і швидкістю, що перехід первинної у вторинну фазу агрегації розрізнити неможливо. Під впливом малої концентрації АДФ (5 мкмоль/л) відбувається тільки первинна (оборотна) агрегація з наступною дезагрегацією. При використанні в якості індуктора розчину АДФ (20 мкмоль/л) досліджувані препарати (АСК і АСК+тіотриазолін) спричинювали достовірне зниження максимального ступеня агрегації на 19,8% (P<0,05) і 50,4% (P<0,05) відповідно. Швидкість агрегації також знижувалася на 26,8% (P<0,05) і 35,0% (P<0,05) відповідно. Вплив на час настання максимуму агрегації було недостовірним. При використанні розчину АДФ у меншій концентрації (5 мкмоль/л) АСК практично не чинила впливу на параметри агрегації, в той час як комбінований препарат АСК+тіотриазолін спричиняв достовірне зниження ступеня й швидкості агрегації на 31,5% (P<0,05) і 34,3% (P<0,05) відповідно. Результати досліджень представлені в таблицях 1-3.

#### Приклад 2

Вивчення ульцерогенної дії ацетилсаліцилової кислоти та її комбінації з тіотриазоліном

Принцип методу полягає в макроскопічному дослідженні слизової оболонки шлунків щурів, які отримували препарати на фоні голодування. Досліджувані речовини вводилися внутрішньошлунково один раз на добу починаючи із другого дня голодування (наявність вільного доступу до води та відсутність їжі). Після дворазового введення препаратів (на 2 і 3 день експерименту) тварин декапітували на четвертий день експерименту (через 24 години після останнього введення досліджуваних препаратів), витягували шлунки, розсікали їх по малій кривизні та промивали у фізіологічному розчині для видалення вмісту. Оцінку ульцерогенного ефекту проводили візуально за кількістю виразкових дефектів, що відображалось в балах і виразковому індексі (ВІ).

Була використана 4-х бальна шкала для оцінки ступеня ураження слизової оболонки шлунка:

0 - відсутність змін;

1 - ерозія;

2 - одиничні виразки;

3 - множинні виразки;

4 - проривні виразки.

ВІ обчислювали за формулою:

$$BI = \frac{\Sigma \text{ балів у групі} + \text{кількість щурів з виразками} + \Sigma \text{ кількість виразок у групі}}{\text{кількість тварин у групі}}$$

Групи тварин, які отримували препарати (у кожній групі по 6 тварин)

- 1 - ацетилсаліцилова кислота (10 мг/кг);
- 2 - ацетилсаліцилова кислота (10 мг/кг) + тіотриазолін (2,5 мг/кг);
- 3 - фізіологічний розчин в адекватній кількості (контрольна група);
- 4 - повноцінне харчування, препарати не вводились.

Результати досліджень представлені в таблиці 4.

#### Приклад 3

Дослідження впливу комбінації препаратів на активність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ)

Інтенсивність процесів вільно-радикального окиснення в структурах мозку (стовбур, гіпокамп, кора) і сироватці крові білих нелінійних щурів оцінювали за накопиченням продуктів - дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА). Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю супероксиддисмутази (СОД) і каталази.

Препарати вводили внутрішньошлунково (per os) на 1% крохмальному слизу щодня протягом 5 днів у дозах, зазначених у таблицях 6 і 7. У кожній групі використовувалось по 6 тварин.

Через 60 хв після останнього введення препаратів тварин піддавали атравматичній фіксації та моментальній декапітації. Окремо виділяли й аналізували наступні ділянки головного мозку: кора, гіпокамп, стовбур. Заморожені в азоті тканини мозку гомогенізували у порцелянових ступках. Після центрифугування при температурі 4°C і 15000g супернатант зливали у чисті пробірки. Визначення активності СОД проводили за методом Чеварі С. і соавт. по конкуренції з нітросинім тетразолієм у системі аеробної взаємодії НАДН і фенозінметансульфату. Активність каталази ви-

значали спектрофотометрично за зменшенням концентрації перекису водню. Вміст ДК визначали спектрофотометрично в гептановій фазі після їхньої екстракції сумішшю гептан-ізопропіловий спирт. Вміст ТБК-залежних продуктів (МДА) визначали спектрофотометрично за реакцією з тіобарбітуровою кислотою.

Аналіз отриманих результатів показав, що як тіотриазолін, так і ацетилсаліцилова кислота чинять антиоксидантну дію. Роздільне введення цих препаратів приводило до зменшення кількості МДА і ДК, та збільшення активності СОД і каталази. При цьому тіотриазолін чинив набагато більш виражену дію в порівнянні з АСК. Остання переважно знижувала рівень МДА й збільшувала активність СОД, менше впливаючи на ДК і каталазу.

Комбіноване введення щурам тіотриазоліну й АСК приводило до взаємного посилення їх ефектів. При цьому в сироватці крові рівень МДА й ДК знижувався на 50,4% (P<0,05) і 40,6% (P<0,05), а активність СОД і каталази збільшувалася на 68,8% (P<0,05) і 36,4% (P<0,05) відповідно в порівнянні з контрольною групою. Дані зміни показників активності процесів ПОЛ також достовірно відрізнялися від результатів, отриманих у групі АСК, що свідчить про більш високу антиоксидантну активність комбінованого препарату. Результати, отримані при дослідженні активності процесів ПОЛ в структурах головного мозку, підтверджують виявлені раніше закономірності. На фоні введення комбінованого препарату в стовбурі, гіпокампі й корі достовірно зменшувалися рівні МДА й ДК, та зростала активність СОД і каталази.

Результати досліджень представлені в таблицях 6 і 7.

Таблиця 6

Вплив тіотриазоліну, ацетилсаліцилової кислоти та їх комбінації на показники перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у сироватці крові щурів

Групи	Показники	МДА, нмоль/мг біл.	ДК, нмоль/мг біл.	СОД, у.о./мг біл./хв	Каталаза, мкат/мг біл./хв
Контроль (інтактні тварини) (n=6)	M±m	1,15±0,09	2,44±0,16	0,96±0,07	87,4±6,58
Тіотриазолін, 2,5мг/кг (n=6)	M±m %	0,65±0,08 -43,5*	1,53±0,17 -37,3*	1,45±0,12 +51,0*	108,7±9,64 +24,4*
Ацетилсаліцилова кислота, 10 мг/кг (n=6)	M±m %	0,88±0,07 -23,5*	2,08±0,25 -14,8	1,27±0,11 +32,3*	95,1±10,22 +8,8
Ацетилсаліцилова кислота, 10 мг/кг + Тіотриазолін, 2,5мг/кг (n=6)	M±m %	0,57±0,07 -50,4*/**	1,45±0,15 -40,6*/**	1,62±0,15 +68,8*/**	119,2±9,94 +36,4*/**

Примітка: В таблиці змін показників приведені у відсотках від контрольної групи, які прийняті за 100%.

(+) - збільшення, (-) - зменшення.

\* - відмінності достовірні по відношенню до контрольної групи ( $P < 0,05$ );

\*\* - відмінності достовірні по відношенню до групи АСК, 10 мг/кг ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 7

Вплив тіотриазоліну, ацетилсаліцилової кислоти та їх комбінації на показники перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в структурах головного мозку щурів

Групи	Структура мозку	Показники	МДА, нмоль/мг біл.	ДК, нмоль/мг біл.	СОД, у.о./мг біл./хв	Каталаза, мкат/мг біл./хв
Контроль (інтактні тварини) (n=6)	стовбур	$M \pm m$	$2,94 \pm 0,18$	$5,08 \pm 0,43$	$0,34 \pm 0,04$	$44,5 \pm 3,97$
	гіпокамп	$M \pm m$	$2,58 \pm 0,14$	$4,56 \pm 0,38$	$0,25 \pm 0,02$	$39,2 \pm 2,78$
	кора	$M \pm m$	$2,71 \pm 0,20$	$4,97 \pm 0,41$	$0,31 \pm 0,03$	$44,8 \pm 2,56$
Тіотриазолін, 2,5 мг/кг (n=6)	стовбур	$M \pm m \%$	$1,82 \pm 0,14 - 38,1^*$	$3,41 \pm 0,36 - 32,9^*$	$0,51 \pm 0,04 + 50,0^*$	$57,2 \pm 5,11 + 28,5^*$
	гіпокамп	$M \pm m \%$	$1,74 \pm 0,15 - 32,6^*$	$3,23 \pm 0,29 - 29,2^*$	$0,45 \pm 0,04 + 80,0^*$	$51,3 \pm 4,85 + 30,9^*$
	кора	$M \pm m \%$	$1,76 \pm 0,16 - 35,1^*$	$3,48 \pm 0,31 - 30,0^*$	$0,53 \pm 0,05 + 71,0^*$	$60,5 \pm 5,31 + 35,0^*$
Ацетилсаліцилова кислота, 10 мг/кг (n=6)	стовбур	$M \pm m \%$	$2,21 \pm 0,19 - 24,8^*$	$4,29 \pm 0,51 - 15,6$	$0,45 \pm 0,06 + 32,6^*$	$49,9 \pm 6,35 + 12,1$
	гіпокамп	$M \pm m \%$	$2,04 \pm 0,15 - 20,9$	$4,13 \pm 0,48 - 9,4$	$0,31 \pm 0,04 + 24,0^*$	$44,5 \pm 5,72 + 13,5$
	кора	$M \pm m \%$	$2,10 \pm 0,22 - 22,5$	$4,18 \pm 0,53 - 15,9$	$0,39 \pm 0,05 + 25,8^*$	$50,2 \pm 5,01 + 12,1$
Ацетилсаліцилова кислота, 10 мг/кг + Тіотриазолін, 2,5 мг/кг (n=6)	стовбур	$M \pm m \%$	$1,45 \pm 0,09 - 50,7^{**}$	$3,17 \pm 0,28 - 37,6^{**}$	$0,72 \pm 0,05 + 111,8^{**}$	$61,8 \pm 5,23 + 38,9^{**}$
	гіпокамп	$M \pm m \%$	$1,31 \pm 0,11 - 49,2^{**}$	$2,97 \pm 0,32 - 34,9^{**}$	$0,55 \pm 0,03 + 120,0^{**}$	$59,5 \pm 4,78 + 51,8^{**}$
	кора	$M \pm m \%$	$1,32 \pm 0,11 - 51,3^{**}$	$3,08 \pm 0,24 - 38,0^{**}$	$0,58 \pm 0,03 + 87,1^{**}$	$63,7 \pm 4,95 + 42,2^{**}$

Примітка: В таблиці зміни показників приведені у відсотках від контрольної групи, які прийняті за 100%.

(+) - збільшення, (-) - зменшення.

\* - відмінності достовірні по відношенню до контрольної групи ( $P < 0,05$ );

\*\* - відмінності достовірні по відношенню до групи АСК, 10 мг/кг ( $P < 0,05$ ).

Отримані результати, аналіз ефективності запропонованої комбінації й препарату порівняння (прототипу) свідчать, що запропонована комбінація чинить більш виражену антиагрегантну й антиоксидантну дію, її використання дозволяє знизити частоту прояву небажаних ефектів проведеної фармакотерапії.

Заявлений об'єкт - комбінація класичного антиагрегантного засобу ацетилсаліцилової кислоти й антиоксидантного препарату тіотриазоліну – в умовах експериментальної медицини сприяє більш сильному пригніченню агрегації тромбоцитів.

Технічний результат, який досягається при використанні винаходу, визначається посиленням ефектів ацетилсаліцилової кислоти при використанні її комбінації з тіотриазоліном. Використання запропонованої комбінації в одній лікарській формі зменшує вартість лікування, а також підвищує комплаєнс (схильність хворих до лікування) завдяки спрощенню введення й дотриманню режиму приймання.

Таким чином, розроблене вирішення завдання відповідає винахідницькому рівню й відповідає умові «промислова придатність», що дозволяє кваліфікувати його як винахід України.

