



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58565 (13) C2

(51) 7 A61K31/194, A61K31/455,  
A61K31/525, A61P39/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ІН'ЕКЦІЙНИЙ ЛІКУВАЛЬНИЙ ЗАСІБ "ЦИТОФЛАВИН", ЯКИЙ МАЄ ЦИТОПРОТЕКТОРНУ ДІЮ

1

2

(21) 2000052863

(22) 19 05 2000

(24) 15 08 2003

(31) 199900510/26

(32) 10 06 1999

(33) EA

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р

(72) Алексеева Людмила Євгенівна, RU, Ко-

валенко Алексей Леонідович, RU

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ

ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ НАУКОВО-ТЕХНОЛОГІЧНА

ФАРМАЦЕВТИЧНА ФІРМА "ПОЛІСАН", RU

(56) US 5895652 20 04 99

RU 2006224 30 01 94

GB 1178984 28 01 70

(57) Ін'екційний лікарський засіб, який має цитопротекторну дію, що містить активну композицію при-

родних метаболітів та коферментів у розчиннику, який відрізняється тим, що як природні метаболіти містить янтарну кислоту та рибоксин (інозин), як коферменти - нікотинамід і рибофлавін-5-мононуклеотид натрію, як розчинник - воду для ін'єкцій, а також додатково містить натрію підроокис та N-метилглюкамін при такому співвідношенні компонентів, мас, %

янтарна кислота	9,5±10,5
рибоксин (інозин)	1,9±2,1
нікотинамід	0,95±1,05
рибофлавін-5-мононуклеотид	
натрію	0,19±0,21
натрію підроокис	3,3±3,7
N-метилглюкамін	15,7±17,3
вода для ін'єкцій	до 100

Винахід належить до медицини, зокрема до комплексного лікарського ін'екційного препарату, що має цитопротекторну дію

Препарат може бути використаний для лікування гострого інфаркту, ішемії головного мозку, гіпоксичного інсульту, коронарної недостатності, ішемічної хвороби серця, захворювань печінки та нирок

Відома велика кількість різних фармакологічних активностей янтарної кислоти, її солей - сукцинатів та похідних

Серед них - антигіпотензивний засіб на основі сукцинату янтарної кислоти для лікування внутрішньоутробної патології плода, що зв'язана з гіпоксією та інфекцією (патент Росії 2056842, МПК А61К 1/19, 30 06 92, гепатопротекторний засіб на основі похідних янтарної кислоти (патент Японії 09/188 664, МПК C07C 323/51, 22 07 97), лікарський засіб для лікування ішемії мозку на основі сукцинату янтарної кислоти (патент Росії 2108095, МПК А61К 31/19, 22 11 94)

Проте в списку дозволених до медичного використання та впроваджених у медичну практику лікарських засобів, що містять янтарну кислоту як основний активний компонент, є єдина лікарська форма - таблетки "Лимонтар" (0,2г вільної янтар-

ної кислоти та 0,05г лимонної кислоти), які застосовують у дорослих як діагностичні засоби для дослідження секреторної здатності шлунка (Машковский МД Лекарственные средства, т 2, — изд 13-ое, Харьков, "Торсинг", 1997, с 494)

Широкий спектр фармакологічної активності янтарної кислоти обумовлено тим, що вона є природним метаболітом організму, беручи участь в окислювально-відновному циклі дикарбонових кислот (цикл Кребса) і забезпечуючи тим самим нормальну життєдіяльність клітини

Відомо також комплексні препарати на основі природних пуринових нуклеозидів, наприклад, інозин (рибоксин), гуанозин, аденозин, що використовуються як лікарські засоби вузькоспрямованої дії, або кардіопротекторної (патент Росії 1769428, МПК А61К 31/70, 09 04 90, патент Росії 2035908, МПК А61К 31/52, 24 09 91), або гепатопротекторної дії (патент Японії 61,277619, МПК А61К 31/505, 04 01 85)

Найбільш близьким до лікарського засобу, що заявляється, є ін'екційний лікарський препарат вузько спрямованої гепатопротекторної дії, який містить у своєму складі суміш метаболітів та вітамінів (патент Великобританії 1178984, МПК А61К 25/00, 23 06 86) такого складу

(13) C2

(11) 58565

(19) UA

Кальцієва сіль 1-L-5-	
форміттетрагідрофолієвої кислоти	0,9мг
Гідроксикобаламіну гідрохлорид	0,5мг
Ціанкобаламін	0,5мг
Рибоксин	60,0мг
Аденін	20,0мг
Нікотинамід	10,0мг
Рибофлавін-5-мононуклеотид натрію	2,73мг
Решта дистильована стерильна вода для ін'єкцій	до 3,0г

Проте при тяжких патологіях виникає потреба в комплексних лікарських препаратах, що захищають уражену клітину та одночасно нормалізують її життєдіяльність.

При різних патологічних процесах в організмі нормальна життєдіяльність клітин порушується, що виявляється погіршенням дихальної (окислювально-відновної) функції клітин, зменшенням або припиненням синтезу білків і ферментів клітиною, іншими порушеннями. Остаточні ці порушення призводять до ушкодження клітинних мембран, зниження рівня утилізації метаболітів, загибелі клітин.

Тому створення комплексних лікарських препаратів, які захищають клітину від руйнування та загибелі та сприяють її нормальній життєдіяльності, так званих цитопротекторів, є актуальною і важливою задачею.

Такі препарати повинні містити як речовини, що сприяють посиленню метаболічних процесів, так і компоненти, що сприяють швидкій та ефективній утилізації метаболітів в клітинах уражених органів і тканин.

В зв'язку з цим заявник розробив комплексний препарат, що має цитопротекторну дію, до складу якого включено як компоненти метаболічної природи (янтарна кислота і рибоксин), так і коферментні компоненти - вітаміни (нікотинамід та рибофлавін-5-мононуклеотид натрію), при такому співвідношенні компонентів, мас %

Янтарна кислота	9,5 ÷ 10,5
Рибоксин(інозін)	1,9 ÷ 2,1
Нікотинамід	0,95 ÷ 1,05
Рибофлавін-5-мононуклеотид натрію	0,19 ÷ 0,21
Натрію пірооксис	3,3 ÷ 3,7
N-метилглюкамін	15,7 ÷ 17,3
вода для ін'єкцій	до 100

Приклад конкретного отримання "Цитофлавіну" для ін'єкцій

У скляний апарат з мішалкою ємністю 100л завантажують 50,0л води для ін'єкцій, 10,0кг янтарної кислоти, 3,4кг ідоного натрію, 0,6кг рибофлавіну-5-мононуклеотиду натрію, 16,5кг N-метилглюкаміну, 1,0кг нікотинамиду, 2,0кг рибоксину. Одержану суміш перемішують до повного розчинення компонентів і потім додають воду для ін'єкцій до отримання об'єму 100л. Одержаний розчин фільтрують крізь стерилізуючий фільтр типу "Папп", розливають у стерильні ампули об'ємом 5мл та запакують. Отримують 18000 ампул

об'ємом 5мл. Вихід 90%.

Кожна ампула містить - янтарної кислоти 500мг (10%), рибоксину 100мг (2%), рибофлавіну-5-мононуклеотиду натрію 10мг (0,2%), натрію пірооксису 170мг (3,4%), N-метилглюкаміну 825мг (16,5%), води для ін'єкцій до 100%.

Використання даного лікарського засобу дозволило отримати високий цитопротекторний ефект на різних моделях пошкодження клітин при патології серця, печінки та нирок.

Вивчення цитопротекторної активності препарату

Вивчення лікарського засобу, що заявляється, проводили в порівнянні з прототипом.

Дослід 1. Вивчення кардіопротекторної дії на моделі антиаритмічної активності.

Враховуючи, що аритмія є одним з перших показників розвитку патології клітин міокарду при різних серцево-судинних захворюваннях, які супроводжуються ушкодженням клітин міокарду, таких як гострий інфаркт міокарду та ішемічна хвороба серця, для оцінки цитопротекторної дії "Цитофлавіну" на клітини міокарду видавалося необхідним вивчити та оцінити перш за все антиаритмічну активність лікарського засобу, що пропонується.

Дослід проводили на лінійних білих мишах СВА, яких було поділено на п'ять груп по 25 тварин.

Експериментальну аритмію серця моделювали загальноприйнятим методом - введенням алкалоїду аконітину підшкірно в разовій дозі 200мг/кг маси тварини та пропранолу підшкірно в разовій дозі 40мг/кг.

Введення алкалоїду аконітину в організм викликає стійке підвищення натрієвої проникності мембран кардіоміоцитів (Орлов Б.Н. Ядовитые животные и растения СССР — М — Высшая школа, 1990, с. 192 - 194).

Введення пропранолу, викликає брадикардію серця за рахунок блокади β-адренорецепторів у міокарді та зміни внутрішньоклітинного співвідношення іонів калію і натрію (Working Group on Arrhythmias-Circulation — 1991, V 84, № 4, p 1831 - 1851).

"Цитофлавін", прототип і контроль - 0,9% ізотонічного розчину хлориду натрію вводили внутрішньовенно в хвостову вену в разовій дозі 1,2мл/кг маси тварини, одноразово за п'ять хвилин до введення аконітину або пропранолу. Запис електрокардіограми у мишей проводився на початку дослідження, а далі - через 10, 30 та 60 хвилин після введення препаратів.

Для визначення часу виникнення та тривалості екстрасистолії під час дослідження проводився моніторинг електрокардіограми протягом 60 хвилин.

Отримані експериментальні дані були оброблені статистично з використанням критерію Ст'юдента при  $P < 0,05$ .

Дані по випробуванню антиаритмічної активності препаратів наведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив розчину "Цитофлавін" і прототипу на аконтинову та пропранолову аритмію у мишей

Препарат, який використано у досліді	Число мишей з екстрасистолею, %	Латентний період до екстрасистоли, хвил	Тривалість екстрасистоли, хвил	Число екстрасистоли
Аконтин	100,0	32,0 ± 2,8*	19,6 ± 1,3*	306 ± 14*
Аконтин + "Цитофлавін"	25,0	21,3 ± 1,7*	11,4 ± 1,5*	127 ± 11*
Аконтин + прототип	75,0	29,6 ± 2,2*	19,2 ± 1,1	312 ± 15*
Пропранол	100,0	18,6 ± 1,4*	10,4 ± 1,1*	359 ± 23*
Пропранол + "Цитофлавін"	40,0	13,2 ± 1,2*	6,2 ± 1,0*	112 ± 9*
Пропранол + прототип	50,0	16,4 ± 1,2*	10,5 ± 1,0*	208 ± 20*

Примітка \* - вірогідність різниць при  $P < 0,05$ 

При моделюванні аконтинової аритмії введення аконтину викликало полігонну екстрасистолію у 100% тварин (див. Табл. 1).

При введенні "Цитофлавіну" в дозі 1,2 мл/кг за 5 хвил до введення аконтину екстрасистолія розвивалася лише у 25% мишей, при цьому період екстрасистоли зменшився на 35%, а саме, число екстрасистол зменшилося в 2,4 рази.

Таким чином, "Цитофлавін" проявив виявлену цитопротекторну антиаритмічну дію на клітини міокарду на моделі антиінгитинової аритмії. Враховуючи механізм дії алкалоїду аконтину, механізм захисної дії "Цитофлавіну" обумовлено стабілізацією мембран клітин кардіоміоцитів та зниженням їх проникності для іонів натрію.

Навпаки, при введенні розчину прототипу за 5 хвил до введення аконтину розвивалася цілком протилежна картина екстрасистолія спостерігалася у 75% мишей, а латентний період, тривалість та загальне число екстрасистол взагалі не змінилися в порівнянні з аконтином.

Таким чином, прототип проявляв слабо виражену захисну антиаритмічну активність на клітини міокарду на моделі антиінгитинової аритмії та не мав на даній моделі стабілізуючої дії на клітини кардіоміоцитів.

При аритмії, що викликана введенням пропранолу, полігонна екстрасистолія також викликала у 100% мишей.

При попередньому введенні "Цитофлавіну" в дозі 1,2 мл/кг у хвостову вену за 5 хвил до введення пропранолу екстрасистолія розвивалася у 40% тварин, при цьому латентний період екстрасистоли зменшився на 29%, а загальне число екстрасистол зменшилося в 3,2 рази. Отримані дані свідчать про високий цитопротективний ефект "Цитофлавіну" на клітини міокарду на моделі аритмії, яка викликана введенням пропранолу. Механізм захисної дії обумовлено нормалізацією біохімії натрій/калієвого обміну крізь мембрану клітини.

При введенні розчину прототипу полігонна екстрасистолія виявлялася у 50% мишей, латентний період екстрасистоли практично не змінився, а середнє число екстрасистол зменшилося тільки в 1,7 рази (Табл. 1). Це свідчить про помірну захисну дію прототипу на клітини міокарду.

Таким чином, на моделі пропранолової аритмії "Цитофлавін" також проявляє виражену цитопротекторну антиаритмічну дію, а розчин-прототип має тільки слабкий захисний антиаритмічний ефект.

Така різниця пояснюється створенням оптимальної комбінації природних метаболітів - янтарної кислоти (енергетичний компонент), рибоксину (субстрат для синтезу АТФ) та коферментів-вітамінів для одержання цитопротекторного ефекту. Внаслідок прискорення засвоєння клітинами організму метаболітів виникає прискорення біохімічних процесів всередині клітини та здійснюється протекторна дія на клітини міокарду - кардіоміоцити.

Дослід 2. Вивчення кардіопротекторної дії на моделі ішемії міокарду.

Ішемія (нестача кисню) в клітинах міокарду призводить до порушення біохімічних процесів всередині кардіоміоцитів, що зв'язані зі споживанням енергії з наступним некрозом (руйнуванням) клітинної мембрани.

Дослідження протиішемічної активності "Цитофлавіну" в порівнянні з розчином-прототипом проводили на білих лінійних щурах породи Вистар. Усі тварини були поділені на три групи по 25 голів.

Для досліджень використовували загальноприйнятну модель ішемії, що викликана оклюзією (хірургічним зменшенням діаметра судини - перев'язкою) лівої коронарної артерії (Winslow E. Methods for the detection and assessment of antiarrhythmic activity / Pharmacology and therapy — 1984 V 84, p 401 - 433).

Дана модель найкраще ілюструє розвиток гострого інфаркту міокарду в людини.

Щурів наркотизували внутрішньочеревинним введенням етаміналу натрію в дозі 50 мг/кг, фіксували та здійснювали реєстрацію електроекскадіограми.

Щурів з порушенням ритму із дослідів виводили. Всього було відібрано 36 щурів, розділених на три групи по 12 тварин.

У тварин, що лишилися, катетеризували стегову вену та стегову артерію. Потім при штучній вентиляції легким щурам розкривали грудну клітку та перев'язували низхідну гілку лівої коронарної

артерії у нижнього краю вушка лівого передсердя. У всіх тварин реєстрували середній артеріальний тиск у стегновій артерії за допомогою ртутного манометра та здійснювали 30-хвилинне моніторування електрокардіограми для виявлення ранніх шлункових аритмій, що розвиваються на фоні ішемії міокарду.

Першій групі тварин вводили "Цитофлавін" у хвостову вену в дозі 1,2 мл/кг через п'ять хвилин після перев'язки.

Другій групі вводили розчин прототипу в дозі 1,2 мл/кг.

Третій контрольній групі вводили в хвостову вену 0,9% фізіологічного розчину хлориду натрію в дозі 1,2 мл/кг.

Протягом всього дослідження продовжували штучну вентиляцію легенів з метою профілактики зупи-

нки дихання, що викликається постопераційним пневмотораксом. За даними електрокардіограми оцінювали частоту серцевих скорочень, середній артеріальний тиск, частоту виникнення та сумарну тривалість періодів фібриляції та шлункової тахікардії.

Ефективність препаратів по загальнозахисній цитопротекторній дії на клітини організму оцінювали за летальністю в кожній групі.

Протягом всього дослідження у всіх тварин реєстрували артеріальний тиск у стегновій вені та знімали електрокардіограму через 1, 5, 15, 30, 45 і 60 хвилин від початку введення розчинів у хвостову вену.

Статистичну значимість оцінювали за допомогою критерію Стюдента. Узагальнені дані по експерименту наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

## Протиішемічний ефект "Цитофлавіну"

Розчин* препара- тів	Число шлункових екстрасистол	Тахікардія		Фібриляція шлуночків	
		Частота, %	Тривалість, сек*	Частота виникнення порушень, %	Тривалість, сек*
"Цитофлавін"	137 ± 12*	100	42 ± 3*	40	28 ± 5
Прототип	221 ± 15*	100	90 ± 7*	60	27 ± 3
Контроль	359 ± 24*	100	127 ± 23*	86	28 ± 4

Примітка \* - вірогідність різниць при  $P < 0,05$

Результати дослідження протиішемічної активності "Цитофлавіну" показали, що при ішемії серця препарат вірогідно в 2,62 рази знижує кількість шлуночкових екстрасистол у порівнянні з контролем та в 1,6 рази в порівнянні з прототипом.

Тривалість тахікардії зменшилася в 3 рази в порівнянні з контролем та в 2,1 рази в порівнянні з прототипом, хоча частота виникнення тахікардії не зменшилася в усіх випадках.

"Цитофлавін" також вірогідно зменшив частоту фібриляції шлуночків у 2,2 рази в порівнянні з контролем та в 1,5 рази в порівнянні з прототипом,

хоча практично не впливав на тривалість часу фібриляції. Отримані дані свідчать про високу цитопротекторну активність "Цитофлавіну" на клітини міокарду за умов ішемії.

Дані по виживанню тварин в умовах експерименту також свідчать про високу цитопротекторну активність "Цитофлавіну", при введенні якого після операції перев'язки вижило 100% (12 щурів), при введенні прототипу - 50% (6 щурів), а при введенні контрольного фізіологічного розчину - лише 25% (3 щури) (див. Таблицю 3).

Таблиця 3

## Вплив "Цитофлавіну" на виживання тварин в умовах виникнення ранніх постішемічних аритмій

Препарат	Кількість прооперованих щурів	Вживання після 60 хвилин ішемії міокарду	
		Кількість	%
"Цитофлавін"	12	12	100
Прототип	12	6	50
Контроль	12	3	25

Моніторинг середнього артеріального тиску та частоти серцевих скорочень (див. Таблицю 4) показали, що "Цитофлавін" швидше за прототип відновлював середній артеріальний тиск у ранньому періоді після оклюзії, практично не впливаючи на частоту серцевих скорочень. Такий ефект свідчить

про більш виражену компенсаторну дію "Цитофлавіну" в порівнянні з контролем та з прототипом у відновленні біохімічних процесів, що відбуваються в клітинах при ішемії кардіоміцитів, і, отже, про загальну цитопротекторну дію на міокард.

Таблиця 4

Вплив "Цитофлавіну" на середній артеріальний тиск (САТ) та частоту серцевих скорочень (ЧСС) за умов виникнення ранніх постішемичних аритмій

Показник	Препарат	Час ішемії міокарду, хв					
		0	5	15	30	45	60
САТ у % до початкового	"Цитофлавін"	100	57 ± 12	67 ± 2*	72 ± 4*	73 ± 1*	73 ± 4*
	Прототип	100	45 ± 8	59 ± 5*	65 ± 7*	67 ± 6*	73 ± 7*
	Контроль	100	31 ± 5	44 ± 5*	53 ± 9	68 ± 12	73 ± 6*
ЧСС у % до початкового	"Цитофлавін"	100	94 ± 12	93 ± 6*	95 ± 8*	95 ± 8*	96 ± 8*
	Прототип	100	92 ± 16	90 ± 6*	86 ± 5*	84 ± 6*	82 ± 5*
	Контроль	100	85 ± 7	83 ± 4*	82 ± 5*	80 ± 6*	75 ± 8*

Примітка \* - вірогідність різниць при  $P < 0,05$

Дослід 3 Дослідження гепатопротекторної та реопротекторної активності "Цитофлавіну" при отруєнні етиленгліколем

Для моделювання уражених клітин печінки та нирок використали загальновідому модель токсичного гепатиту та нефрозо-нефриту - отруєння 1,2-етиленгліколем (Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований Под ред НВ Лазарева М «Медгиз», 1964, 392с )

У досліді було сформовано 6 експериментальних груп тварин по 12 щурів-самок А - інтактні тварини, яким вводили фізіологічний розчин, Б - інтактні тварини, яким вводили «Цитофлавін», В - інтактні тварини, яким вводили прототип, Г - тварини з інтоксикацією етиленгліколем без лікування, Д - тварини з інтоксикацією та лікуванням «Цитофлавіном», Е - тварини з інтоксикацією етиленгліколем та лікуванням прототипом

Етиленгліколь вводили одноразово внутрішньощуноково кризь атравматичний зонд у дозі 1,5г/кг «Цитофлавін», прототип та фізіологічний розчин у контролі вводили в хвостову вену щурів один раз на добу протягом п'яти днів у дозі 1,2мл/кг Біологічні дослідження проводили за стандартними методиками (Стальная ИД, Гаришвилл ТГ Современные методы в биохимии М Медицина, 1978 95с, Клиническая оценка лабораторных тестов / Под ред НУ Тица, М Медицина, 1986, 480с) Отримані експериментальні дані обробляли статистичними методами за Стюдентом - Фішером

Клінічна картина в групі щурів, що отримали

етиленгліколь без лікування, характеризувалася гіподинамією, загальмованістю реакцій, скуйовдженістю шерсті та неохайністю тварин На 2-ий день у них розвилася макрогематурія, а з 4-го дня - олігурія Біохімічний і гістологічний аналіз печінки та нирок підтвердив розвиток ураження нирок і печінки - нефрозо-нефриту та токсичного гепатиту

Інтоксикація етиленгліколем порушувала всі функції печінки білковосинтезуючу та пігментну, що супроводжувалося біохімічними ознаками цитолізу

У всіх тварин без винятку розвивалися виражені симптоми ураження нирок в аналізі сечі визначалися еритроцити, білок, циліндри, кристали щавлевого кальцію, клітини ниркового епітелію Страждали всі функції нирок - видільна, екстраторна та секреторна, а в крові наростали продукти азотистого обміну, показники цитолізу

При морфологічному обстеженні в нирках виявлялися дегенеративні зміни та дрібні кровоивибли в паренхімі органів, спостерігалася жирова дистрофія нейроепітелію, в цитоплазмі клітин звитих канальців було видно краплі жиру

Гепатопротекторну ефективність "Цитофлавіну" в порівнянні з прототипом висновували за клінічною картиною, вмістом загального білірубину, аланін-амінотрансферази (АЛТ), аспартат-амінотрансферази (АСТ), лужної фосфатази, загального білка, ліпідів сироватки, глікогену, глутатіону в печінці та навантажувальною пробою - гексеназовим тестом

Експериментальні дані по гепатопротекторній дії "Цитофлавіну" наведені в Таблиці 5

Таблиця 5

Гепатопротекторний ефект "Цитофлавіну" в порівнянні з прототипом

Показники	Експериментальні групи					
	А фіз розчин	Б Цитофлавін	В Прототип	Г Без лікування	Д Цитофлавін	Е Прототип
Загальний білок, г/л	64 ± 2	65 ± 5	64 ± 6	40 ± 4*	58 ± 4*	46 ± 5*
Загальні ліпіди, г/л	3,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,0 ± 0,3*	3,4 ± 0,1*	3,4 ± 0,1*
АСТ, мкат/л	0,60 ± 0,05	0,60 ± 0,06	0,60 ± 0,06	0,99 ± 0,12*	0,73 ± 0,06*	0,88 ± 0,12*
ЩФ, мкат/л	0,69 ± 0,11	0,69 ± 0,12	0,69 ± 0,11	2,65 ± 0,24*	0,73 ± 0,04*	0,96 ± 0,14*

Продовження таблиці 5

Показники	Експериментальні групи					
	А фіз розчин	Б Цитофлавін	В Прототип	Г Без лікування	Д Цитофлавін	Е Прототип
КФ, мкат/л	0,74 ± 0,12	0,75 ± 0,11	0,73 ± 0,12	1,99 ± 0,20*	0,72 ± 0,04*	0,96 ± 0,11*
Тимолова проба, од	1,46 ± 0,04	1,48 ± 0,03	1,43 ± 0,12	5,77 ± 0,26*	1,56 ± 0,12*	2,88 ± 0,13*
АЛТ, мкат/л	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,25 ± 0,04	1,68 ± 0,11*	0,32 ± 0,06*	0,52 ± 0,08*
Глутатіон печінки, мг %	160 ± 5	155 ± 5	170 ± 12	70 ± 10*	130 ± 10*	100 ± 10*
Глікоген печінки, мг %	2500 ± 100	2400 ± 90	2460 ± 110	850 ± 80*	2000 ± 150*	1800 ± 200
Гексеналовий сон, хвил	25,0 ± 1,5	26,0 ± 1,8	24,0 ± 1,6	46,5 ± 2,5*	27,0 ± 1,5*	35,2 ± 1,0*
Загальний білірубін	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,1	3,2 ± 0,2	6,8 ± 0,4*	3,2 ± 0,2*	4,2 ± 0,1*
	інтактні тварини			Дослідні тварини		

Примітка \* - вірогідність різниць при  $P < 0,05$ 

АСТ - аспартат-амінотрансфераза

ЩФ - лужна фосфатаза

КФ - креатин фосфат

АЛТ - аланін-амінотрансфераза

Досліди показали, що введення "Цитофлавіну" та прототипу здоровим тваринам (групи А, Б, В) не викликало порушень функцій печінки та поведінкових реакцій щурів

Введення етиленгліколю (група Г) супроводжувалося серйозним порушенням усіх функцій печінки

Зниження загального білка та ліпідів і запасу глікогену в печінці свідчить про порушення білковосинтезуючої функції печінки

Наростання рівня амінотрансфераз, лужної фосфатази, білірубину та тименової проби свідчить про значне руйнування клітин печінки - гепатоцитів та про порушення пігментної функції

Збільшення часу гексанового сну, зниження рівня відновлюваного глутатіону і креатинфосфату показує зменшення детоксикуючої функції печінки

Використання "Цитофлавіну" для лікування ураження печінки, викликаного етиленгліколем (група Д), показало вірогідну нормалізацію усіх функцій печінки білковосинтезуючої (загальний білок, ліпіди, глікоген) до 80 - 91% від норми, піг-

ментної (білірубін, амінотрансферази, лужна фосфата, тимолова проба) до 62 - 97% від норми, детоксикуючої (гексеналовий сон, глутатіон, креатинфосфат) на рівень 82 - 97% від норми (група А)

Лікування прототипом (група Е) також мало позитивний ефект після отруєння етиленгліколем, проте прототип відновлював білковосинтезуючу функцію печінки на 60 - 90%, пігментну - на 68 - 71%, а детоксикуючу - всього на 50 - 70%

Таким чином, "Цитофлавін" має виражену цитопротекторну дію на клітини печінки - гепатоцити при отруєнні етиленгліколем (дивись Таблицю 5)

Ефективність "Цитофлавіну" як ренопротектора (захисту клітин нирок) оцінювали за комплексом біохімічних показників у порівнянні з нормою, контрольною групою та прототипом відносною масою нирок, добовим діурезом, білком сечі, хлоридами сечі, цукром сечі, сечовиною, креатиніном, лактатдегідрогеназом

Експериментальні дані по ренопротекторній дії "Цитофлавіну" наведені в Таблиці 6

Таблиця 6

Ренопротекторний ефект "Цитофлавіну" в порівнянні з прототипом,  $M \pm m$ 

Показники	Експериментальні групи					
	А фіз розчин	Б цитоплавін	В Прототип	Г на лікуванні	Д Цитофлавін	Е Прототип
Маса тіла, г	184 ± 6	183 ± 7	188 ± 11	154 ± 11*	181 ± 11	160 ± 11
Відносна маса нирок, г	7,9 ± 0,9	7,8 ± 1,2	7,7 ± 1,0	11, 2 ± 1,5*	8,4 ± 0,7	10,8 ± 1,1
Добовий діурез, мл	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,5 ± 0,4	1,9 ± 0,3*	2,8 ± 0,4*	1,9 ± 0,5
Білок сечі, мг/мл	4,4 ± 0,5	4,5 ± 0,4	4,5 ± 0,4	12,4 ± 1,3*	6,0 ± 0,6*	8,7 ± 0,8*
Хлориди сечі, мг/мл	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,4	4,0 ± 0,3	1,2 ± 0,3*	3,3 ± 0,3*	2,5 ± 0,4*

Продовження таблиці 6

Показники	Експериментальні групи					
	А фіз розчин	Б цитоплавін	В Прототип	Г на лікуван- ні	Д Цитофлавін	Е Прототип
Цукор сечі, моль/л	1,5 ± 0,5	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,1	4,2 ± 0,3*	2,4 ± 0,4	3,0 ± 0,5
Сечовина, моль/л	4,12 ± 0,34	4,22 ± 0,28	4,18 ± 0,32	12,35 ± 0,77*	5,17 ± 0,11*	8,77 ± 0,52*
Щільність сечі	1,02 ± 0,006	1,02 ± 0,005	1,02 ± 0,004	0,91 ± 0,006*	1,02 ± 0,003*	1,00 ± 0,003*
Креатинін, ммоль/л	0,075 ± 0,012	0,0075 ± 0,012	0,073 ± 0,011	0,065 ± 0,08*	0,047 ± 0,04*	0,35 ± 0,09*
Лактатдегідрогена- за, ммоль/год/л	4,90 ± 0,26	4,77 ± 0,33	4,87 ± 0,31	8,08 ± 0,76*	5,85 ± 0,55*	7,93 ± 0,62*
	Інтактні тварини			дослідні тварини		

Примітка \* - вірогідні відзнаки від інтактних тварин при  $P < 0,05$ 

Експериментальні дані показали, що введення як "Цитофлавіну", так і прототипу здоровим тваринам (групи А, Б, В) не виявило негативного впливу на функціональну активність нирок

В умовах патології - отруєння етиленгліколом (група Г) у щурів збільшувалася маса нирок, що свідчить про набряк. Вірогідне збільшення в сечі вмісту білка, хлоридів, цукру, сечовини та збільшення щільності сечі свідчать про порушення екстраторної та секреторної функції нирок. Різде зменшення добового об'єму сечі на фоні підвищення рівня креатину та ферменту лактатдегідрогенази свідчить про порушення клітин ниркових каналців, розвиток нефрозо-нефрити та внаслідок цього - анурії

Використання "Цитофлавіну" (група Д) для лікування ураження нирок, викликаного етиленгліколом, показало відновлення функціональної активності нирок за всіма показниками набряк різко зменшився (маса нирок стала 94% від норми), екстраторна функція (діурез, щільність сечі, креатинін) відновилася на 62 - 100%, секреторна функція (вміст у сечі білка, цукру, хлоридів, сечовини, рівень лактатдегідрогенази) поліпшилася до 62 - 82% від норми

Застосування прототипу (група Е) для лікування також мало позитивний лікувальний ефект при нефро-нефриті, але за різними показниками було менш ефективне, ніж у "Цитофлавіну" маса нирок була 73% від норми, екстраторна функція відновилася на 51 - 93%, а секреторна функція на 45 - 60% від норми (дивись Таблицю 6)

Аналіз гістологічних даних у тварин груп Д та Е також показав зменшення дистрофічних змін у тканині нирок та печінки, яке більш яскраво виражене в групі Д при лікуванні "Цитофлавіном"

Таким чином, "Цитофлавін" виявляє виражений цитопротекторний ефект на клітини нефроепітелію та гепатоцити, який перевищує дію прототипу при експериментальному гепатиті та нефрозо-нефриті, викликаному застосуванням етиленгліколу

Таким чином, вивчення біологічної активності препарату показало, що він має цитопротекторну дію, тобто виявляє захисний ефект на клітини серця та печінки, нормалізуючи роботу цих органів при різних патологіях

Для створення стабільної лікарської форми експериментально підібрані необхідні кількості N-метилглюкаміну та натрію гідроокису. Ці компоненти не є активними компонентами лікарської форми, але забезпечують необхідні фізико-хімічні параметри

Дослід 4. Вивчення впливу вмісту N-метилглюкаміну та гідроокису натрію на стабільність "Цитофлавіну". Враховуючи складний багатокомпонентний склад "Цитофлавіну" та наявність у ньому N-нуклеозиду - рибоксину (інозину) та рибіофлавіну мононуклеотиду, що легко гідролізуються у водних розчинах по N-глікозидному зв'язку в кислотній та лужній середі (Справочник биохимика перевод с англ / Досон Р, Эллит Д, Джонс К — М. МИР, 1991, с 71 - 88, 115), було проведено дослідження впливу вмісту стабілізатора та комплексоутворювача N-метилглюкаміну на рН розчину та стабільність (відсутність розпаду компонентів) при дворічному зберіганні при кімнатній температурі водного розчину

"Цитофлавін" - препарат, призначений для внутрішньовенного введення. Розчини, що вводяться у кров'яне русло, повинні фізіологічно сполучатися з фізико-хімічними параметрами крові, зокрема з рН. Введення кислих та/або лужних розчинів у кров'яне русло є неприпустимим, тому що це може призвести до утворення тромбів, пошкодження стінок вен, виведення в осад лікарських речовин та до закупорки великих та дрібних кровоносних судів (И.Л. Муравьев — Технология лекарств, т 2, М — Медицина, — 1980, — с 622 - 689, Государственная фармакология СССР, М — Медицина, 1990 — с 140)

Було досліджено вплив кількості натрію гідроокису на величину рН розчину препарату та властивості лікарської форми (Таблиця 7)

Таблиця 7

## Вплив вмісту натрію гідроксиду на рН розчину "Цитофлавіну"

Варіант	Кількість натрію гідроксиду, %	Значення рН розчину	Характеристика отриманого розчину	Примітка
А	0	4,01	Неповне розчинення янтарної кислоти	Лікарська форма не придатна для використання
Б	1	4,88	Неповне розчинення янтарної кислоти	Лікарська форма не придатна для використання
В	2	5,7	Кисле значення рН	Розчин не придатний для внутрішньовенного введення
Г	3,3	6,4	Фізіологічно прийнятне значення	Розчин придатний для внутрішньовенного введення
Д	3,7	7,2	Фізіологічно прийнятне значення	Розчин придатний для внутрішньовенного введення
Е	5	8,3	Лужне значення рН	Розчин не придатний для внутрішньовенного введення

Проведені дослідження показали, що оптимальним для даної лікарської форми є вміст натрію

гідроксиду в кількості 3,3 - 3,7%. Експериментальні дані дослідів наведені в Таблиці 8

Таблиця 8

## Вплив вмісту N-метилглюкаміну на рН та стабільність "Цитофлавіну"

Варіант	Вміст N-метилглюкаміну, %	Характеристика стабільності лікарської форми	Примітка
А	0	При зберіганні випадає осад - виникає кислий гідроліз	Для використання не придатний
Б	5,0	При зберіганні випадає осад - виникає кислий гідроліз	Для використання не придатний
В	10,0	Розчин стабільний при зберіганні, але має кисле значення рН	Не придатний для внутрішньовенного введення
Г	15,7	Розчин стабільний при зберіганні	Придатний для використання
Д	17,3	Розчин стабільний при зберіганні	Придатний для використання
Е	20,0	Розчин стабільний при зберіганні, але має лужне значення рН	Не придатний для внутрішньовенного введення
Ж	25,0	Розчин при зберіганні чорніє - виникає лужний гідроліз	Для використання не придатний

Проведені дослідження показали, що для створення стабільного лікарського засобу оптимальним є вміст N-метилглюкаміну в "Цитофлавіні" від 15,7 до 17,3% - варіанти Г, Д (Таблиця 8) та вміст гідроксиду натрію від 3,3 до 3,7% - варіанти Г, Д (Таблиця 7)

Дослід 5 Визначення гострої токсичності "Цитофлавіну"

Визначення гострої токсичності "Цитофлавіну" проводили на лінійних білих мишах-самцях СВА в групах по 10 тварин

Препарат вводили в хвостову вену в зростаючих дозах за Вільконсоном-Літчфілдом та визначали показник ЛД<sub>50</sub> - дозу препарату, що викликає загибель 50% тварин

Результати дослідження наведені в Таблиці 9

Таблиця 9

## Гостра токсичність "Цитофлавіну"

Доза "Цитофлавіну", мг/кг	794	1000	1260	1580	2000
Вижило мишей	10	6	4	0	0
Загибло мишей	0	4	6	10	10

Результати дослідів показали, що препарат "Цитофлавін" належить до малотоксичних сполук ЛД<sub>50</sub> складає 1146 ± 124мг/кг

На слово "Цитофлавін" подана заявка № 98708522 на реєстрацію товарного знаку в Російській Федерації, дата подання 19 05 98



