



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72984** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61C 17/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|--|
| <p>(21) Номер заявки: u 2012 00609</p> <p>(22) Дата подання заявки: 19.01.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.09.2012</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2012, Бюл.№ 17</p> | <p>(72) Винахідник(и): Кайдашев Ігор Петрович (UA), Весніна Людмила Едуардівна (UA), Мамонтова Тетяна Василівна (UA), Микитюк Марина Володимирівна (UA), Куценко Лариса Олександрівна (UA), Куценко Нелля Леонідівна (UA), Боброва Нелля Олександрівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36024, Україна (UA)</p> |
|--|--|

(54) СПОСІБ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТЕРАПІЇ АЛЕРГІЧНИХ СТАНІВ

(57) Реферат:

Спосіб експериментальної терапії алергічних станів включає відтворення бронхіальної астми, її медикаментозне лікування та оцінку ефективності проведеного лікування. Як лікувальний засіб використовують фулерени. Контроль за ефективністю лікування здійснюють за показниками вільнорадикального окислення ліпідів.

UA 72984 U

Корисна модель належить до галузей біології, медицини, фармакології та може бути використана для терапії алергічних станів та розробки фармакологічних препаратів для лікування алергії.

Алергія становить значну медико-соціальну проблему сучасної медицини. Алергічні захворювання, в першу чергу - такі найбільш поширені, як бронхіальна астма, алергічний риніт, atopічний дерматит, харчові алергії належать до неінфекційних захворювань імунної системи та розвиваються за різними формами реакцій негайного типу.

Так, основою розвитку бронхіальної астми, захворюваність якою становить від 4 до 10 % населення земної кулі, є запальний процес в дихальних шляхах за участю різноманітних клітинних елементів, включаючи тучні клітини, еозинофіли, Т-лімфоцити. У осіб зі схильністю цей процес призводить до розвитку генералізованої бронхіальної обструкції різного ступеня вираженості, що потребує спрямованого пошуку та розробки не тільки сучасних адекватних та безпечних засобів патогенетичної терапії, але й методів контролю ефективності їх використання.

На теперішній час відомий спосіб використання антагоністів рецептора простагландину D2 [Пат. 2431631 С2 Российская Федерация, МПК С07D239/46, С07D403/04, С07D409/04, А61К31/505, А61Р11/00. 2,6-замещенные-4-монозамещенные аминопиримидины как антагонисты рецепторов простагландина D2 /Стефани Д. (US), Харрис К.Д. (US), Гиллеспи Т.А. (US), Гарднер Ч.Дж. (US), Агиар Ж.К. (US); Заявитель и патентообладатель САНОФИ-АВЕНТИС (FR).- № 2431631 С2; №2008144578/04, заявл. 12.04.2007; опубл. 20.10.2011 Бюл. № 29] та антагоністів рецептора простагландину D з метою зниження запалення дихальних шляхів при експериментальній бронхіальній астмі [Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, Ohtani M, Arita H (2001), Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751 // J. Pharmacol. Exp. Ther. 298(2), 411-9, 2001].

Відомий спосіб використання ліпосомальної форми фенотеролу для корекції бронхообструктивного синдрому при експериментальній бронхіальній астмі [Пат. 2180838 Российская Федерация, МПК А61К9/127, А61К31/065, А61Р11/06. Способ коррекции бронхообструктивного синдрома /Невзорова В.А., Лукьянов П.А., Гельцер Б.И.; заявитель и патентообладатель Владивостокский государственный медицинский университет.- № 98111257/14; заявл. 08.06.1998; опубл. 27.03.2002]; використання водорозчинних полісахаридів аїру для зниження важкості анафілактичного шоку [Пат. 2378004 С1 Российская Федерация, МПК А61К36/882, А61К31/715, А61Р37/08. СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОАЛЛЕРГИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ / Данилец М.Г., Гурьев А.М., Вельская Н.В., Белоусов М.В., Вельский Ю.П., Юсубов М.С., Трофимова Е.С., Учасова Е.Г., Лигачева А.А., Агафонов В.И., Ахмеджанов Р.Р. Патентообладатель(и): Государственное учреждение Научно-исследовательский институт фармакологии Томского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН) (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" (ГОУ ВПО "СибГМУ") (RU), Общество с ограниченной ответственностью "Инновационные коммуникации" (ООО "Инновационные коммуникации") (RU). - № 2008124503/15; заявл. 16.06.2008; опубл. 10.01.2010].

Найбільш близьким до способу по технічному результату та призначенню є спосіб лікування експериментальної бронхіальної астми [Каладзе Н.Н., Бабак М.Л., Самойлов А.Н. Эффективность применения кромонов в терапии бронхиальной астмы (по данным эксперимента) /Современная педиатрия.-2009. - № 6(28).- С. 13-16], відповідно до якого як препарат базисної терапії використовували кромоглікат натрію, а контроль за ефективністю терапії проводили за допомогою гістологічних методів дослідження.

Для здійснення цього способу проводили моделювання бронхіальної астми на мурчаках з використанням як індуктора алергії розчину овальбуміну. Після розвитку астми протягом 3 місяців тварини отримували щоденно препарати базисної терапії кромоглікат натрію або флютиказон пропіонат протягом 3 місяців. Для введення препаратів використовували інгаляційний шлях. Оцінку ефективності проведеного лікування проводили, вивчаючи морфологічні зміни бронхолегеневої системи та серцевого м'яза.

Загальними ознаками способу, що заявляється, і способу, що вибраний за найближчий аналог, є відтворення експериментальної моделі бронхіальної астми на тваринах з використанням овальбуміну, терапія бронхіальної астми та оцінка ефективності проведеного лікування.

Недоліком існуючого способу є використання кромоглікату натрію для лікування бронхіальної астми, який є недостатньо ефективним для профілактики та лікування важких

загострень бронхіальної астми, має іритативний ефект, тривалий курс лікування та оцінку ефективності лікування тільки за результатами гістологічних досліджень, що є достатньо трудомісткими, відносно суб'єктивними, не дають кількісної оцінки змін показників, які супроводжують розвиток алергічного запалення в різних органах.

5 Тому, в основу корисної моделі поставлена задача створити такий спосіб експериментальної терапії бронхіальної астми шляхом удосконалення відомого, який дозволяє як препарат терапії використовувати фулерени, а контроль за ефективністю терапії здійснювати за допомогою оцінки кількісних показників вільнорадикального окислення ліпідів.

10 Поставлена задача вирішується шляхом створення способу експериментальної терапії бронхіальної астми, що включає відтворення бронхіальної астми, її медикаментозне лікування та оцінку ефективності проведеного лікування, згідно з корисною моделлю, як лікувальний засіб використовують фулерени, а контроль за ефективністю лікування здійснюють за показниками вільнорадикального окислення ліпідів.

15 Запропонований спосіб дозволяє використовувати як терапевтичні засоби представників алотропних форм вуглецю - фулерен C_{60} (FC_{60}) та його модифіковану форму (1,2 метанофулерен C_{60})-бікарбоксилацид, а контроль за ефективністю терапії проводити за показниками вільнорадикального окислення ліпідів, доцільність визначення яких як неспецифічні маркери асептичного запалення при бронхіальній астмі обґрунтована [Герасимов С.В. Пероксидна окисація ліпідів та антиоксидантний захист при бронхіальній астмі //Український медичний часопис - 2000.- № 1(15). - С.86-94].

20 Технічний результат досягають завдяки високій біологічній активності наночастинок фулерену C_{60} , які можуть проникати крізь клітинну мембрану та взаємодіяти із вільними радикалами кисню [Чекман І.С. Наноматеріали та наночастинок: класифікація/ І.С.Чекман, Н.О.Горчакова, О.Ю.Озейчук // Науковий вісник національного медичного університету ім. О.О.Богомольця.- 2009. - №2. – С 188-201], інактивувати супероксиданіон-радикали та гідроксильні радикали *in vitro* та *in vivo* [The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fullereneol, polyhydroxylated C_{60} , on vascular smooth muscle cells / L.H. Lu, Y.T Lee., H.W Chen. [et. al.] // Br. J. Pharmacol.-1998. - V. 115. - P. 6029-6044].

Заявлений спосіб виконується наступним чином:

30 У мишей лінії Balb/c віком 6 тижнів була відтворена експериментальна бронхіальна астма (БА) шляхом внутрішньочеревної сенсibiliзації тварин овалбуміном в стерильному фізіологічному розчині (ОВА група). Сенсibiliзацію проводили в 0 та 14 день. На 24, 25, 26 дні тваринам вводився ОВА у вигляді аерозолі, генерованого із 1 % ОВА у 0,9 % фізіологічному розчині за допомогою інгалятора ультразвукового "Муссон-2" (ФГУП "Алмаз", г. Ростов-на-Дону, Росія) протягом 40 хвилин. Тваринам з БА в 1 дослідній групі вводили водну дисперсію FC_{60} (Sigma, USA; ОВА- FC_{60} група), тваринам з БА в 2 дослідній групі вводили водну дисперсію FC_{60} в суміші з ОВА (ОВА- FC_{60} -ОВА група), тваринам з БА в 3 дослідній групі вводили розчин модифікованого фулерену (1,2 метанофулерен C_{60})-бікарбоксилацид (mFC_{60} , Sigma, USA) (ОВА- mFC_{60} група), тваринам з БА в 4 дослідній групі вводили розчин модифікованого фулерену кон'югованого з ОВА (ОВА- mFC_{60} -ОВА група). Досліджувані фулерени вводили внутрішньочеревно в дозі по 50нг у вигляді розчинів за 1 годину до кожної інгаляції. На 26 день після останньої інгаляції ОВА тваринам проводили евтаназію шляхом цервікальної дислокації та відбирали легені, печінку та селезінку. В гомогенатах тканин визначали рівень продуктів ПОЛ по вмісту речовин, які реагували з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти), їх накопичення при інкубації гомогенатів в прооксидантному буфері, а також показників ферментативної ланки АОЗ - активності супероксиддисмутази (СОД) та каталази.

45 Аналіз одержаних результатів свідчить, що при експериментальній БА в гомогенатах тканин тварин спостерігалось вірогідне збільшення приросту ТБК-реактантів - у тканинах легень у 2,4 разу, печінки у 1,6 разу, селезінки в 2,2 разу (табл. 1). Це свідчить про посилення процесів ПОЛ та зменшення стійкості субстратів до ліпопероксидації, що є результатом системних порушень окислювально-відновлювального балансу в організмі.

50 Введення водної дисперсії FC_{60} та mFC_{60} тваринам з БА призводило до значного вірогідного зниження приросту ТБК-реактантів у тканинах легень - порівняно із контрольною групою у 4,5 разу. В тканинах печінки ведення цим тваринам водної дисперсії FC_{60} не виявило вірогідних змін у порівнянні із контролем. У той же час FC_{60} у суміші з ОВА, mFC_{60} та його кон'югована з ОВА форма вірогідно знижували приріст ТБК-реактантів у середньому на 16-18 %, що призводило до нормалізації процесів ПОЛ у печінці. Введення дослідним тваринам дисперсії FC_{60} та mFC_{60} значно гальмувало накопичення продуктів пероксидації в гомогенатах тканин селезінки у порівнянні із контролем у 1,68 та 1,77 разу відповідно.

При дослідженні активності СОД було виявлено, що в тканинах легень сенсibilізованих тварин активність ферменту суттєво не змінювалась (табл.2). Попереднє введення водної дисперсії модифікованого фулерену, кон'югованого з овальбуміном (mFC₆₀-ОВА), призводило до вірогідного зниження цього показника в 1,3 та 1,2 разу у порівнянні з інтактною та

5 контрольною групою, відповідно.

Індукція експериментальної БА характеризувалась активацією СОД у тканинах печінки. Введення кон'югованого фулерену FC₆₀ сенсibilізованим тваринам призводило до вірогідного росту активності ферменту в порівнянні з показниками контрольної групи. При введенні модифікованого фулерену FC₆₀ та його кон'югованої форми призводило до вірогідного

10 зниження активності СОД в порівнянні з показниками тварин з ОВА (до рівня вмісту ферменту інтактних тварин).

Активність СОД в тканинах селезінки на фоні моделювання експериментальної БА мала тенденцію до зниження (табл.2). Введення фулеренів не призвело до вірогідних змін показника.

Відтворення експериментальної БА на тваринах супроводжувалось зниженням активності

15 каталази в легенях в 1,2 разу порівняно з показниками інтактних тварин (табл.2). Введення водної дисперсії фулерену C₆₀ призводило до вірогідного відновлення активності каталази. При цьому кон'югована та модифікована форма фулеренів FC₆₀-ОВА та mFC₆₀ викликали вірогідне зниження активності ферменту в порівнянні з інтактною та контрольною групою у 1,3 та 1,1 разу, відповідно.

Активність каталази в тканинах печінки тварин, сенсibilізованих овальбуміном, вірогідно не змінювалась. Введення всіх досліджуваних форм фулеренів тваринам також не викликало вірогідних змін (табл.2).

Активність каталази в тканинах селезінки тварин з експериментальною БА вірогідно підвищувалась в 1,6 разу порівняно з інтактними тваринами (табл. 2). Введення різних форм водної дисперсії фулеренів сенсibilізованим тваринам призводило до часткового відновлення активності даного ферменту в тканинах селезінці, при цьому ефективним виявився фулерен

25 FC₆₀ та його суміші із ОВА форма (FC₆₀-ОВА).

Таким чином, отримані результати свідчать, що моделювання експериментальної БА у тварин шляхом їх сенсibilізації овальбуміном призводить до посилення ВРО ліпідів, яке виявляється у підвищенні приросту ТБК-реактивних в тканинах та зниженням активності основних ензимів АОЗ - СОД та каталази. Даний факт підтверджує наявність дисбалансу в окислотно-антиоксидантній системі тварин та вказує на її неспроможність у боротьбі з окислативним стресом, зумовленим розвитком експериментальної БА [Sugiura H. Oxidative and

35 nitrate stress in bronchial asthma /H. Sugiura, M. Ichinose // Antioxid Redox Signal.-2008. -Vol.10, № 4. -P.785-97; Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma /M. Ichinose, A. Nadeem, SK Chhabra [et. al.] //J Allergy Clin Immunol.-2003. -Vol. III, №1.-P.72-8].

З літературних джерел відомо про здатність фулеренів регулювати ВРО шляхом нейтралізації тільки надлишку вільних радикалів, не зменшуючи тієї їх кількості, яка необхідна для нормального функціонування біологічної системи [Andrievsky G.V. Is C60 fullerene molecule toxic?! Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures / G.V. Andrievsky, V.K. Klochkov, L.I. Derevyanchenko //Chem. Sos. Commun.-2005.- Vol. 13, № 4. -P. 363-376; Nanostructures of hydrated C60 fullerene (C60hyen) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral

40 impairments of alcoholized animals / A.O. Tykhomyrov, V.S. Nedzvetsky, V.K. Klochkov [et al] // Toxicology.-2008. - Vol. 246, № 2-3. - P. 158-165]. Це твердження цілком справдилося при застосуванні фулерену FC₆₀ на фоні експериментальної БА, коли під його впливом ефективно знижувався приріст ТБК-реактивних, особливо в легенях і селезінці. Вважають, що антиоксидантні властивості фулеренів пов'язані з їх корою послідовністю та (або) модифікацією фізико-хімічних властивостей водного середовища. Це положення достатньою мірою пояснює той факт, що в наших дослідженнях антиоксидантні властивості виявив не лише

50 чистий фулерен FC₆₀, а й його модифікована (mFC₆₀) та кон'юговані форми.

В проведених дослідженнях фулерен FC₆₀, його модифікована форма (mFC₆₀) та їх кон'юговані форми (FC₆₀-ОВА та mFC₆₀-ОВА) впливали на активність АО ферментів по різному, в залежності від органа та форми фулерену. Це дає можливість припустити, що відбувається пряма модифікація ферментів під дією FC₆₀, у якій істотну роль відіграють заміщуючі групи та

55 приєднані сполуки. Крім того, можливо, що роль регулятора активності СОД і каталази виконує супероксиданіон-радикал, що контролюється фулеренами [Satoh M. Pharmacological studies on fullerene (C₆₀), a novel carbon allotrope, and its derivatives / M. Satoh, I. Takayanagi // J. Pharmacol. Sci.-2006.- Vol. 100. - P. 513-518; Bosi S. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications / S. Bosi, T. Da Ros, G. Spalluto, M. Prato // Eur. J. Med. Chem.-2003. - Vol. 38. - P. 913-923]. Таким чином, експериментальна БА, яка відтворена шляхом сенсibilізації овальбуміном,

60

характеризується посиленням процесів ПОЛ і зниженням активності СОД і каталази в тканинах легень та селезінки дослідних тварин. Всі застосовані фулерени виявили АО ефект, який притаманий коровій структурі фулерену FC_{60} та модифікуючим факторам (радикалам і кон'югованим сполукам).

5 Позитивний результат від заявленого способу експериментальної терапії алергічних станів з використанням фулеренів полягає в зниженні інтенсивності ПОЛ та нормалізації активності ферментів АОЗ за умов розвитку експериментальної БА. Найбільш ефективним виявився вплив водного розчину фулерену FC_{60} та його модифікованої форми (1,2-метанофулерен- C_{60})-61-карбоксилациду.

10

Таблиця 1

Вплив фулеренів на приріст ТБК-реактантів в тканинах при експериментальній бронхіальній астмі у мишей лінії Balb/c

| Групи тварин Показники | Інтакт, (n=6) | ОВА-ОВА (n=6) | ОВА- FC_{60} (n=6) | ОВА- FC_{60} - ОВА (n=6) | ОВА-m FC_{60} (n=6) | ОВА-m FC_{60} - ОВА (n=6) |
|---------------------------|------------------|------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Легені | | | | | | |
| Приріст ТБК-реактантів, % | 18,0±2,10 | 43,0±1,30* | 9,5±0,51* [#] | 32,9±2,81* | 18,2±1,32* | 41,3±4,12* |
| Печінка | | | | | | |
| Приріст ТБК-реактантів, % | 15,0±1,12 | 24,0±3,51* | 23,0±0,79* | 16,2±0,33 [#] | 18,2±0,21 [#] | 16,1±0,11 [#] |
| Селезінка | | | | | | |
| Приріст ТБК-реактантів, % | 28,0±2,18 | 62,0±7,2* | 37,3±1,19* [#] | 61,4±6,8* | 34,8±12,9* [#] | 61,1±3,7* |

* - p < 0,05 у порівнянні із інтактною групою

[#] - p < 0,05 у порівнянні із контрольною групою (ОВА-ОВА)

Таблиця 2

Вплив фулеренів на активність ферментів антиоксидантного захисту в тканинах при експериментальній бронхіальній астмі у мишей лінії Balb/c

| Групи тварин Показники | Інтакт, (n=6) | ОВА-ОВА, (n=6) | ОВА- FC_{60} , (n=6) | ОВА- FC_{60} - ОВА (n=6) | ОВА-m FC_{60} , (n=6) | ОВА-m FC_{60} - ОВА, (n=6) |
|---------------------------|------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Легені | | | | | | |
| СОД, ум.од. | 3,77±0,17 | 3,46±0,14 | 3,23±0,17* | 3,68±0,18 | 3,19±0,18 | 2,8±0,3* [#] |
| Каталаза, ум.од | 4,94±0,12 | 4,09±0,11* | 4,65±0,20* [#] | 3,75±0,24* [#] | 3,71±0,14* [#] | 3,32±0,16* [#] |
| Печінка | | | | | | |
| СОД, ум.од. | 6,3±0,28 | 8,15±0,48* | 8,0±0,68 | 9,25±0,24 [#] | 7,1±0,1* [#] | 6,95±0,13 [#] |
| Каталаза, УМ.ОД | 16,96±0,6 | 16,6±0,88 | 17,06±0,54 | 16,48±0,54 | 16,26±0,76 | 17,04±0,74 |
| Селезінка | | | | | | |
| СОД, ум.од. | 2,27±0,22 | 1,82±0,29 | 2,27±0,12 | 2,07±0,19 | 2,03±0,21 | 1,84±0,2 |
| Каталаза, ум.од | 2,08±0,23 | 1,32±0,12* | 1,58±0,10* [#] | 1,63±0,21 [#] | 1,42±0,21 | 1,16±0,11 |

* - p < 0,05 у порівнянні із інтактною групою

[#] - p < 0,05 у порівнянні із контрольною групою (ОВА-ОВА)

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Спосіб експериментальної терапії алергічних станів, що включає відтворення бронхіальної астми, її медикаментозне лікування та оцінку ефективності проведеного лікування, який **відрізняється** тим, що як лікувальний засіб використовують фулерени, а контроль за ефективністю лікування здійснюють за показниками вільнорадикального окислення ліпідів.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

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

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