



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **49571** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
A61K 31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТУ ІЗОФЛАВОНОЇДІВ СОЇ "ЕКСО" ЯК ЗАСОБУ ПРОФІЛАКТИКИ ГАСТРОПАТІЙ, ВИКЛИКАНИХ НЕСТЕРОЇДНИМИ ПРОТИЗАПАЛЬНИМИ ПРЕПАРАТАМИ

1

(21) u200911836

(22) 19.11.2009

(24) 26.04.2010

(46) 26.04.2010, Бюл.№ 8, 2010 р.

(72) ВОЛОЩУК НАТАЛІЯ ІВАНІВНА, ПЕНТЮК ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСІЙОВИЧ, ЛЕВІЦЬКИЙ АНАТОЛІЙ ПАВЛОВИЧ, СТЕПАНЮК ГЕОРГІЙ ІВАНОВИЧ

2

(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ.М.І.ПИРОГОВА

(57) Застосування препарату ізофлавоноїдів сої "ЕКСО" як засобу профілактики гастропатій, викликаних нестероїдними протизапальними препаратами.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до фармакології і стосується пошуку препаратів, які здатні виявляти захисну дію щодо слизової оболонки шлунку в умовах гастропатій, індукованих нестероїдними протизапальними препаратами (НПЗП).

Висока захворюваність і смертність, асоційована з нестероїдними протизапальними засобами, в значній мірі зумовлені гастродуоденальними ускладненнями, притаманними препаратам цієї групи, в т.ч. кровотечами та перфораціями, що є безпосередньою причиною майже всіх летальних випадків при лікуванні НПЗП. [Moore R.A., Deny S., Phillips C.J., et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyclooxygenase-2 selective inhibitors (coxibs) and gastrointestinal harm: review of clinical trials and clinical practice // BioMed. Central Musculoskeletal Disorders. - 2006. - Vol.7. - N79. - P. 1471-1484].

Головними недоліками сучасних підходів до профілактики та лікування НПЗП-гастропатій які використовуються на сьогоднішній день, є не завжди задовільна фармакологічна ефективність препаратів, їх висока вартість, а також численні побічні ефекти, які обмежують їх клінічне застосування. Так, використання селективних інгібіторів ЦОГ-2 (коксибів), дещо знижує ризик гастропатій, однак, в свою чергу, може викликати порушення з боку серцево-судинної системи (інфаркти, інсульт), видільної системи, тощо [Moodley I. Review of the cardiovascular safety of COXIBs compared to NSAIDs // Cardiovasc. J. Afr.- 2008.-Vol. 19.-P.102-107].

Синтетичний аналог простагландинів - мізопролол, також має певні недоліки, серед яких виділяють біль в шлунку, діарею, яка зустрічається в 30% випадків, рідше - блювоту, нудоту та метеоризм, що призводить до зменшення кратності його використання або разової дози, додаткового призначення антацидних засобів, або інколи відміни препарату [Свиницкий А.С., Пузанова О.Г. Гастродуоденальные осложнения противовоспалительной терапии в ревматологической практике // Український ревматологічний журнал. - 2002. - №2(8). - С. 15-23]. Крім того, препарат необхідно приймати декілька разів на день в зв'язку з швидким метаболізмом.

Інгібітори H2-гістамінових рецепторів не попереджають виникнення ерозії СОШ, хоча і зменшують ступінь мікрокровотеч. Недоліком цієї групи засобів є звикання, яке обумовлене феноменом «втомлення рецепторів», а також низька ефективність цієї групи засобів у пацієнтів, які палять [Исаков В.А. Гастропатия, связанная с приемом нестероидных противовоспалительных препаратов: патогенез, лечение и профилактика // Клиническая фармакология и терапия. -2005. - №14. - С. 17-23; Becker J.C., Domschke W., Pohle T. Current approaches to prevent NSAID-induced gastropathy - COX selectivity and beyond // Br. J. Clin. Pharmacol. - 2004. - Vol. 58. - N6. - P.587-600].

Інгібітори протонної помпи рекомендують використовувати лише для короткотривалого захисту верхніх відділів ШКТ при призначенні НПЗП, крім того, вони є недостатньо ефективними щодо захисту тонкого і товстого кишечника, які теж є мішенями небажаної дії НПЗП [Moore R.A., Deny S.,

(19) **UA** (11) **49571** (13) **U**

Phillips C.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyclooxygenase-2 selective inhibitors (coxibs) and gastrointestinal harm: review of clinical trials and clinical practice // *BMC Musculoskeletal Disorders*. - 2006. - Vol.7. - P.79-91].

Препарат «ЕКСО» містить глікозиди ізофлавонових (геністеїн, дайдзеїн), макроелементи (кальцій, фосфор, магній, калій, натрій, сірку), мікроелементи (залізо, мідь, цинк, марганець), вітаміни (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆), білки, жири, цукор. Головним діючим компонентом якого цього препарату є геністеїн - ізофлавоноїд з естрогеноподібною дією [Левицький А.П., Макаренко О.А., Сукманський О.І. Фітоестрогени. - Одеса, 2002. - 95 с]. В раніше проведених нами дослідженнях було показано, що естрогени виступають як гастропротективні чинники, що посилюють фармакологічний ефект НПЗП та зменшують ступінь вираженості побічних реакцій останніх [Волощук Н.І., Пентюк О.О. Роль статевих відмінностей в гастротоксичній дії деяких нестероїдних протизапальних засобів // *Сучасні проблеми токсикології*. - 2007. - №4. - С. 47-49]. Проведені дослідження показали, що ізофлавоїди ЕКСО здатні позитивно впливати на різні метаболічні процеси, нормалізувати окислительно-антиоксидантний гомеостаз, тим самим покращувати функціонування різних клітинних структур за рахунок цитопротекції [Левицький А. П. Макаренко О.А., Богатов В.В., и др. Выделение и биологические свойства соевых изофлавонов // *Хранение и переработка сельхозсырья*. - Москва. - 2001. - №9. - С. 38-41; Santangelo C, Vari R., Scazzocchio B., et al. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation // *Ann. 1st. Super Sanita*. - 2007. - Vol. 43. - P.394-405]. Існують також дані, що естрогени та ізофлавоноїди здатні також проявляти захисну дію щодо слизової оболонки шлунку [Shimozawa N., Okajima K., Harada N. Estrogen and isoflavone attenuate stress-induced gastric mucosal injury by inhibiting decreases in gastric tissue levels of CGRP in ovariectomized rats. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. -2007.-Vol.292(2).-P.615-619]. Сукупність вказаних фармакологічних властивостей «ЕКСО» може обумовлювати наявність у нього гастропротекторної дії.

В основу корисної моделі «Застосування препарату ізофлавоноїдів сої «ЕКСО» як засобу профілактики гастропатій, викликаних нестероїдними протизапальними препаратами» поставлено завдання шляхом застосування препарату «ЕКСО» в дозі 300 мг/кг маси тіла внутрішньошлунково 1 раз на добу на протязі 14 днів перед введенням диклофенаку, німесулідів та целекоксибу профілакту-

вати ушкодження шлунку за умов використання НПЗП.

Вказане завдання досягається шляхом застосування «ЕКСО» за новим призначенням, як засобу для профілактики НПЗП-гастропатій. Результати експериментальних та клінічних досліджень підтвердили наявність у препараті «ЕКСО» проти-запальної, антиоксидантної, цитопротекторної, остеотропної, та помірної естрогеноподібної дії за відсутністю ембріотоксичних та тератогенних властивостей. Препарат «ЕКСО» розроблений в Інституті стоматології АМН України, і виробляється НВО «Одеська біотехнологія».

Хід експерименту. Експерименти виконані на 147 статевозрілих (3,5 місяці) білих нелінійних щурів обох статей, які знаходились в науково-експериментальній клініці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. Щурів розподіляються на 7 груп по 10 самців і самок в кожній. 3 групи дослідних тварин (група 2, 4, 6) протягом 14 днів до початку введення НПЗП та протягом всього періоду введення останніх отримують препарат «ЕКСО» в ефективній терапевтичній дозі 300 мг/кг внутрішньошлунково 1 раз на добу [Левицький А.П., Макаренко О.А., Сукманський О.І. Фітоестрогени. -Одеса, 2002. - 95 с] Всім групам щурів (групи 2-7) внутрішньошлунково 1 раз на добу протягом 7 днів вводять, відповідно: диклофенак (7 мг/кг), німесулід (15 мг/кг) та целекоксиб (20 мг/кг). Група щурів інтактного контролю (група 1) отримує еквівалентну кількість розчинника.

Евтаназію тварин виконують дислокацією шийних хребців. Стан слизової шлунку оцінюють візуально. Відсутність видимих ушкоджень оцінюють в 0 балів, наявність набряку та крововиливів, дефекти слизової шлунку діаметром 1-2 мм відносять до виразок першого ступеня важкості (1 бал), декілька виразок невеликого розміру (2-3 мм) - до другого ступеня важкості (2 бали), виразки більше 3 мм - до третього ступеня важкості (одна - 3 бали, кілька - 4 бали). Перфоративні та пенетруючі в сусідні органи виразки відносять до пошкоджень четвертого ступеню важкості (5 балів). Множинність пошкодження оцінюють як середню кількість виразок на одну тварину. Важкість виразок розраховують як середню суми добутків. Виразковий індекс (ВІ) вираховують за формулою [Яковлева, Л. В. Експериментальне вивчення нових противиразкових препаратів / Л. В. Яковлева, Г. В. Оболенцева, Л. П. Брюзгінова. В кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації під ред. О.В. Стефанова. - К.: ВД «Авіцена», 2001. - С.321-333]:

$$VI = \frac{\text{середня арифметична суми балів} \times \% \text{ тварин з виразками}}{100}$$

В гомогенаті слизової шлунку щурів визначають рівень глікозаміногліканів (ГАГ) за вмістом в них гексозамінів за реакцією з ацетилацетоном та парадиметилбензальдегідом [Ludowieg J., Ben-taman J.D. Colorimetric differentiation of hexosamines. // *Anal. Biochem*. - 1967. - 19, N1. - P.80-88]. Рівень малонового діальдегіду (МДА) визначають за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Владимиров Ю.В., Арчаков А.И. Перекисное окисление

липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972.- С- 252], а активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) - за ступенем пригнічення окислення кверцитину [Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутаза, основанный на реакции окисления кверцитина // *Вопр. мед. химии*.- 1990.-N2,-С.88-91]. Проникність стінки кишечника у щурів вивчають після однора-

зового перорального введення їм 0,5 г сахарози (4 мл 12,5% водного розчину). Сечу збирають 8 годин і в сечі визначали сахарозу, після гідролізу останньої до глюкози інвертазою дріжджів [Davies N.M., Corrigan B.W., Jamali F. Sucrose urinary excretion in the rat measured using a simple assay: a model of gastroduodenal permeability. // Pharm Res. - 1995. - 12, N11. - P.1733-1736]. Вміст глюкози, що утворилась, визначають специфічним ферментативним глюкозоксидазнопероксидазним методом. Статистичну обробку результатів проводять в Microsoft Excel за допомогою стандартних статистичних програм, з використанням t-критерію Ст'юдента, вірогідними вважають зміни при $p < 0,05$.

Результати дослідження впливу препарату ЕКСО на гастротоксичність диклофенаку, німесулід та целекоксибу представлені в таб. 1. Встановлено, що препарат «ЕКСО» виявляє виразну захисну дію щодо СОШ як самок, так і самців щурів за умов дії як неселективного інгібітора ЦОГ диклофенаку, так і селективного інгібітора ЦОГ-2 німесулід та високоселективного інгібітора цієї ізоформи - целекоксибу. Доказом цьому є той факт, що множинність виразкоутворення під дією диклофенаку, німесулід та целекоксибу в групі тварин чоловічої статі, які отримували препарат «ЕКСО», є в 2,2, 2,2 та 1,7 разів менше, ніж у самців без корекції. У самок множинність виразкоутворення за аналогічних умов експерименту є в 2,0, 2,8 та 2,4 рази меншою в порівнянні з тваринами без лікування. Подібна тенденція виявляється і щодо важкості ушкодження слизової оболонки шлунку. Виразковий індекс диклофенаку у групі самців і самок, яким попередньо вводили препарат «ЕКСО», становить 2,7 та 1,6 відповідно, що є в 1,7 та 2,0 разів нижчим, ніж у тварин, яким не вводили цей препарат. Виразковий індекс німесулід та целекоксибу у самців і самок щурів без корекції становить 2,7 і 0,9 та 2,8 і 1,3, відповідно. В групах тварин, які додатково отримували «ЕКСО», показник гастротоксичності також є вірогідно нижчим для німесулід в 2,8 та 1,4 рази для самців і самок, відповідно, а для целекоксибу - в 2,4 та 3,1 рази, відповідно в порівнянні з тваринами без корекції. Тобто, препарат «ЕКСО» виявляє вірогідну протекторну дію на СОШ у тварин за умов введення НПЗП.

При дослідженні змін біохімічних процесів в СОШ, які відбуваються під впливом «ЕКСО» у самців і самок щурів на тлі 7-денного введення диклофенаку натрію (табл. 2) встановлено, що введення НПЗП інтактним тваринам без корекції приводить до зменшення продукції слизу, на що вказує зменшення вмісту ГАГ в слизовій оболонці на 29,8 та 24,2% у самців і самок, відповідно. Також зафіксовано посилення процесів оксидативного стресу водночас із послабленням антиоксидантного захисту, що підтверджується зростанням вмісту МДА і зменшенням активності антиоксидантного ферменту СОД у самців і самок на 114,6 і 91,4% та 38,5 і 29,6%, відповідно. Гастротоксична дія препарату підтверджується також і зростанням проникності шлунку для сахарози, що, як відомо, є першою ознакою ураження ШКТ [Maino M., Mantovani N., Merli R. et al. Effects of chronic therapy with non-steroidal antiinflammatory drugs on gastric permeability of sucrose: A study on 71 patients with rheumatoid arthritis // China World J. Gastroenterol-2006.-Vol.12(31).-P.5017-5020]. В протипагу цьому, профілактичне введення ЕКСО в значній мірі запобігає негативним змінам, які викликає диклофенак у СОШ. Зокрема, у самців і самок на тлі попереднього введення ЕКСО реєструється більший вміст ГАГ (на 44,8 і 38,1%, відповідно), менша кількість МДА в слизовій оболонці шлунку (на 45,4 та 46,5 %, відповідно) і більший вміст СОД (на 55,5 та 60,1%, відповідно) в порівнянні з тваринами, яким вводять диклофенак без корекції. Водночас гастродуоденальна проникність для сахарози у самців і самок щурів, лікованих ЕКСО, є, відповідно, в 1,6 та 1,7 рази меншою, ніж у тварин, які отримують лише один диклофенак.

Таким чином, отримані дані вказують на наявність у «ЕКСО» як препарату з антиоксидантною і естрогеноподібною дією, виразної захисної дії щодо СОШ за умов гастротоксичності нестероїдних протизапальних препаратів, на що вказує його спроможність після 14-денного внутрішньошлункового введення в дозі 300 мг/кг один раз на добу зменшувати ульceraцію СОШ як у самок, так і у самців щурів, а також покращувати продукцію захисного шару слизу, стан оксидантноантиоксидантної рівноваги, а також зменшувати гастродуоденальну проникність шлунково-кишкового тракту.

Таблиця 1

Вплив препарату «ЕКСО» на гастротоксичність диклофенаку, німесулід та целекоксибу у самців та самок щурів ($M \pm m$, $n=10$)

№ груп	Умови дослідження	Самці			Самки		
		Множинність	Важкість	Виразковий індекс	Множинність	Важкість	Виразковий індекс
1	Інтактний контроль	0	0	0	0	0	0
2	Диклофенак	21,±0,06	1,97±0,04	4,67	12,5±0,83*	1,50±0,03*	3,2
3	Диклофенак + «ЕКСО»	9,50±0,83 $P_{2,3} < 0,05$	1,25±0,09 $P_{2,3} < 0,05$	2,7	6,30±1,73 $P_{2,3} < 0,05$	1,11±0,14 $P_{2,3} < 0,05$	1,62
4	Німесулід	6,87±1,35	1,32±0,07	2,73	3,20±0,63*	0,86±0,04*	0,88

Продовження таблиці 1

5	Німесулід «ЕКСО»	+	3,10±0,57 P _{4,5} < 0,05	0,97±0,12 P _{4,5} < 0,05	0,99	1,50±0,34* P _{4,5} < 0,05	0,60±0,06* P _{4,5} < 0,05	0,64
6	Целекоксиб (n=10)		8,50±1,23	1,44±0,13	2,83	4,42±0,74*	0,90±0,16*	1,25
7	Целекоксиб «ЕКСО»	+	4,90±0,62 P _{6,7} < 0,05	0,85±0,14 P _{6,7} < 0,05	1,17	2,30±0,45* P _{6,7} < 0,05	0,50±0,09 P _{6,7} < 0,05	0,48

Примітка 1. Знаком * позначені вірогідні відповідних групах. 2. Цифра проводилось порівняння відмінності між самцями та самками у біля Р означає номер групи, з якою проводились порівняння

Таблиця 2

Вплив препарату «ЕКСО» на зміни біохімічних показників слизової оболонки шлунку у самців і самок щурів під впливом диклофенаку натрію (M±m, n=10)

Показники Групи тварин	ГАГ, мг/г сирової тканини	МДА, нмоль/мг білка	СОД, нмоль/хв. на 1 мг білка	Екскреція сахарози з сечею, % від введеної дози
Інтактні				
Самці	4,03±0,16	6,71±0,38	16,0±0,79	0,32±0,016
Самки	4,57±0,17	5,59±0,20	18,9±0,67	0,30±0,021
Диклофенак натрій (7 мг/кг)				
Самці	2,83±0,17*	14,4±1,05*	9,84±0,63*	0,78±0,027*
Самки	3,46±0,19*	10,7±0,70*	13,3±0,70*	0,61±0,023*
«ЕКСО» (300 мг/кг) + диклофенак натрій (7мг/кг)				
Самці	4,10±0,14#	7,86±0,49#	15,3±0,77#	0,49±0,020#
Самки	4,78±0,19#	5,72±0,24#	21,3±0,81#	0,36±0,017#

Примітки: 1. Знаком * позначені вірогідні відмінності відносно інтактних тварин. 2. Знаком # позначені вірогідні відмінності відносно тварин, що отримували диклофенак натрію без корекції.