

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 103908

СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ АМПЛІТУДИ АДРЕНОРЕАКЦІЇ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 12.01.2016.

Голова Державної служби
інтелектуальної власності України

 А.Г. Жарінова



(11) 103908

Пронумеровано, прошито металевими
люверсами та скріплено печаткою
2 арк.
12.01.2016



Уповноважена особа

(підпис)

(19) UA

(51) МПК
A61K 31/421 (2006.01)

(21) Номер заявки: **u 2015 05290**

(22) Дата подання заявки: **29.05.2015**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **12.01.2016**

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **12.01.2016, Бюл. № 1**

(72) Винахідники:
Ніженковська Ірина
Володимирівна, UA,
Романенко Олександр
Вікторович, UA,
Броварець Володимир
Сергійович, UA,
Головченко Олександр
Володимирович, UA,
Седько Катерина
Володимирівна, UA,
Груша Михайло Михайлович,
UA,
Головченко Оксана Іванівна,
UA

(73) Власник:
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О.
БОГОМОЛЬЦЯ,
бул. Шевченка, 13, м. Київ-4,
01601, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ АМПЛІТУДИ АДРЕНОРЕАКЦІЇ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб зниження амплітуди адренореакції, що передбачає використання впливу біологічно активних речовин на амплітуду адренореакції гладеньких м'язів ізольованих сегментів аорти щурів, який відрізняється тим, що в розчин Кребса додають діетилловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоїл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти, в концентраціях $1 \cdot 10^{-6}$ та $1 \cdot 10^{-5}$ М.



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103908** (13) **U**
(51) МПК
A61K 31/421 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

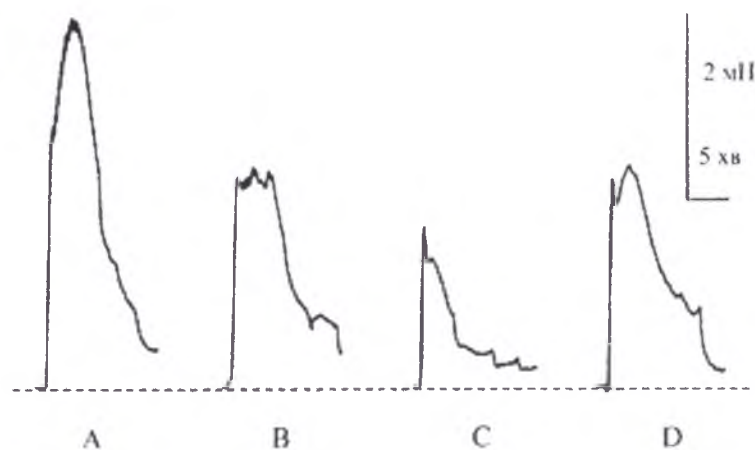
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 05290	(72) Винахідник(и): Ніженковська Ірина Володимирівна (UA), Романенко Олександр Вікторович (UA), Броварець Володимир Сергійович (UA), Головченко Олександр Володимирович (UA), Седько Катерина Володимирівна (UA), Груша Михайло Михайлович (UA), Головченко Оксана Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 29.05.2015	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.01.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.01.2016, Бюл.№ 1	

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ АМПЛІТУДИ АДРЕНОРЕАКЦІЇ

(57) Реферат:

Спосіб зниження амплітуди адренореакції, що передбачає використання впливу біологічно активних речовин на амплітуду адренореакції гладеньких м'язів ізольованих сегментів аорти щурів, причому в розчин Кребса додають діетиловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоїл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти, в концентраціях $1 \cdot 10^{-6}$ та $1 \cdot 10^{-5}$ М.



Фіг.

UA 103908 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини та фармації, зокрема фармакології, а саме способу зниження амплітуди адренореакції при дослідження вазодилатуючих властивостей нових лікарських засобів.

5 Запропонований спосіб зниження амплітуди адренореакції ґрунтується на вазодилатуючих властивостях діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти та передбачає можливість застосування цієї сполуки в практичній медицині в якості нового лікарського засобу для лікування хвороб, які супроводжуються підвищенням артеріального тиску.

10 Серцево-судинні хвороби, за даними ВООЗ, є однією з основних причин смертності у світі та складають групу захворювань, від яких страждає до 25 % дорослого населення світу [1]. Однією з провідних проблем кардіології є підвищення артеріального тиску, що може бути як самостійним проявом гіпертонічної хвороби, так і атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, спастичних змін судинної стінки, гострого інфаркту міокарда тощо. В експериментах *in vitro* вазодилатуючі властивості сполук визначають декількома способами, зокрема за їх здатністю 15 знижувати амплітуду адренореакції. Оскільки підвищення артеріального тиску значною мірою зумовлене збільшенням тонуусу гладеньких м'язів в стінці судин, то актуальність пошуку нових засобів, ефективних при артеріальній гіпертензії, не викликає сумнівів [3].

Як прототип був вибраний спосіб зниження амплітуди адренореакції при аплікації сполук ряду N-(2-арил-4-тіокарбамоіл-1,3-оксазол-5-іл)-(3-аланінів на кільцеві сегменти каротидних 20 артерій кролів, які попередньо були скорочені фенілефрином $1 \cdot 10^{-5}$ М [8].

В основу корисної моделі, що пропонується, поставлена задача визначення можливості використання діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти як потенційного 25 лікарського засобу, що проявляє вазодилатуючі властивості.

Поставлену задачу досягають тим, що у відомому способі, який передбачає використання впливу біологічно активних речовин на амплітуду адренореакції гладеньких м'язів ізольованих сегментів аорти щурів, згідно корисної моделі в розчин Кребса додають діетиловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-іл-фосфонової 30 кислоти, в концентраціях $1 \cdot 10^{-6}$ та $1 \cdot 10^{-5}$ М.

Перевагою корисної моделі, що заявляється, є виявлення вазодилатативної активності нової хімічної сполуки, яка може бути використана для розробки лікарських засобів, що *in vitro* проявляє адитивну дію при одночасному застосуванні з верапамілом.

Сутність способу, що заявляється, пояснюється графічно, де 35 на кресленні представлена ілюстрація типової динаміки ініційованого адреналіном ($5 \cdot 10^{-5}$ М) скорочення ізольованих сегментів аорти щурів:

A - контроль, що являє собою адренореакцію в розчині Кребса;

B - пригнічення амплітуди адренореакції при внесенні в розчин Кребса діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової 40 кислоти в концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ М;

C - пригнічення амплітуди адренореакції при додатковому внесенні розчину верапамілу в концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ М в середовище інкубації;

D - відновлення амплітуди адренореакції при вилученні з досліджуваного розчину верапамілу.

45 Дослідження вазодилатативної активності засобу проводили за модифікованою методикою [2] на ізольованих кільцевих сегментах аорти білих щурів лінії Вістар середньої ваги 200-250 г. Догляд за тваринами та їх евтаназію здійснювали відповідно до Директиви Європейського Союзу 2019/10/63 EU про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, і Закону України №3447-1V "Про захист тварин від жорстокого поводження".

50 М'язовий препарат готували із низхідної частини грудного відділу аорти [5]. Після попередньої ретельної відмивки у фізіологічному розчині Кребса та охолодження протягом 40 хв. при температурі 6-8 °С, фрагмент аорти під бінокулярним стереомікроскопом розрізали на кільцеві сегменти довжиною приблизно 2 мм [4]. Для цього послідовно відшарували сполучні тканини, які оточують стінки судини, отримували кільцеві сегменти, які занурювали в розчин 55 Кребса, що мав температуру 35-36 °С, і витримували в ньому не менше, ніж 1 годину до початку електрофізіологічних досліджень. Установка для реєстрації тонуусу кільцевих сегментів аорти складається із проточної камери об'ємом 2 мл, що термостатується при температурі 36,5 °С. Препарат закріплювали в камері між сталевими гачками, з'єднаними з тензодатчиком. Реєстрацію вазоактивних реакцій здійснювали в ізометричному режимі скорочень за допомогою 60 осцилографа з відповідним програмним забезпеченням (Iris Waveware).

Для роботи використовували розчин Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl - 133; KCl - 4,7; CaCl₂ - 2,5; MgCl₂ - 1,2; NaHCO₃ - 10; NaH₂PO₄ - 1,38; C₆H₁₂O₆ - 7,8 (pH 7,4). Діетиловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО) та вносили в буфер Кребса в концентраціях 1·10⁻⁶ та 1·10⁻⁵ М. Об'єм ДМСО відповідних максимальних аліквот сполук не перевищував 0,05 %, що за літературними даними в контрольних експериментах не впливає на тонус судин [6, 7].

Значна кількість вазодилататорів реалізують свої ефекти через механізми, пов'язані із блокадою повільних потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу, розміщених на мембранах клітин гладких м'язів. У зв'язку з цим, в експерименті проводили дослідження вазодилататорного ефекту верапамілу на фоні розчину діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти в буфері Кребса в концентрації 1·10⁻⁵ М.

Вплив сполук на тонус судин досліджували за їх активністю щодо скорочення, викликаного аплікацією агоніста α₁-адренорецепторів адреналіном (5·10⁻⁶ М) тривалістю 10 с. Амплітуду скорочення (адренореакцію) в контролі приймали за 100 % (Фіг. 1, А).

Вихідне напруження кільцевого сегменту аорти відповідало навантаженню 10 мН. Для стандартизації вихідного напруження препарату його порівнювали з калібрувальним сигналом. Вазодилатуюча активність засобу оцінювалась за впливом на амплітуду скорочення гладеньких м'язів судин у відповідь на внесення в інкубаційне середовище агоніста α₁-адренорецепторів адреналіну (5·10⁻⁶ М).

Середнє значення амплітуди адренореакції в контролі складало 4,34±0,43 мН. Внесення в розчин Кребса сполуки діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти в концентрації 1·10⁻⁵ М (Фіг. 1, В) знижувало на 35-й хвилині аплікації амплітуду адренореакції на 30,88 % від вихідного рівня, яка в середньому складала 3,00±0,39 мН (Табл.1). При додатковому внесенні в середовище інкубації верапамілу в концентрації 1·10⁻¹ М (С) на 60-й хв аплікації спостерігали адитивність дії цього блокатору повільних Са²⁺-євих каналів L-типу і дослідної сполуки, при цьому амплітуда адренореакції на фоні їх сумісної аплікації знижувалась в середньому до 2,09±0,34 мН. На 30-й хв вилучення з досліджуваного розчину верапамілу (D) амплітуда адренореакції на фоні досліджуваної сполуки зросла, в середньому, на 8,52 % порівняно з амплітудою адренореакції за умов одночасної присутності в розчині верапамілу (1·10⁻⁵ М) і діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти (1·10⁻⁵ М), і становила в середньому 2,46±0,28 мН. Вилучення з розчину Кребса останнього (E) призводило до подальшого зростання амплітуди адренореакції в середньому до 2,92±0,36 мН (Табл. 1).

Таблиця 1

Дослідження амплітуди адренореакції на кільцевому сегменті аорти щура із застосуванням діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден) гліцил] амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти в концентрації 1·10⁻⁵ М (n=7)

Параметри	Амплітуда адренореакції, мН		M	±Δ	% від вихідного скорочення
	min	max			
A	3,48	6,17	4,34	1,14	100
B	2,13	4,51	3,00	1,04	69,12
C	1,30	3,74	2,09	0,90	48,16
D	1,66	3,84	2,46	0,73	56,68
E	2,18	4,31	2,92	0,81	67,51

Аналогічним способом був проведений експеримент на кільцевому сегменті аорти щура із застосуванням діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден) гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти в концентрації 1·10⁻⁵ М.

У кожному досліді перед початком аплікації речовини проводили адренореакцію в розчині Кребса (A'), амплітуду якої приймали за 100 % і порівнювали з нею ефекти досліджуваних сполук. Середнє значення амплітуди адренореакції в контролі складало 3,94±0,88 мН. При внесенні в розчин Кребса діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти в концентрації 1·10⁻⁵ М

М (В¹) на 35-й хвилині спостерігали зниження амплітуди адренореакції в середньому до $3,48 \pm 0,92$ мН. При додатковому внесенні в середовище інкубації верапамілу в концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ М на 60-й хв апікації (С¹) спостерігали адитивність дії цього локатору Са-євих каналів L-типу і дослідної сполуки, при цьому амплітуда адренореакції на фоні їх сумісної апікації знижувалась в середньому до $1,81 \pm 0,97$ мН. Після вилучення з досліджуваного розчину верапамілу (D¹) через 30 хв амплітуда адренореакції на фоні діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти зросла в середньому на 12,19 % порівняно з амплітудою адренореакції за умов їх одночасної присутності в розчині, і становила в середньому $2,29 \pm 0,64$ мН. Вилучення з розчину Кребса діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти (E¹) призводило до подальшого зростання амплітуди адренореакції до $2,50 \pm 0,74$ мН (Табл. 2).

Таблиця 2

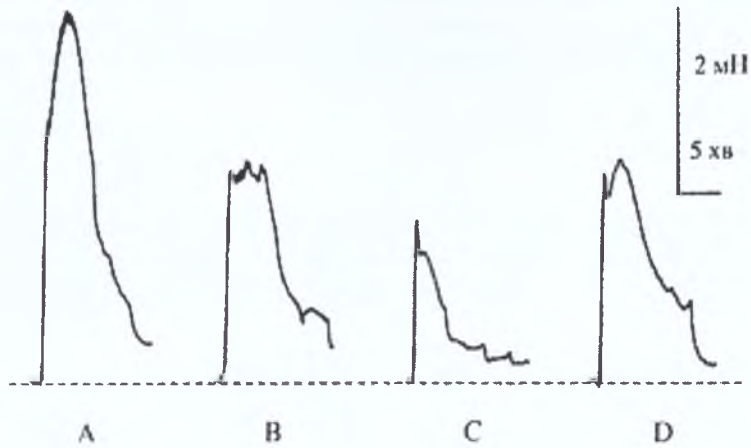
Дослідження амплітуди адренореакції на кільцевому сегменті аорти щура із застосуванням діетилового естеру 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти в концентрації $1 \cdot 10^{-6}$ М (n=3)

Параметри	Амплітуда адренореакції, мН		М	±Δ	% від вихідного скорочення
	min	max			
A	3,33	4,94	3,94	0,88	100
B	2,84	4,54	3,48	0,92	88,58
C	1,00	2,89	1,81	0,97	45,93
D	1,63	2,91	2,29	0,64	58,12
E	1,91	3,33	2,50	0,74	63,45

- 15 В експериментах на ізольованих сегментах аорти щурів показано новий спосіб зниження амплітуди адренореакції сполукою діетиловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти в концентраціях $1 \cdot 10^{-6}$ М та $1 \cdot 10^{-5}$ М. підтвердили її вазодилатуючу активність окремо та при одночасному внесенні в розчин з верапамілом, що робить запропонований спосіб перспективним для дослідження судинорозширюючих властивостей нових сполук
- 20 Вивчення способу зниження амплітуди адренореакції сполукою діетиловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоіл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти проводили на базі кафедр фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.
- 25 Джерела інформації:
1. Yang Z.J., Liu J., Ge J.P., Chen L., Zhao Z.G., Yang W.Y. Prevalence of cardiovascular disease risk factor // Eur. Heart J. - 2012; - P. 213-220.
 2. Блаттнер Р., Классен Х., Денерт Х., и др. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц. // М.: Мир. - 1983. - 206 с.
 3. Компендиум 2008/2009 - лекарственные препараты под. ред. Коваленко В.Н., Викторова А.П. - К: Морион, - 2008. - 1200 с.
 4. Лукьянцева Г.В., Сергеев И.Ю., Пастухова В.А., Гунина Л.М. Динамика сократительной активности изолированного кольцевого препарата аорты крыс под влиянием амилина. // Український морфологічний альманах. - Том 11, №1. - 2013. - С. 77-78.
 5. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы (Лабораторные животные) / Под ред. академика А.Д. Ноздрачева. - СПб.: Издательство "Лань", 2001. - 464 с.
 6. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). За ред. О.В. Стефанова - К.: Авіцена, 2001. - 528 с.
 7. Яковенко І.Н., Лукашук О.І., Кондратюк К.М., Головченко О.В., Жирнов В.В., Броварець В.С. Синтез і дослідження вазоактивних властивостей нових фосфорильованих пептидоміметиків // Journal of organic and pharmaceutical chemistry. - 2013. - Vol. 11, Iss. 3 (43). - P. 43-50.
 8. Яковенко І.Н., Шабликін О.В., Козаченко О.П., Броварець В.С. Вазодилатуючі ефекти N-(2-арил-4-тіокарбамоіл-1,3-оксазол-5-іл)-β-аланінів - специфічних інгібіторів протеїнкінази СК2 // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. - 2012. - Т. 10, вип. 3 (39). - С. 55-58.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб зниження амплітуди адренореакції, що передбачає використання впливу біологічно активних речовин на амплітуду адренореакції гладеньких м'язів ізольованих сегментів аорти щурів, який відрізняється тим, що в розчин Кребса додають діетиловий естер 5-алкіламіно-2{N-[N-бензоїл-(4-метилбензиліден)гліцил]амінометил}-1,3-оксазол-4-ілфосфонової кислоти, в концентраціях $1 \cdot 10^{-6}$ та $1 \cdot 10^{-5}$ М.



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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

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