

Винахід відноситься до біології та медицини і може бути застосований для людей та тварин, як лікарський засіб, а саме - N-стеароїлетаноламін (2-(N-октадеканоїл)-аміноетанол), N-пальмітоїлетаноламін (2-(N-гексадеканоїл)-аміноетанол), інших N-ацилетаноламінів (NAE) з довжиною вуглеводневого ланцюга C₈-C₂₄ за винятком N-арахідоноїлетаноламіну та суміші NAE з ацильними залишками з довжиною вуглеводневого ланцюга C₈-C₂₄ для захисту клітин, клітинних органел, тканин, органів від ушкоджень та дії патогенних чинників, з метою фармакотерапії атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, стенокардії спокою та напруги, гострого коронарного синдрому; при функціональних та органічних ураженнях печінки та консервації донорських органів; опійній наркоманії, інтоксикаціях ЦНС; а також, як засоби для лікування інших станів, що супроводжуються ішемією та гіпоксією органів та тканин, реперфузійним синдромом, оксидативним стресом, інтоксикаціями, наркотичною залежністю; запобігання розвитку незворотних структурних змін мембран, а також для істотного підвищення резистентності органів та тканин до дії ушкоджуючих чинників в людини та тварин.

Відомими є способи захисту мембран клітин від ушкоджень шляхом застосування засобів, що мають антиоксидантні властивості - препарати рослинного походження до складу яких входять флавоноїди, вітамінні та полівітамінні препарати [1, 2].

Недоліком відомих способів є те, що антиоксиданти зазвичай опосередковано діють на стан біологічних мембран, запобігаючи їхньому подальшому ушкодженню вільнорадикальними процесами.

Відомо спосіб стабілізації мембран шляхом "вбудовування" в останні есенціальних фосфоліпідів, що входять як активна речовина до складу препаратів Есенціале® та Есенціале-форте® (Aventis, Франція) [1].

Недоліком відомих способів є надто легка окислювальність складників та недостатньо широкий доступ до сировини.

Відомо спосіб лікування та профілактики гострих респіраторних захворювань препаратом Імпульсин (Impulsin® - 2-(N-гексадеканоїл)-аміноетанол або N-пальмітоїлетаноламін, що в 1970-х рр. виробляла компанія SPOFA, Чехословаччина) [3].

Недоліком відомого способу є те, що даний препарат не був рекомендований для його використання у якості мембранопротекторного препарату. Крім того, запропоноване виробництво даного препарату є громіздким, багатостадійним та коштовним.

Відомо спосіб застосування сполук класу каннабіноїдів (алкалоїди марихуани - тетрагідроканнабінол та каннабідіол), як антиоксидантів та нейропротекторів [4].

Недоліком цього способу є те, що алкалоїди марихуани відносяться до сполук, що викликають наркотичну залежність.

Алкалоїд марихуани - тетрагідроканнабінол, зв'язується з каннабіноїдними рецепторами мозку та периферійних тканин. Тим часом, ендогенним лігандом каннабіноїдних рецепторів є анандамід - N-арахідоноїлетаноламін (2-(N-ейкоза-5,8,11,14-тетраеноїл)-аміноетанол), що має виражену антиоксидантну та нейропротекторну дію. Крім того, N-арахідоноїлетаноламін не має значимого аддитивного потенціалу [5].

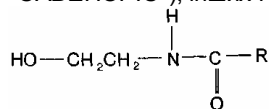
Недоліком даного способу є те, що N-арахідоноїлетаноламін є нестабільною сполукою, оскільки легко окислюється та втрачає свою фармакологічну активність.

Найбільш близьким за технічною суттю, є винахід „N-ацильні похідні аміноспиртів, як терапевтичні агенти проти нейрогенного набряку стовбура периферичних нервів” [6]. Даний винахід запропоновано для попередження та лікування патологій ссавців, включаючи нейрогенні набряки, викликані дегрануляцією тучних клітин.

Недоліком даного прототипу є те, що N-ацильні похідні аміноспиртів рекомендовані для терапевтичного застосування лише у разі дегрануляції та проліферації тучних клітин, яка відбувається внаслідок травматичного, токсичного, дисметаболічного або імуніфекційного ушкодження периферичних нервів.

Задачею винаходу є створення фізично та хімічно стійких у зовнішньому та внутрішньому середовищі сполук, що посідають виражені мембранопротекторні та репаративні властивості, а також здатні корегувати / компенсувати порушення ліпідному клітин та тканин, зокрема стани, що супроводжуються накопиченням в тканинах сполук з високим атерогенним потенціалом - ефірів холестеролу, та інгібувати вільнорадикальні процеси у клітинах та тканинах.

Поставлена задача вирішується шляхом застосування деяких гідроксиамідів жирних кислот, а саме - N-стеароїлетаноламіну (торговельна марка "БЕРЛОКСАР"), N-пальмітоїлетаноламіну (торговельна марка - "САВЕНОРИС"), інших NAE з довжиною вуглеводневого ланцюга C₈-C₂₄ загальної формули:



де R - вуглеводневий ланцюг насиченої або ненасиченої жирної кислоти, за винятком N-арахідоноїлетаноламіну, та суміші NAE з ацильними залишками з довжиною вуглеводневого ланцюга C₈-C₂₄ (торговельна марка - "КАНТИГІЛ"), які здатні модифікувати ліпідний склад мембран клітин та стабілізувати її, а також модулювати метаболізм як за умов активації процесів пероксидного окиснення ліпідів, так і без неї, що і складає основу їхніх мембранопротекторних та фармакотерапевтичних властивостей.

N-пальмітоїл- та N-стеароїлетаноламіни (2-(N-гексадеканоїл)-аміноетанол та 2-(N-октадеканоїл)-аміноетанол, відповідно) - дрібнодисперсні кристалічні порошки білого кольору, масні на дотик, без специфічного запаху та смаку, розчинні у органічних розчинниках, не розчинні у воді, не виділяють токсичних речовин і не створюють вибухонебезпечних сумішей.

Запропоновані фармако-активні препарати можуть бути застосовані у вигляді твердих, рідких та м'яких лікарських форм для внутрішнього та зовнішнього вживання. N-стеароїлетаноламін, N-пальмітоїлетаноламін, інші NAE з довжиною вуглеводневого ланцюга C₈-C₂₄ та суміші NAE з ацильними залишками з довжиною вуглеводневого ланцюга C₈-C₂₄ належать до нетоксичних речовин. Так, ЛД₅₀ для N-пальмітоїлетаноламіну при введенні мишам та щурам per os складає понад 5000мг на кг [IV клас небезпечності згідно ГОСТ 12.1.007-76].

Спосіб захисту мембран від пошкодження включає застосування N-стеароїлетаноламіну, N-пальмітоїлетаноламіну, інших NAE з довжиною вуглеводного ланцюга C₈-C₂₄, за винятком N-арахідоїлетаноламіну, та сумішей NAE з ацильними залишками з довжиною вуглеводного ланцюга C₈-C₂₄, що діють як індивідуально, так і в суміші, і які вводять в організм (перорально, парентерально, інгаляційно, трансдермально, ректально, вагінально, шляхом аплікації на слизові оболонки та інтраюмбально) до, під час або після ушкоджуючого впливу (стан, що супроводжується ішемією та гіпоксією органів та тканин, реперфузійний синдром, оксидативний стрес, інтоксикації), як N-ацильні похідні аміноспиртів у винаході - прототипі.

Реалізація мембранопротекторного ефекту N-стеароїлетаноламіну, N-пальмітоїлетаноламіну, інших NAE з довжиною вуглеводного ланцюга C₈-C₂₄, за винятком N-арахідоїлетаноламіну, та суміші NAE з ацильними залишками з довжиною вуглеводного ланцюга C₈-C₂₄ ілюструються прикладами:

Приклад 1. Обґрунтування фармакотерапевтичного застосування лікарських засобів класу NAE.

Як впливає з даних представлених на Фіг.1, де зображено включення NAE до органів та тканин ссавців, сполуки класу NAE через 20хв. після перорального введення включаються до більшості органів та тканин ссавців. Причому, найбільша їхня кількість включається до аорти, мозку, печінки, наднирників, серця та легенів.

Приклад 2. Вплив лікарського засобу N-стеароїлетаноламіну на вміст ефірів холестеролу за станів, що супроводжуються накопиченням ефірів холестеролу.

Як впливає з даних, представлених у таблиці 1, лікарський засіб N-стеароїлетаноламін, не приводячи до зростання рівня вільного холестеролу, гальмує накопичення ефірів холестеролу в тканині серця щурів за постішемичної реперфузії.

Таблиця 1

Вплив NAE на вміст вільного холестеролу та його ефірів в тканині серця щурів за постішемичної реперфузії

Показники	Рівні вільного холестеролу та його ефірів в тканині серця щурів (10^{-6} моль/г білка та 10^{-9} моль/мг білка відповідно) ($M \pm m$) (n=4-15)		
	контроль	ішемія+реперфузія	ішемія+реперфузія+ лікарський засіб N-стеароїлетаноламін (10^{-7} M)
Вільний холестерол	137,08±12,40	121,80±5,20	124,64±5,34
Ефіри холестеролу	14,06±1,38	63,6217,22*	24,5913,39*#

Примітки: * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з контролем;

- дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групою "ішемія+реперфузія".

Такий ефект лікарського засобу N-стеароїлетаноламіну свідчить про те, що NAE можуть бути застосовані для пригнічення накопичення ефірів холестеролу індукованого оксидативним стресом при ішемічних станах.

Приклад 3. Запобігання розпаду фосфатидилхоліну (ФХ) та надмірному утворенню лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) in vivo при експериментальній ішемії серця щурів, що викликана вазопресином, за допомогою лікарського засобу N-пальмітоїлетаноламіну.

З даних, представлених у таблиці 2, видно, що під дією вазопресину на моделі вазопресинової ішемії серця щурів за методом [7], вірогідно зменшується рівень ФХ та одночасно збільшується у 2,5 рази кількість ЛФХ. Попереднє введення щурам лікарського засобу N-пальмітоїлетаноламіну запобігає розпаду ФХ та акумуляції ЛФХ.

Таблиця 2

Вплив лікарського засобу N-пальмітоїлетаноламіну на рівень фосфатидилхоліну та лізофосфатидилхоліну у тканині серця щурів за гострої ішемії міокарда, змодельованої вазопресином

Фосфоліпіди	Рівні фосфоліпідів у тканині серця щурів (% від загальної кількості фосфоліпідів, $M \pm m$) (n=6-7)			
	інтактних (контроль)	яким вводили лікарський засіб N-пальмітоїлетаноламін ($1 \cdot 10^{-6}$ M)	яким вводили вазопресин (1мкг)	яким вводили лікарський засіб N-пальмітоїлетаноламін ($1 \cdot 10^{-6}$ M) за 10хв до введення вазопресину (1мкг)
Фосфатидилхолін	43,19±0,5	42,15±1,14	41,07±0,8*	41,89±0,6
Лізофосфатидилхолін	0,66±0,1	0,48±0,03*	1,75±0,3*	0,94±0,3 $t_{3,4}=1,91$

Примітки: * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з контролем.

Беручи до уваги те, що надмірне накопичення лізофосфоліпідів є однією з характерних ознак ішемічного ушкодження, можна припустити, що лікарський засіб N-пальмітоїлетаноламін гальмує розвиток деструктивних процесів в тканині ураженого органу. Крім того, ін'єкція його у дозі $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ перед введенням вазопресину гальмує розвиток брадикардії, запобігає змінам амплітуди зубця Т та появі екстрасистол, а отже сприяє покращенню функціональних показників роботи серця.

Таким чином, в дослідях *in vivo* лікарський засіб N-пальмітоїлетаноламін в умовах вазопресинової ішемії міокарду проявляє виражену мембранопротекторну дію, що виявляється у запобіганні як розпаду ФХ, так і накопиченню в тканині міокарду ЛФХ.

Наведені кардіопротекторний та антиаритмічний ефекти лікарського засобу N-пальмітоїлетаноламіну свідчать про можливість його використання при ішемічній хворобі серця, зокрема, гострому коронарному синдромі.

Приклад 4. Нормалізація під впливом лікарського засобу N-стеароїлетаноламіну (NSE) кількості ЛФХ та мітохондріального фосфоліпиду кардіоліпіну (дифосфатидилгліцеролу) у тканині серця щурів за постішемічної реперфузії (Фіг.2). Негативний інотропний та антиаритмогенний ефекти мембранопротекторних препаратів (Фіг.3, 4).

Як видно з Фіг.2, де представлено вплив розчину запропонованого NSE в концентрації 10^{-6}M на кількість деяких фосфоліпідів у тканині ізолюваного серця щурів за умов постішемічної реперфузії ("контроль" - перфузія протягом 1 год., "ішемія-реперфузія" - 10хв. ішемія (припинення постачання перфузійного розчину) + 20-хв. реперфузія; "ішемія-реперфузія + NSE" - 10 хв. ішемія + 20-хв реперфузія з додаванням у перфузат NSE в концентрації $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$; * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з контролем; $n=16-20$), у міокарді ізолюваного серця щурів за вказаних умов зменшується відносна кількість кардіоліпіну. Введення запропонованих препаратів запобігає зменшенню рівня цього фосфоліпиду та сприяє дворазовому зменшенню кількості ЛФХ, який за даними [8, 9], є кардіотоксичним агентом. Крім того, як видно з Фіг.3, де представлено швидкість скорочення міокарда ізолюваного серця щурів за умов постішемічної реперфузії ($+dP/dt$, kPa/сек), введення NSE до перфузійного розчину в концентраціях $1 \cdot 10^{-7}$ та $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ попереджає зростання показників швидкості скорочення та швидкості розслаблення міокарду, а за введення препарату в концентрації $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ виявляє ще і негативну інотропну дію (дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групами: * - контролю; #" - "ішемія-реперфузія"; групи такі, як на Фіг.2).

Як видно з Фіг.4, де зображено кількість екстрасистол у міокарді ізолюваного серця щурів за умов постішемічної реперфузії (показано 60хв. перфузії) (1 - контроль, 2 - "ішемія-реперфузія", 3 - "ішемія-реперфузія + NSE $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$ ", 4 - "ішемія-реперфузія + NSE $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ", 5 - "ішемія-реперфузія + NSE $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ", 6 - "реперфузія + NSE $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) NSE зменшує кількість екстрасистол у міокарді ізолюваного серця щурів (дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групами: * - контролю; #" - "ішемія-реперфузія").

Отже, за постішемічної реперфузії протекторний ефект NSE проявляється у нормалізації кількості ЛФХ та кардіоліпіну, а також негативним інотропним та антиаритмогенним ефектами.

Наведені зміни свідчать про кардіопротекторні властивості препаратів і мають важливе терапевтичне значення.

Приклад 5. Інгібуючий вплив лікарських засобів NSE та N-пальмітоїлетаноламіну (NPE) на процеси пероксидного окиснення ліпідів *in vitro* у мітохондріях печінки щурів в умовах гіпоксичної гіпоксії.

Як випливає з даних, представлених у таблиці 3, в умовах розвитку гострої гіпоксії NSE у концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ - $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ вірогідно пригнічує Fe^{2+} -індуковане утворення ТБК - активних продуктів (продукти, що реагують з тіобарбітуровою кислотою) у мітохондріях печінки щурів.

Максимальний ефект NSE проявляє на 3-й та 15-й хв. експерименту. В той же час, лікарський засіб NPE у концентрації $1,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ вірогідно пригнічує накопичення ТБК-активних продуктів вже на 1-й хв. експерименту, а, починаючи з 5-ї, - запобігає їхньому зростанню (таблиця 4).

Таблиця 3

Вплив лікарських засобів класу NAE на утворення ТБК-активних продуктів у мітохондріях печінки щурів за гострої тканинної гіпоксії

Концентрація N-ацилетаноламінів, M	Вміст ТБК-активних продуктів у мітохондріях печінки щурів (нмоль МДА/мг білка) ($M \pm m$; $n=5$)			
	інтактних (контроль)	гіпоксичних (контроль)	гіпоксичних+інкубація з лікарським засобом NPE	гіпоксичних+інкубація з лікарським засобом NSE
	2,39 \pm 0,04	13,2 \pm 0,60 [@]		
0,5 \cdot 10 ⁻⁴			11,51 \pm 0,96	14,79 \pm 0,35
1 \cdot 10 ⁻⁴			14,04 \pm 0,43	10,76 \pm 0,70*
1,5 \cdot 10 ⁻⁴			13,94 \pm 0,47	11,43 \pm 0,24*
3 \cdot 10 ⁻⁴			13,35 \pm 2,35	10,94 \pm 0,61*

Примітка: [@] - $p < 0,05$ дані вірогідні відносно інтактного контролю;

* - $p < 0,05$ відносно гіпоксичного контролю; час інкубації з N-ацилетаноламінів - 15 хвилин.

Інгібуючий вплив запропонованих препаратів на утворення ТБК-реагуючих продуктів складає основу їхньої мембранопротекторної дії і, можливо, обумовлений їхнім вбудовуванням у мембрани та модифікацією

внаслідок цього, фізико-хімічних властивостей мембран.

Таблиця 4

Вплив лікарських засобів класу NAE на утворення ТБК-активних продуктів у мітохондріях печінки щурів за гострої тканинної гіпоксії

	Вміст ТБК-активних продуктів у мітохондріях печінки щурів (нмоль МДА/г тканини) (M±m; n=5)	
Час інкубації, хвилини	Інкубація з лікарським засобом NSE (1,5*10 ⁻⁴ M)	інкубація з лікарським засобом NPE (1,5*10 ⁻⁴ M)
0	13,24±0,60	13,24±0,60
1	13,43±0,70	11,17±0,43*
3	11,04±0,38*	17,94±1,2
5	13,87±1,23	13,66±0,80
10	13,59±0,43	14,94±0,75
15	11,43±0,24*	13,47±0,47

Примітка: * - p < 0,05 дані вірогідні відносно гіпоксичного контролю (відповідає 0 хвилин інкубації).

Приклад 6. Збільшення активності супероксиддисмутази (СОД) в гомогенаті тканини печінки інтактних та гіпоксичних щурів під впливом NSE.

Як випливає з даних, представлених у таблиці 5, за гіпоксії введення до реакційної суміші NSE у концентрації 1·10⁻⁴M приводить до вірогідного підвищення рівня супероксиддисмутази активності. Отриманий ефект проявляється з 3-ї до 9-ї хвилини експерименту включно.

Збільшення під впливом NSE активності СОД свідчить про посилення антиоксидантного захисту організму.

Наведені вище зміни свідчать про гепатопротекторні властивості препаратів і мають важливе терапевтичне значення.

Таблиця 5

Вплив NSE на активність супероксиддисмутази в гомогенаті тканини печінки інтактних та гіпоксичних щурів

Час реакції, хв.	Активність супероксиддисмутази в тканині печінки щурів (в одиницях оптичної щільності, 1·10 ⁻³ ; M±m)				
	Автоокислення адреналіна гідрохлориду (n=4)	інтактних щурів		гіпоксичних щурів	
		без лікарського засобу NSE (n=8)	з лікарським засобом NSE (n=7)	без лікарського засобу NSE (n=4)	з лікарським засобом NSE (n=4)
1	19,0±4,0	5,0±4,0	14,0±3,0	18,0±1,0	24,0±4,0
2	51,0±5,0	5,0±1,0	7,0±1,0	26,0±3,0	21,0±6,0
3	122,0±6,0	12,0±1,0	18,0±2,0@	44,0±5,0	15,0±1,0*
4	182,0±7,0	32,0±3,0	36,0±3,0	62,0±7,0	20,0±2,0*
5	205,0±1,0	53,0±7,0	56,0±2,0	80,0±8,0	25,0±1,0*
6	182,0±4,0	70,0±4,0	79,0±6,0	129,0±4,0	40,0±3,0*
7	147,0±6,0	110,0±7,0	114,0±7,0	149,0±6,0	76,0±1,0*
8	99,0±6,0	127,0±4,0	127,0±10,0	151,0±13,0	87,0±3,0*
9	77,0±2,0	149,0±4,0	131,0±7,0	143,0±15,0	96,0±6,0*
10	62,0±2,0	154,0±5,0	114,0±8,0@	150,0±26,0	103,0±5,0

Приклад 7. Протекторний вплив NPE на склад фосфоліпідів та жирних кислот, а також на процеси пероксидного окиснення ліпідів печінки щурів за ішемії та реперфузії донорського органу.

Як видно з Фіг.5, де представлено вміст лізофосфатидилхоліну в тканині донорської печінки щурів при різних термінах ішемії (1 - інтактний контроль; 2 - перфузія; 3-4-х годинна ішемія; 4-6-и годинна ішемія; 5 - реперфузія; ЕС - розчин-консервант Євроколлінз; ЕС+NPE - розчин-консервант Євроколлінз, модифікований додаванням NPE, рівень лізофосфатидилхоліну весь час зростає і досягає максимального значення при реперфузії (* - дані вірогідні відносно інтактного контролю, p<0,05).

NPE у концентрації 1·10⁻⁴M попереджає збільшення кількості ЛФХ при перфузії та гальмує накопичення лізофосфоліпідів при ішемії та реперфузії (Фіг.5).

Крім того, додавання до стандартного розчину-консерванту NPE запобігає, протягом усього експерименту, зростанню вмісту ейкозатрієнової, арахідонової кислот, сприяє зростанню докозагексаєнової кислоти, стабілізує вміст лінолевої кислоти (Фіг.6, де представлено вміст деяких жирних кислот в тканині донорської печінки щурів; ЕС - розчин-консервант Євроколлінз; ЕС+NPE - розчин-консервант Євроколлінз,

модифікований додаванням NPE; C18:2 - лінолева кислота; C20:3 - ейкозатриєнова кислота; C20:4 6 - арахідонова кислота; C22:6 3 - докозагексаєнова кислота; * - дані вірогідні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$; # - дані вірогідні відносно ЕС, $p < 0,05$).

Виявлені кількісні зміни індивідуальних жирних кислот свідчать про гальмування деструктивних процесів у донорському органі, що є проявом захисного впливу NPE в умовах ішемії та реперфузії донорського органу (Фіг.7, де представлено склад жирних кислот в тканині донорської печінки щурів; ЕС - розчин-консервант Євроколлінз; ЕС+NPE - розчин-консервант Євроколлінз, модифікований додаванням NPE; * - дані вірогідні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$; @ - дані вірогідні відносно ішемії / ЕС, $p < 0,05$).

Введення до розчину-консерванту NPE також попереджає протягом усього експерименту зміни рівня загального холестеролу та величини відношення холестерол / фосфоліпіди (Фіг.8, де представлено вміст загального холестеролу (А) та величина співвідношення холестерол/фосфоліпіди (Б) в аноксичній печінці щурів; * - дані вірогідні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$).

Як видно з Фіг.9, де представлено вміст ТБК-активних продуктів в тканині донорської печінки щурів (1 - інтактний контроль; 2 - перфузія; 3 - ішемія; 4 - реперфузія; ЕС - розчин-консервант Євроколлінз; ЕС+NPE - розчин-консервант Євроколлінз, що був модифікований додаванням NPE; * - дані вірогідні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$), за 5-хв. перфузії охолодженим розчином ЕС має місце вірогідне зростання рівня ТБК-активних продуктів, яке утримується протягом 4-6 годин ішемії. На 22 годині ішемії та при реперфузії цей показник вірогідно збільшується в 2-2,5 рази. Додавання до розчину ЕС NPE запобігає накопиченню ТБК-активних продуктів під час перфузії, але майже не впливає на цей показник за ішемії та реперфузії.

Отже, додавання NPE до стандартного розчину-консерванту гальмує процеси пероксидативного катаболізму ліпідів, що уповільнює розвиток деструктивних процесів у донорському органі.

Приклад 8. Протекторний вплив NSE на нейрони різних відділів мозку щурів за гострого токсичного ураження морфіном.

Як видно з даних представлених у таблиці 6, через 1 год. після введення токсичної дози морфіну (60мг/кг) у гіпоталамусі щурів більше ніж у двічі зменшується вміст N-ацилфосфатидилетаноламіну, який є попередником NAE.

Таблиця 6

Вплив NSE на вміст N-ацилфосфатидилетаноламіну у гіпоталамусі щурів при гострому отруєнні морфіном

Фосфоліпід	Рівні фосфоліпідів у гіпоталамусі щурів (мкмоль/г тканини) (M±m)(n=5)		
	контрольних	яким вводили морфін	яким вводили морфін +NSE (5мг/кг)
N-ацилфосфатидилетаноламін	0,86±0,17	0,34±0,15*	0,74±0,16#

Примітки: * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з контролем;

- дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групою „морфін”.

Крім того, при гострій інтоксикації морфіном, у стовбурі мозку щурів відбувається збільшення кількості фосфатидилхоліну (таблиця 7).

Таблиця 7

Вплив NSE на вміст фосфатидилхоліну у стовлі мозку щурів при гострому отруєнні морфіном

Фосфоліпід	Рівні фосфоліпідів у стовлі мозку щурів (мкмоль Рі/г тканини) (M±m)(n=5)		
	контрольних	яким вводили морфін	яким вводили морфін + NSE (5мг/кг)
Фосфатидилхолін	19,34±1,01	24,60±1,63*	20,02±0,45#

Примітки: * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з контролем;

- дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з групою „морфін”.

Це може вказувати на токсичне ураження мембран клітин різних відділів мозку щурів під впливом напівлетальної дози морфіну та свідчити про порушення процесів сигнальної трансдукції.

При попередньому пероральному введенні NSE (за 1 год. до введення морфіну) відбувається нормалізація кількості N-ацилфосфатидилетаноламіну та фосфатидилхоліну, що може свідчити про прямий мембранопротекторний ефект NSE за гострої морфінної інтоксикації і може мати адаптивне значення.

Приклад 9. Протекторний вплив лікарського засобу - суміші NAE (оптимальний склад суміші NAE представлено в таблиці 8) на вміст загальних ліпідів та неорганічного фосфору загальних та індивідуальних

фосфоліпідів у тканині мозку щурів за хронічного ураження морфіном.

Таблиця 8

Склад суміші NAE

№ п/п	Жирні кислоти	% від загальної кількості жирних кислот
1	Міристинова	від 5,0 до 20,0
2	Пальмітинова	від 10,0 до 40,0
3	Пальмітолеїнова	від 4,0 до 40,0
4	Стеаринова	від 4,0 до 40,0
5	Олеїнова	від 4,0 до 40,0
6	Ейкозапентаєнова	від 1,0 до 50,0
7	Докозагексаєнова	від 1,0 до 50,0

Примітка: можлива наявність інших жирних кислот у кількості до 30,0%.

Відхилення вмісту окремих жирних кислот в сторону зменшення чи збільшення їх вмісту в суміші NAE призводить до зниження біологічної активності суміші NAE, що заявляється.

Як представлено в таблиці 9, введення лікарського засобу суміші NAE в сумарній курсовій дозі 700мг/кг забезпечує практично повну нормалізацію кількості загальних ліпідів та загальних фосфоліпідів у тканині головного мозку щурів, за хронічного ураження морфіном.

Такий ефект лікарського засобу суміші NAE може бути зумовлений пригніченням викликаного морфіном розпаду ліпідів, а також підвищенням рівня їхнього синтезу.

З даних, представлених у таблиці 10, випливає, що, за хронічної морфінної інтоксикації, істотно знижується кількість деяких фосфоліпідів, а саме, фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, фосфатидилсерину, сфінгомієліну та фосфатидилінозиту.

Таблиця 9

Вплив лікарського засобу суміші NAE на вміст загальних ліпідів та неорганічного фосфору загальних фосфоліпідів у тканині мозку щурів в за хронічної морфінної інтоксикації

Групи тварин	Рівні загальних ліпідів та фосфоліпідів у тканині мозку щурів (M+m) (n=4-15)	
	Загальні ліпіди, (мг/г тканини)	Загальні фосфоліпіди, (мг/г тканини)
контрольні (інтактні)	89,6±1,4	2,00±0,04
які споживали морфін	75,7±2,5*	1,69±0,04*
які споживали морфін + лікарський засіб суміш NAE (700мг/кг)	89,0±2,10#	1,88±0,05#

Примітка: тут і далі позначкою * помічено вірогідні зміни порівняно з інтактним контролем, а міткою # позначено достовірні відмінності порівняно з групою щурів-морфіністів.

Таблиця 10

Вплив лікарського засобу суміші NAE на вміст неорганічного фосфору індивідуальних фосфоліпідів тканини мозку щурів за хронічної морфінної інтоксикації

Фосфоліпіди	Рівні фосфоліпідів у тканині мозку щурів (мкг Рі /г тканини) (M±t) (n=4-15)		
	інтактних	які споживали морфін	які споживали морфін + лікарський засіб суміш NAE (3,5мг/кг)
1	2	3	4
ФХ	672,0±17,0	594,0±18,0*	621,0±22,0
ФЕ	727,0±16,0	663,0±16,0*	706,0±28,0
ФС	236,0±5,0	192,0±7,0*	225,0±9,0#
СМ	121,0±4,0	88,0±6,0*	121,0±13,0#
ФІ	60,0±3,0	42,0±4,0*	51,0±4,0
ЛФС	31,0±6,0	24,0±10,0	26,0±3,0
ФК	28,0±2,0	38,0±6,0	33,0±7,0
КЛ	18,0±3,0	26,0±4,0	39,0±3,1**
Старт	97,0±13,0	49,0±3,0*	50,0±5,0*

Примітка: ФХ - фосфатидилхолін, ФЕ - фосфатидилетаноламін, ФС - фосфатидилсерин, СМ - сфінгомієлін, ФІ - фосфатидилінозитол, ЛФС - лізофосфатидилсерин, ФК - фосфатидна кислота, КЛ - кардіоліпін.

Введення лікарського засобу суміші NAE в дозі 3,5мг/кг приводить до підвищення вмісту вказаних фосфоліпідів та спричиняє приблизно дворазове зростання абсолютної кількості кардіоліпіну.

Отже, протекторний ефект лікарського засобу суміші NAE при хронічній інтоксикації морфіном пов'язаний з нормалізацією ліпідного складу тканини головного мозку, що створює необхідні передумови для нормального функціонування мембрано-пов'язаних процесів.

Приклад 10. Лікарський засіб суміш NAE (склад суміші NAE наведено у таблиці 8) за хронічного ураження морфіном нормалізує викликаний морфіном дисбаланс жирних кислот у тканині головного мозку щурів.

Як представлено в таблиці 11, у щурів, що споживали морфін, істотно зростає рівень насичених жирних кислот з одночасним зниженням кількості ненасичених. Серед ненасичених жирних кислот головні зміни стосуються моноєнових кислот (гептадеценної (C_{17:1ω10}), олеїнової (C_{18:1ω9}), гондової (C_{20:1ω11}), ерукової (C_{22:1ω11})) (таблиця 11, 12). Як наслідок, вірогідно зростає співвідношення насичені/ненасичені жирні кислоти.

Введення лікарського засобу суміші NAE у курсовій дозі 350мг/кг сприяє нормалізації показників вмісту насичених та ненасичених жирних кислот (лінолевої (C_{18:2ω6}), ліноленової (C_{18:3}), арахідонової (C_{20:4ω6}), докозапентаєнової (C_{22:5ω3}), стеаринової (C_{18:0}), арахінової (C_{20:0}), докозадієнової (C_{22:2}) та ізопальмітинової (C_{16:0}), маргаринової (C_{17:0}), ізостеаринової (C_{18:0}) кислот, як показано в таблиці 12) величини співвідношення насичені/ненасичені жирні кислоти.

Таблиця 11

Вплив лікарського засобу суміші NAE на склад жирних кислот тканини головного мозку щурів за хронічної морфінної інтоксикації

Жирні кислоти	Рівні жирних кислот у тканині мозку щурів (% від загальної кількості жирних кислот) (M±m) (n=4-15)		
	інтактних	які споживали морфін	які споживали морфін + лікарський засіб суміш NAE (350мг/кг)
Насичені	46,7±2,9	55,7±1,1*	46,0±0,8#
Ненасичені	52,7±2,8	43,7±1,2*	53,8±0,7#
Моноєнові	37,4±1,9	30,7±0,6*	30,6±0,6*
Дієнові	1,9±0,1	1,8±0,1	2,9±0,5#
Полієнові	13,4±0,8	11,2±1,0	20,3±0,7*#
Насичені/ненасичені	0,92±0,12	1,30±0,06*	0,80±0,03#

Примітка: тут і в таблиці 12 позначкою * помічено вірогідні зміни порівняно з інтактним контролем, а міткою # позначено достовірні відмінності порівняно з групою щурів, які споживали морфін.

Таблиця 12

Вплив лікарського засобу суміші NAE на відсотковий вміст метилових ефірів жирних кислот у тканині головного мозку щурів за хронічної морфінної інтоксикації

Жирні кислоти	Рівень відсоткового вмісту метилових ефірів жирних кислот у тканині мозку щурів (n=4-15) (M±m)		
	інтактних	які споживали Морфін	які споживали морфін + лікарський засіб суміш NAE (350мг/кг)
1	2	3	4
C _{14:0}	0,11 (n=1)	0,13±0,03	0,12±0,01
C _{15:0}	0,39 (n=1)	0,67±0,09*	0,07 (n=1)
C _{16:0}	15,32±1,48	19,04±0,79*	0,13±0,05#
C _{16:0}	0,32±0,02	0,35±0,03	17,22±0,46
C _{16:1 n-9}	0,29±0,03	0,32±0,02	0,47±0,03*
C _{17:0}	1,18±0,78	1,93±0,31	0,23±0,01#
C _{17:1 n-10}	26,45±1,15	29,60±0,85*	0,10±0,01
C _{18:0}	29,19±1,34	24,78±0,36*	0,21±0,02#
C _{18:0}	0,78±0,08	1,05±0,11	23,30±0,24*#
C _{18:1 n-9}	0,19±0,01	0,14 (n=1)	24,98±0,49*
C _{18:2 n-6}	1,58±0,08	1,63±0,09	2,41±0,49*#
C _{18:3}	6,84±0,59	4,86±0,28*	0,12±0,00*#
C _{20:0}	0,53±0,05	0,39±0,03*	1,31±0,07*#
C _{20:1 n-11}	9,67±1,33	7,90±0,71	4,56±0,17*
C _{21:0}	1,77±0,10	1,62±0,12	0,41±0,02
C _{20:3}	0,79±0,03	0,69±0,05	0,56±0,03
C _{20:4 n-6}	1,13±0,11	0,72±0,06*	14,42±0,74*#
C _{22:0}	0,45±0,04	0,87±0,30	1,47±0,04*
C _{22:1 n-11}	2,60±0,13	1,83±0,21*	0,58±0,04*

C _{22:2}	1,99±1,87	2,00±0,20	0,47±0,03*#
C _{22:3}	-	2,75±0,49	-
C _{22:5 n-3}	0,65±0,06	0,78±0,16	3,12±0,12*#
C _{22:6 n-3}	-	-	2,11±0,06
C _{24:0}	-	-	2,21±0,39
Неідентифіковані	-	-	0,21±0,03*#

Такий ефект лікарського засобу суміші NAE лежить в основі його нейропротекторної дії, а вказаний факт пояснює ефективність застосування лікарського засобу суміші NAE при хронічному ураженні морфіном з метою усунення порушень ліпідного складу.

Приклад 11. Вплив лікарського засобу суміші NAE (склад суміші NAE представлено в таблиці 8) на обсяг споживання розчину морфіну щурами за хронічної морфінної інтоксикації.

Як випливає з даних, наведених на таблиці 13, щури з хронічною морфінною інтоксикацією далі нарощували обсяги добровільно спожитого морфіну.

Призначення лікарського засобу суміші NAE у курсовій дозі 35мг/кг сприяло вірогідному скороченню добровільного споживання щурами 0,01% водного розчину морфіну (таблиці 13).

Наведені вище (у прикладах 8-9) факти переконливо засвідчують, що нормалізація ліпідного складу тканини головного мозку у щурів за хронічної інтоксикації морфіном забезпечує добровільне скорочення споживання морфіну та здійснює терапевтичний вплив на наркотичну залежність у піддослідних тварин.

Таблиця 13

Обсяги споживання 0,01% водного розчину морфіну щурами за хронічної морфінної інтоксикації до призначення та після призначення лікарського засобу суміші NAE

Групи тварин	Кількість розчину морфіну, що була спожита щурами (мл, пересічно за добу) (M±m) (n=4-15)		
	протягом 7-го тижня споживання морфіну	протягом 8-го тижня споживання морфіну	відсоток зміни споживання
контрольні (інтактні)	-	-	-
які споживали морфін	4,32±0,50	5,72±0,90	+32,4%
які споживали морфін + лікарського засобу суміші N-ацилетаноламінів (35мг/кг)	5,48±0,58	2,82±0,51*	-48,5%

Примітка: позначкою * помічено вірогідні зміни, порівняно зі щурами з експериментальною морфінною залежністю до призначення лікарського засобу суміші NAE.

Наведені дані чітко засвідчують нейропротекторні властивості лікарського засобу суміші NAE та можливості його використання для фармакотерапії наркотичної залежності.

Приклад 12. Адаптогенна дія NSE - стимуляція стероїдогенезу в корі надниркових залоз щурів in vivo та in vitro.

Як видно з таблиці 14, де показано вплив іммобілізаційного стресу (протягом 45хв.) та дворазового (з інтервалом 45хв.) внутрішньо-черевинного введення NSE у дозі 5мг/кг на вміст 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) у плазмі крові щурів, внутрішньочеревинне введення запропонованого препарату у дозі 5мг/кг маси тіла сприяє збільшенню рівня 11-ОКС у крові щурів (дані вірогідні (p₁₋₂>0,5; p₂₋₃<0,001; p₄₋₅<0,01; p₂₋₄<0,001; p₃₋₅<0,01)).

Таблиця 14

Вплив NSE на рівень 11-ОКС у плазмі крові нормальних та стресованих щурів

Групи тварин	Контроль	Розчинник	NSE	Стрес	NSE+ стрес
Вміст 11-ОКС, мкмоль/л плазми (M±m; n=4-12)	1,3±0,15	1,3±0,25	2,8±0,1*	3,1±0,25*	5,3±0,6*#

Примітки: у якості розчинника брали суміш пропіленгліколя, етилового спирту та фізіологічного розчину у співвідношенні - 1:1:1, відповідно; * - дані вірогідні (p<0,05) при порівнянні з контролем; # - дані вірогідні (p<0,05) при порівнянні з групою "стрес".

Зростання рівня 11-ОКС відбувається як у контрольних щурів, у котрих кора надниркових залоз знаходиться у "спокійному" стані, так і у щурів, яких піддавали стресуванню за відомим методом [10], а отже вони мали підвищений "фоновий" рівень 11-ОКС. Наведені дані свідчать про незалежний механізм стимуляції кори надниркових залоз запропонованими препаратами і ендогенним кортикотропіном.

Як видно з таблиці 15, де представлено вплив NSE (1·10⁻⁵М) на включення мітки [³H]-холестеролу в альдостерон і кортикостерон (% від контролю), під впливом препарату відбувається включення мітки холестеролу у синтезовані гормони - альдостерон та кортикостерон, що свідчить про прямий вплив препарату

на тканину кори надниркових залоз (дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з контролем).

Таблиця 15

Включення мітки холестеролу в альдостерон і кортикостерон під час стероїдогенезу в зрізах кори надниркових залоз за дії різних концентрацій NSE

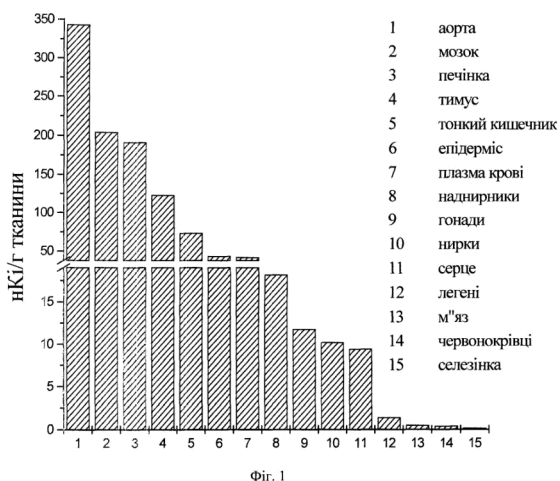
NSE, M	Радіоактивність альдостерону, %	Радіоактивність кортикостерону, %
	(M±m; n=4-12)	
0	100±2	100±2
$1 \cdot 10^{-7}$	102±20	85±11
$1 \cdot 10^{-8}$	122±58	78±12
$1 \cdot 10^{-5}$	130±9*	117±9*

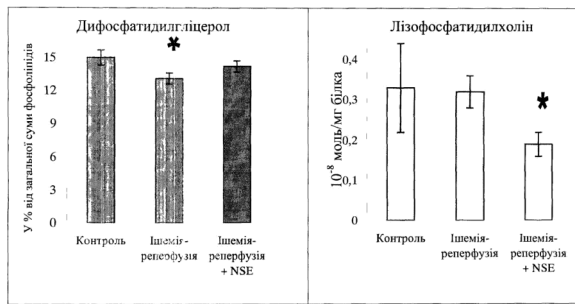
Примітки: * - дані вірогідні ($p < 0,05$) при порівнянні з контролем

Таким чином, проведені дослідження підтвердили потужні фармакологічні властивості препаратів, що заявляються, і є достатньо обґрунтованими для їх широкого застосування для людей та тварин для захисту мембран клітин, клітинних органел, тканин, органів від різноманітних ушкоджуючих впливів (стани, що супроводжуються ішемією та гіпоксією органів та тканин, реперфузійний синдром, оксидативний стрес, інтоксикація), запобігання розвитку незворотніх структурних змін мембран, а також для істотного підвищення резистентності органів та тканин до дії ушкоджуючих чинників.

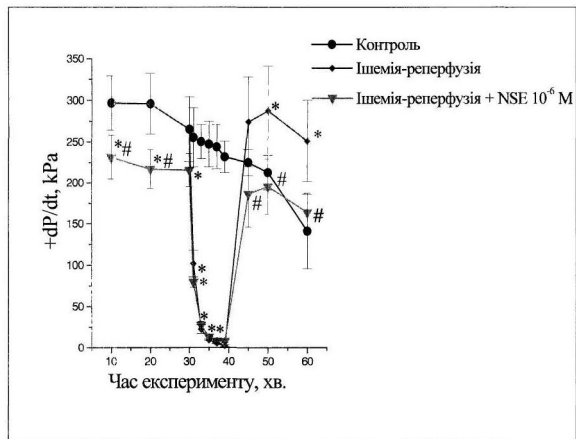
Джерела інформації, які взяті до уваги при складанні заявки:

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2т.-14-е изд., перераб., испр. и доп.-М.:ООО «Издательство Новая Волна», 2000.-540с.
2. Патент України №24682 С2 6 А61К31/355, А61Р39/06, опубл. 15.05.2002, Бюл.№5, 2002р.
3. MaSek K., Perlik F., Klima J. et al. Prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin®) in acute respiratory tract infections. // Europ. J. Clin. Pharmacol.-1974.-7.-P.415-419.
4. Pat (6,630,507 USA A61K031/35. Cannabinoids as antioxidants and neuroprotectants / AJ. Hampson, J. Axelrod, M. Grimaldi. - Publ. 7.10.2003.
5. Aceto MD, Scates SM, Razdan RK, Martin BR. Anandamide, an endogenous cannabinoid, has a very low physical dependence potential // J Pharmacol Exp Ther.- 1998.-287(2).-P.598-605.
6. Pat 5,679,667 USA A61K031/555; A61K031/56; A61K031/44; A61K031/385; A61K031/38; A01N037/12. Aminoalcohols-N-Acyl derivatives as therapeutic agents against the neurogenic endoneural edema of the peripheral nerve. /F. Delia Valle, S. Lorenzi, F. Delia Valle. -Publ. 21.10.1997.
7. Pat 3,254,029 USA. Dry-cleaning detergent composition / J.A. Piepmeyer -Publ. 31.05.1966.
8. Pat 2,863,888 USA. Process for the production of fatty acid hydroxyamides / J.V.Schurman, N.J. Cadweil - Publ. 9.12.1958.
9. Pat 2,394,833 USA. Wax composition / H.H. Yong, D. Rubinstein - Publ. 12.02.1946.
10. Фролькис В.В., Головченко С.Ф., Медведь В.И. Вазопрессин и сердечно-сосудистая система // Успехи физиол. наук.-1983.-Т.14, №2.- С.56-81.
11. Corr PB, Sobel BE. Arrhythmogenic properties of phospholipid metabolites associated with myocardial ischemia // Fed. Proc.-1983.-42(8).-P.2454-9.
12. Kirmaird AA, Choy PC, Man RY. Lysophosphatidylcholine accumulation in the ischemic canine heart // Lipids.-1988.-23(1).-P.32-5.
13. Филаретов А.А. Принципы и механизмы регуляции гипоталамо-адренокортикальной системы, - Ленинград, -«Наука».-1987.

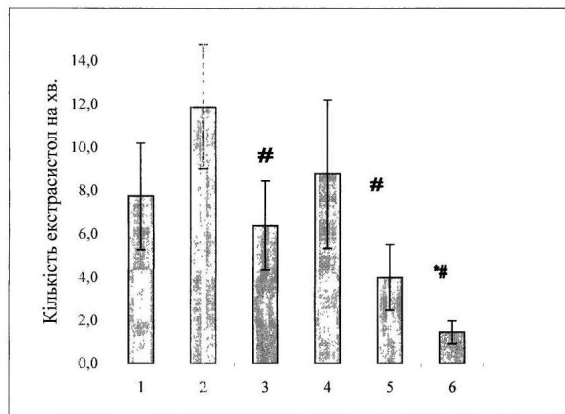




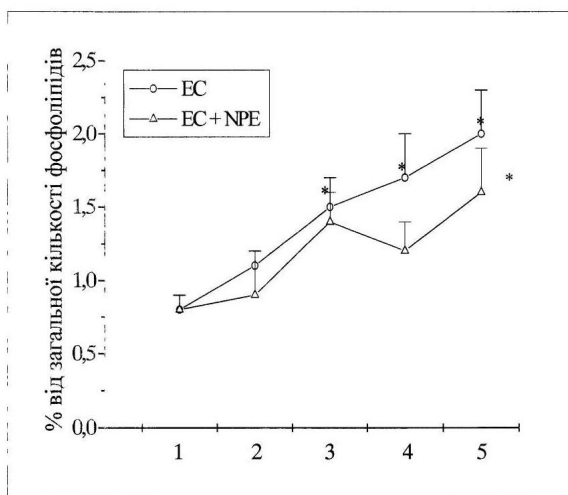
Фіг. 2



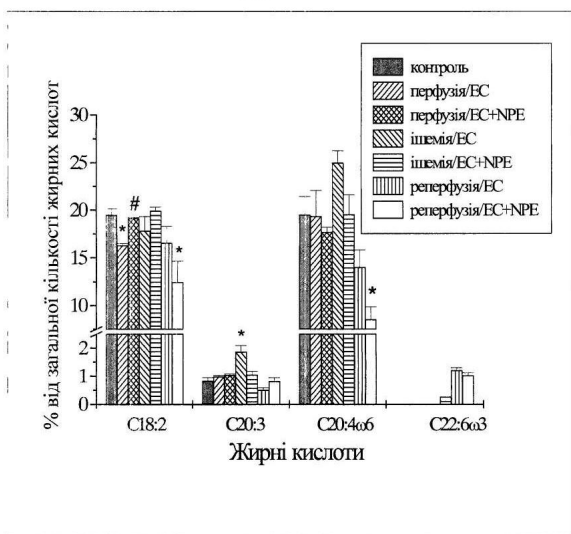
Фіг. 3



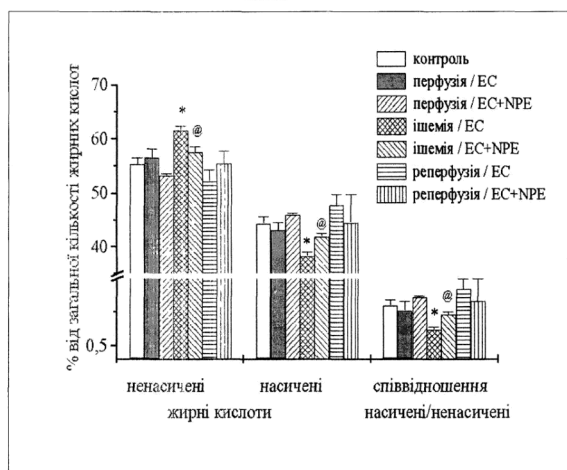
Фіг.4



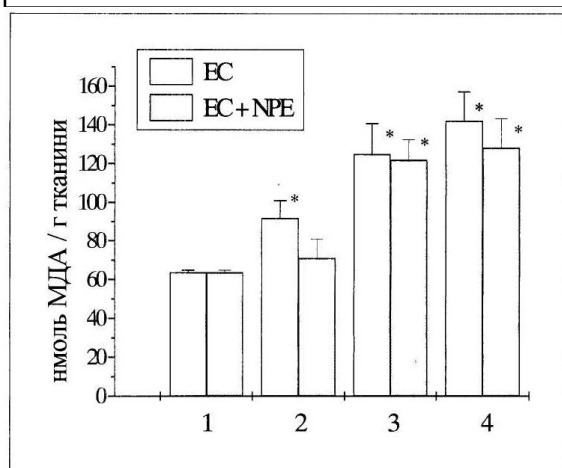
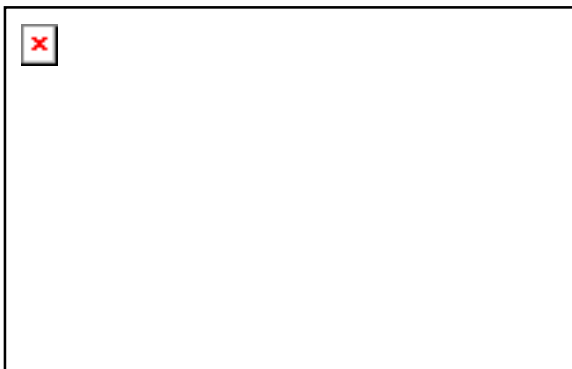
Фіг.5



Фіг.6



Фіг.7



Фиг.9