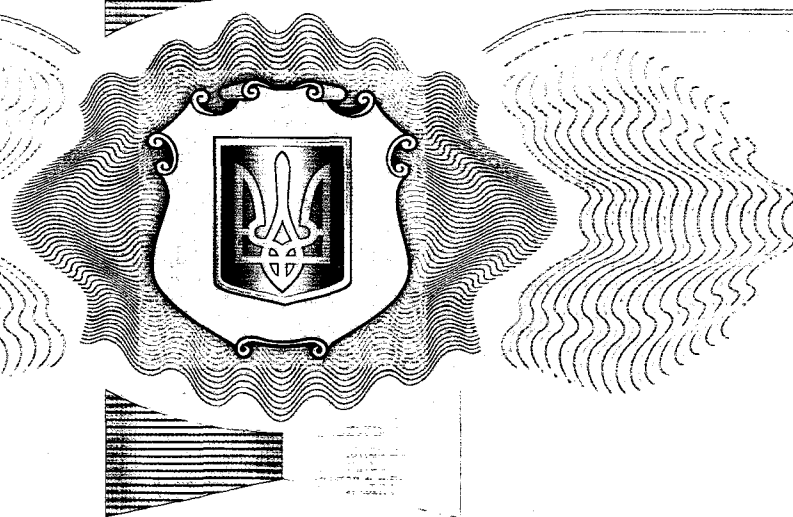


Україна

UKRAINE



ПАТЕНТ

НА ВІНАХІД

№ 85523

**ЗАСТОСУВАННЯ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ ЯК  
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ТЕРАПІЇ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ  
І ТА ІІ ТИПІВ**

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

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи  
**26.01.2009.**

Голова Державного департаменту  
інтелектуальної власності

М.В. Паладій





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85523** (13) **C2**  
(51) **МПК (2009)**  
**A61K 31/164**  
**A61P 3/10 (2008.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ ЯК ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ТЕРАПІЇ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ I ТА II ТИПІВ**

1

2

(21) a200708180

(22) 18.07.2007

(24) 26.01.2009

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) ГУЛА НАДІЯ МАКСИМІВНА, UA, КОСЯКОВА ГАЛИНА ВАСИЛІВНА, UA, БЕРДИШЕВ АНДРІЙ ГЕННАДІЙОВИЧ, UA

(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, UA

(56) UA 77 278 C2, 15.11.2006

Hula N.M., Kosiakova H.V., Kindruk N.L., Khmel' T.O.: "Effect of N-stearoylethanolamine on the level of stable NO metabolites in different pathological conditions which are accompanied by oxidative stress", Ukr Biokhim Zh. 2005 May-Jun;77(3):113-9

Artamonov M.V., Zhukov O.D., Marhitych V.M., Klimashevs'kyi V.M., Hula N.M.: "Effect of exogenous N-stearoylethanolamine on fatty acid composition of individual phospholipids in the isolated rat heart under postischemic reperfusion", Ukr Biokhim Zh. 2002 Mar-Apr;74(2):86-94

Gulaya N.M., Kuzmenko A.I., Margitich V.M., Govseeva N.M., Melnichuk S.D., Goridko T.M., Zhukov A.D.: "Long-chain N-acylethanolamines inhibit lipid peroxidation in rat liver mitochondria under acute hypoxic hypoxia", Chem Phys Lipids. 1998 Dec;97(1):49-54

(57) Застосування N-стеароїлетаноламіну як лікарського засобу для терапії цукрового діабету I та II типів, ускладнених ангіопатіями, що має гіпоглікемічні та ангіопротекторні властивості.

Вінахід відноситься до біології та медицини і може бути застосований в людей та тварин, а саме як лікарський засіб N-стеароїлетаноламін (NSE), здатний знижувати вміст глюкози в крові, чинити ангіопротекторний та мембраностабілізуючий вплив, застосовується при фармакотерапії цукрового діабету I та II типу, ускладненого ангіопатіями.

Серед пероральних протидіабетичних препаратів найбільшого поширення знайшло застосування похідних сульфонілсечовини та бігуанідів. Відомий препарат "Гліклазид" (Gliclazidum) належить до похідних сульфосечовини II покоління, застосовується для лікування інсуліннезалежного цукрового діабету, має гіпоглікемічну та ангіопротекторну дію. Недоліком препарату є протипоказання при застосуванні у хворих з цукровим діабетом I типу, печінковою та нирковою недостатністю, а також низка побічних явищ, як то нудота, діарея, еритроцитопенія, тромбоцитопенія, гемолітична анемія [1].

Відомий препарат "Метформін" (Metforminum) - пероральний протидіабетичний засіб групи бігуанідів, застосовується для лікування цукрового діабету у хворих із порушеннями ліпідного обміну та

ожирінням. Недоліком цього препарату є протипоказання застосування його при лактатному ацидозі, печінковій недостатності, цирозі печінки, інфекційних захворюваннях, лейкозі та гіповітамінозі B<sub>1</sub>, а також у людей похилого віку [1].

Відомо спосіб застосування ендогенних лігандів каннабіноїдних рецепторів - анандаміду (N-арахідоноїлетаноламіну) та 2-арахідонілгліцеролу. Показана здатність цих сполук до регуляції секреції інсуліну, що реалізується через модуляцію Ca<sup>2+</sup>-сигналу в інсулінсекретуючих клітинах і опосередкована зв'язуванням із каннабіноїдними рецепторами (CB2) [2]. Крім того, N-арахідоноїлетаноламін за позарецепторним механізмом посилює інсулін-стимульовану утилізацію глюкози адипоцитами [3]. Недоліком даного способу є те, що N-арахідоноїлетаноламін є нестійкою сполукою і легко втрачає фармакологічну активність в результаті окиснення, а також має виражену психотропну активність і викликає залежність.

В основу вінаходу поставлена задача знайти ефективний та недорогий препарат, який можна отримати з вітчизняної сировини, фізично та хімічно стійкий у зовнішньому та внутрішньому середовищі, що володіє гіпоглікемічною дією, здатний

(13) **C2**

(11) **85523**

(19) **UA**

чинити ангіопротекторний вплив, коригувати та компенсувати порушення ліпідного обміну, інгібувати вільнорадикальні процеси у клітинах та тканинах.

Задача вирішується шляхом застосування N-стеароїлетаноламіну як препарату для лікування цукрового діабету I та II типу, що ускладнені діабетичними ангіопатіями.

Суть винаходу полягає у здатності NSE знижувати вміст глюкози у крові, чинити ангіопротекторний вплив, відновлюючи ендотелій-залежні судинні реакції у щурів із стрептозотоциновим цукровим діабетом, а також здатна модифікувати та стабілізувати ліпідний склад клітинних мембран за умов активації процесів перекисного окиснення, що і складає основу протидіабетичних фармакотерапевтичних властивостей пропонованого препарату.

N-стеароїлетаноламін запропонований до застосування як лікарський засіб для 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, для лікування станів, що супроводжуються ішемією та гіпоксією органів та тканин, реперфузійним синдромом, оксидативним стресом, наркотичною залежністю, запобігання розвитку незворотних структурних змін мембран, а також для істотного підвищення резистентності органів та тканин до дії ушкоджуючих чинників у людини та тварин [4].

Запропонований препарат може бути застосований перорально у вигляді твердих, рідких та м'яких лікарських форм для внутрішнього вживання.

#### Приклад 1

Гіпоглікемічна дія NSE за умов стрептозотозин-індукованого діабету у щурів.

В дослідженні використовували щурів-самців лінії Вістар, вагою 250-280г. Цукровий діабет індукували одноразовим введенням тваринам розчину стрептозотозину, внутрішньоочеревинно, з розрахунку 50мг/кг ваги [5]. Окремо була виділена група інтактного контролю (n=21). Розвиток захворювання контролювали за зростанням вмісту глюкози в крові. Вміст останньої визначали о-толуїдиновим методом [6] з використанням стандартних наборів реактивів для фотометричного визначення глюкози в біологічних рідинах ("Філіст Діагностика",

Україна). Через 4 тижня після індукції діабету була відібрана група щурів (n=15), що отримувала водну суспензію NSE, per os, з розрахунку 50мг/кг ваги, протягом 10 днів після чого тварин забивали під нембуталовим наркозом. Через 12 тижнів після індукції діабету (стадія судинних ускладнень захворювання) щурів було поділено на 2 групи: перша - контрольна (n=30), тварини другої групи (n=34) отримували водну суспензію NSE, per os, з розрахунку 50мг/кг ваги, протягом 10 днів. По закінченню експерименту тварин забивали під нембуталовим наркозом.

В крові щурів визначали вміст глюкози вищезазначеним методом.

Дані, наведені на Фіг.1. демонструють, що виражений гіпоглікемічний ефект суспензії NSE (50мг/кг) проявляється як на початкових, так і на розвинутих стадіях цукрового діабету.

На Фіг.1: Вплив NSE на вміст глюкози в крові щурів із стрептозотозин-індукованим діабетом.

1 - вихідний стан;

2 - через 4 тижні після індукції діабету;

3 - через 12 тижнів після індукції діабету.

Примітки: \* - дані вірогідні (p<0,05) при порівнянні із значеннями у вихідному стані;

# - дані вірогідні (p<0,05) при порівнянні із значеннями у групі без NSE.

Вважають, що оксид азоту мімікрує або опосередковує більшість ефектів інсуліну, в тому числі стимуляцію транспорту та окислення глюкози [7]. Зв'язування інсуліну з рецептором викликає активацію конститутивної NO-синтази (cNOS), а в еритроцитах крові сам інсуліновий рецептор проявляє NO-синтазну активність [8]. Висувають припущення щодо месенджерної ролі NO в реалізації ефектів інсуліну [8]. Проте ефект оксиду азоту реалізується і без стимуляції інсуліном [9]. Крім того, відомо, що оксид азоту має потужні антиагрегаційні властивості [10]. Експериментально доведено, що за умов діабету, в результаті розвитку аутоімунного процесу відбувається активація індукційної ізоформи NO-синтази (iNOS), що супроводжується різким зниженням активності cNOS і, відповідним зменшенням кількості біодоступного NO [11].

Як показано в таблиці 1, введення щурам із стрептозотозинним діабетом суспензії NSE спричиняє інгібування активності iNOS, що сприяє відновленню активності cNOS в ендотелії аорти тварин.

Таблиця 1

Активність ізоформ NO-синтази (cNOS та iNOS) в аорті щурів із стрептозотозин-індукованим діабетом за умов введення NSE (M±m; n=30-34)

Ізоформи NOS	Контроль	Діабет	Діабет +NSE
cNOS пмоль/хв/мг білка	82,64±11,42	10,13±1,29*	187,84±13,2*#
iNOS пмоль/хв/мг білка	43,35±5,98	178,15±14,23*	0,20±0,03*#

Примітки: \* - дані вірогідні (p<0,05) при порівнянні з групою "Контроль";

# - дані вірогідні (p<0,05) при порівнянні з групою "Діабет"

Подібний ефект препарату отримано на еритроцитах діабетичних щурів (Фіг.2). Такий вплив NSE свідчить про те, що препарат викликає нормалізацію процесів синтезу NO за умов цукрового діабету як в ендотелії судин, так і в клітинах крові (еритроцити), що, в свою чергу, сприяє покращенню утилізації глюкози в периферійних тканинах.

На Фіг.2: Активність ізоформ NO-синтази (сNOS та iNOS) в еритроцитах щурів із стрептозотин-індукованим діабетом за умов введення NSE ( $M \pm m$ ;  $n=30-34$ ).

Примітки: \* - дані вірогідні ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з групою "Контроль";

# - дані вірогідні ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з групою "Діабет".

Реалізація ангіопротекторного впливу препарату за умов цукрового діабету ілюструється Прикладом 2.

#### Приклад 2

Вплив NSE на реакції розслаблення аорти щурів із цукровим діабетом у відповідь на ацетилхолін після попереднього скорочення під впливом норадреналіну.

В дослідженнях були використані фрагменти аорти щурів із стрептозотин-індукованим діабетом. Ширина кільцевого фрагменту не перевищувала 1мм, маса - 0,5-0,7мг. Препарати ставили в проточну термостатовану (35-36°C) камеру, яка була заповнена буферним розчином Кребса такого складу (ммол/л): NaCl - 133,0, KCl - 4,7, NaHCO<sub>3</sub> - 16,3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,38, CaCl<sub>2</sub> - 2,5, MgCl<sub>2</sub> - 1,05, глюкоза - 7,8, тріс - 10,0, рН 7,4. У камері препарат піддавали пасивному розтягненню силою 1,6-1,8мН і витримували в такому стані 30-60хв. Скорочувальну активність гладеньких м'язів грудного відділу аорти реєстрували за допомогою механоелектричного перетворювача 6МХ1С у режимі, що наближався до ізометричного. Активацію гладеньких м'язів здійснювали додаванням до буферного розчину норадреналіну ( $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л, "Sigma", США). Сталий рівень цього скорочення приймали за 100%. Від нього проводили розрахунки змін амплітуди розслаблення гладеньких м'язів на ендотеліязалежний агоніст - ацетилхолін йодид,  $10^{-5}$  моль/л, "Sigma", США.

Як видно з результатів фізіологічних досліджень (Фіг.3), NSE сприяє відновленню судинних реакцій на ацетилхолін у щурів із стрептозотин-індукованим діабетом. Ацетилхолін, як відомо, є агоністом мускаринових рецепторів. Він викликає розслаблення гладеньких м'язів за умов цілісності ендотелію, оскільки цей ефект опосередкований дією NO, який синтезується ендотелієм судин. Таким чином, відновлення ендотеліязалежних реакцій розслаблення гладеньких м'язів аорти щурів із стрептозотин-індукованим діабетом за умов введення NSE є свідченням нормалізації функціонального стану ендотелію судин.

На Фіг.3: Ацетилхолінова реакція аорти щурів.

Примітки: \* - дані вірогідні ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з групою "Контроль";

# - дані вірогідні ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з групою "Діабет"

#### Приклад 3

Вплив NSE на фосfolіпідний склад мембран еритроцитів щурів із стрептозотин-індукованим діабетом.

Відомо, що однією з ланок патогенезу судинних ускладнень за умов абсолютного або відносного дефіциту інсуліну є порушення функціонального стану мембран еритроцитів, що проявляється у збільшенні їх мікрів'язкості та значному зниженні здатності еритроцитів до деформації. Такі зміни перешкоджають проходженню еритроцитів через систему мікроциркуляції і можуть бути причиною гіпоксії тканин та мікроангіопатій за цукрового діабету [12]. Відомо, що в структурних та функціональних порушеннях мембран суттєву роль відіграють мембранні ліпіди.

Реалізація мембранопротекторного ефекту препарату ілюструється таким прикладом.

Як показано у таблиці 2, під впливом NSE нормалізується вміст основних фосfolіпідів мембран еритроцитів щурів із цукровим діабетом, знижується кількість лізоформ фосfolіпідів, що може позитивно впливати на мікрів'язкість, плинність еритроцитарних мембран, активність мембранозв'язаних ферментів та здатність еритроцитів до деформації і, в цілому сприяти відновленню функціонального стану еритроцитів.

Таблиця 2

Вплив NSE на фосfolіпідний склад мембран еритроцитів щурів із стрептозотин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ , мкг/мг білка)

	Контроль	Діабет	Діабет+NSE
Загальний фосфор	202,28±4,32	178,12±2,75*	198,89±5,44#
Фосфатидилетаноламін	38,32±0,42	20,46±0,14*	36,33±0,89#
Фосфатидилхолін	55,31±2,44	38,36±0,98*	44,28±1,98#
Сфінгомелін	32,34±0,54	26,62±1,98*	29,87±2,48
Лізофосфатидилетаноламін	9,25±1,42	14,12±2,32*	10,22±1,78#
Лізофосфатидилхолін	8,05±0,14	12,45±0,78*	8,57±0,44#
Фосфатидилінозитол	3,28±0,02	2,32±0,06*	4,56±0,03#

Примітки: \* - дані вірогідні ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з групою "Контроль";

# - дані вірогідні ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з групою "Діабет".

Таким чином, результати досліджень демонструють гіпоглікемічні, ангіопротекторні та мембраностабілізуючі властивості N-стеароїлетаноламіну за умов експериментального цукрового діабету і можуть служити обґрунтуванням для застосування його як терапевтичного засобу для лікування цукрового діабету I та II типу.

Джерела інформації, що взяті до уваги при складанні заявки.

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2т. Т.1, - 14 изд., М.: ООО "Изд-во Новая Волна", - 2000 - 608с.

2. Juan-Pico P., Fuentes E., Bermudez-Silva F.J., et al. Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. // Cell Calcium. - 2006 - 39(2) - P.155-162.

3. Gasperi V., Fezza F., Pasquariello N., et al. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. // Cell Mol Life Sci. - 2007. 64(2) - P.219-229.

4. UA, 77182, 15.11.2006.

5. Baydas G., Sonkaya E., Tuzcu M., et al. Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats. // Acta Pharmacologica Sinica. - 2005. - 26. - P.417-422.

6. В.Г. Колб, В.С. Камышников / Клиническая биохимия. - Минск: "Беларусь", 1976. - 312с.

7. Young M.E., Radda G.K., Leighton B. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. // Biochem. J. - 1997. - 322. - P.223-238.

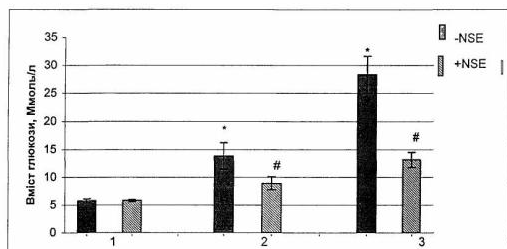
8. Kahn N.N., Acharya K., Bhattacharya S., et al. Nitric Oxide: The "Second Messenger" of Insulin. // IUBMB Life. - 2000. - 49. - P.440-450.

9. Higaki Y., Hirshman M.F., Fujii N., Goodyear L.J. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. // Diabetes. - 2001. - 50(2). - P.241-247.

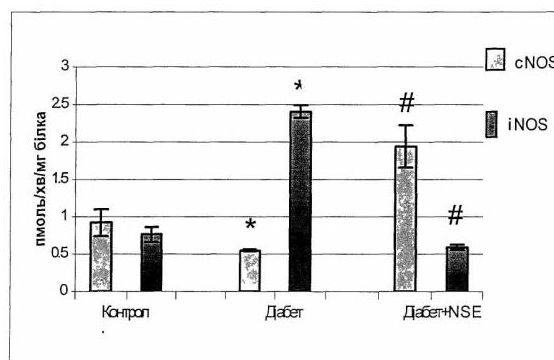
10. О.В. Синяченко, Т.В. Звягина. Оксид азота в терапевтической практике. - Донецк: ООО "Юго-Восток, Лтд", 2001. - 258с.

11. К.П. Зак, Т.Н. Малиновская, Н.Д. Тронько. Иммуитет у детей, больных сахарным диабетом. - Киев: "Книга плюс", 2002. - 111с.

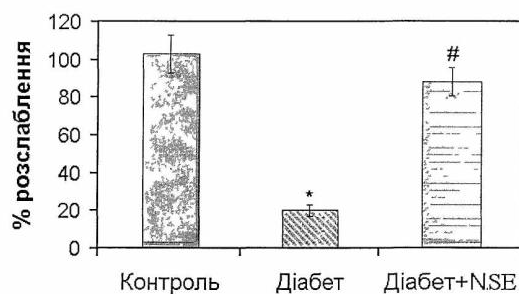
12. Касимова Г.М., Мирталипов Д.Т., Абидов А.А., Акбаров З.С. Липиды эритроцитов при сахарном диабете с сосудистыми поражениями. // Вопр. мед. химии. - 1989. - 35, №3. - С.42-46.



Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3