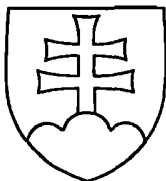


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 09.02.1998
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/800 737
(32) Dátum priority: 15.02.1997
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 07.11.2000
(86) Číslo PCT: PCT/US98/02267, 09.02.1998

(21) Číslo dokumentu

1105-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

A 61K 31/445
A 61K 31/16

(71) Prihlasovateľ: EDELSTAM INC., Lake Oswego, OR, US;
Edelstam Greta, Saltsjo-Duvnas, SE;

(72) Pôvodca vynálezu: Edelstam Greta, Saltsjo-Duvnas, SE;

(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: Liek proti neplodnosti a na zvýšenie plodnosti

(57) Anotácia:
Je opisované použitie lokálneho anestetika na výrobu lieku, ktorý sa používa proti neplodnosti alebo na zvýšenie plodnosti, kde lokálne anestetikum je vybraté zo skupiny zahŕňajúcej bupivakain, lidokain, mepivakain, prilokain a ropivakain.

Liek proti neplodnosti a na zvýšenie plodnosti

Oblasť techniky

Súčasný vynález sa týka využitia lokálneho anestetika na výrobu lieku proti neplodnosti a na zvýšenie plodnosti. Taktiež sa týka farmaceutickej zlúčeniny, ktorá sa skladá z farmaceuticky účinnej dávky lokálneho anestetika s farmaceuticky prijateľným vehikulom. Taktiež sa týka spôsobu zvýšenia plodnosti u žien pomocou spomenutej farmaceutickej zlúčeniny.

Doterajší stav techniky

Neplodnosť alebo znížená plodnosť je pre postihnutých ľudí problémom. IVF (oplodnenie v skúmavke) je bežným spôsobom liečby neplodných žien. Podstata IVF liečby je nasledujúca:

Stimulácia ovulácie: denné hormonálne injekcie, vyšetrenie ultrazvukom a krvné testy.

Odber vajíčok: v lokálnej anestézii urobený odber cez pošvu punkciou vaječníkov pod ultrazvukovou kontrolou.

Príprava spermií: plaviaca alebo iná metóda na výber optimálnej populácie s najlepšou pohyblivosťou.

Oplodnenie v skúmavke: inkubácia vajíčok a vybranej populácie spermií v bunkovom inkubátore. Priama mikroskopická kontrola bunkového delenia a výber najviac životaschopných blastocytov.

Prenos embrya: 2 – 3 najviac životaschopných blastocytov sa umiestni do dutiny maternice a dúfa sa, že sa uhniesdia v sliznici maternice.

IVF je drahým spôsobom liečby a u niektorých párov vyvoláva psychologické vedľajšie účinky. Technický a umelý spôsob pokusu o otehotnenie má pre pár, ktorý túto liečbu podstupuje nevýhody, ktoré môžu mať vplyv i na vzájomný vzťah. Po ukončení namáhavej liečby je tehotenský pomer len 25 – 30 % a zanecháva tých, ktorí neuspeli s narušeným vzájomným vzťahom a stále bezdetných. Náklady na IVF liečbu sú 20 000 až 25 000 SEK na jeden menštruačný cyklus.

Navzdory niekoľkým predchádzajúcim výzkumom nie je zrejmy ani dôvod neplodnosti v endometrióze ani to, že nedochádza k zvýšeniu plodnosti po jej liečbe. Obzvlášť je nejasný vzťah medzi ľahkou endometriózou a zníženou plodnosťou tam, kde nie sú prítomné panevné zrasty (Mahmood, TA, Templeton A. *Patophysiology of mild endometriosis: review of literature. Human Reproduction* 1990; 5:765 - 784).

U pacientiek so slizničnými implantátmi na pobrušnici sa nachádza zvýšený počet bielych krviniek v dutine brušnej a hodnotí sa ako prebiehajúci sterilný zápal. (Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB: *Peritoneal fluid cell population in infertility patients. Fertil Steril* 1981, 35:696 – 698; Edelstam GAB, Lundkvist OE, Venge P, Laurent TC: *Hyaluronan a myeloperoxidase in the peritoneal fluid during genital inflammation. Inflammation* 1994, 18: 13 - 21). Zvýšený počet bielych krviniek obsahuje *in vivo* senzibilizované makrofágy, ktoré secernujú rastový faktor odvodený od makrofágov (MDGF) a to môže vysvetľovať proliferáciu tkaniva sliznice materničnej. (Halme J, White C, Kauma S, Estes J, Haskill S. *Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity in Vitro. J Clin Endocrin and Metabolism.* 1988; 66: 1044 - 49). Ďalšie sekrečné produkty makrofágov, rastové faktory ako je TNF a interferon, sa vyznačujú toxicitou na pohlavné bunky a majú tiež nežiadúci vplyv na proces oplodnenia (Halme J: *Role of peritoneal inflammation in endometriosis – associated infertility. Ann NY Acad Sci* 1991; 622: 266 - 74).

Taktiež brušná tekutina bez buniek je dôležitá pri zníženej plodnosti a bolo dokázané, že významne znižuje schopnosť vlákien vajcovodov dopravovať vajíčko. (Suginami H, Yano K, Watanbe K, Matsnura S: *A factor inhibiting ovum capture by the oviductal fimbriae present in endometriosis peritoneal fluid. Fertil Steril* 1986; 46: 1140 - 1146). V brušnej tekutine u pacientiek s endometriózou a nevysvetliteľnou neplodnosťou bola zistená znížená rýchlosť pohybu spermíí (Makarand K, Oak M, Chantler EN, Vaughan Williams CA, Elstein M. *Sperm survival studies in peritoneal fluid from infertile women with endometriosis and unexplained infertility. Clinical reproduction and fertility* 1985; 3: 297 - 303). Ešte zaujímavejšie je, že bola zistená zvýšená fagocytóza spermíí počas 24 hodinovej inkubácie v skúmavke s brušnou tekutinou od pacientiek s endometriózou (Muscato JJ, Haney AF, Weingerg JB, *Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: a possible cause of infertility in endometriosis. Am j Obstet Gynecol* 1982; 144; 503 - 510). V tejto

špeciálnej štúdií bolo použité sperma od rôznych darcov a preto nemožno nespomenúť imunologické faktory.

Podstata vynálezu

Súčasný vynález je alternatívnym spôsobom k IVF liečbe plodnosti u žien. Štúdiami v skúmavkách bolo zistené, že lidokain znižuje fagocytózu spermii. Možno predpokladať, že tento účinok lidokainu je spôsobený stabilizáciou bunkovej membrány tým, že bráni zvýšenej priepustnosti pre sodík a pravdepodobne ovplyvňuje ATP v bunkovej membráne. Náklady na túto liečbu budú tvoriť približne 10 % oproti IVF liečbe, napríklad 2500 SEK na jeden menštruačný cyklus. Nejedná sa o žiadny technický postup oplodnenia, ktorý by mohol spôsobiť psychologické vedľajšie účinky. Táto liečba sa môže vyskúšať u pacientiek s endometriózou alebo nepatrnou mechanickou príčinou neplodnosti. Môže sa uskutočniť v dobe, kedy sa čaká na IVF a nemá žiadny vplyv na možnosť neskoršej úspešnej IVF liečby.

Liečba neplodnosti pomocou lidokainu nie je doposiaľ v literatúre publikovaná. Napriek tomu, že sú známe ďalšie farmaceutické účinky lidokainu. Napr. v EP 507 160, kde sa uverejňuje prípravok k vonkajšej aplikácii na kožu, kde je lidokain obsiahnutý v pridržiavacej vrstve umiestnenej na nosiči. Tento preparát sa používa pri liečbe neuralgie pri pásovom opare a postherpetických neuralgií.

Stručný popis obrázkov

Na obrázkoch použitý výraz „endometr“ znamená endometriózu a „end-prob“ znamená predpokladanú endometriózu.

Obrázok 1 schématicky znázorňuje počet voľných spermii, ktoré sa nachádzajú každý jednotlivý deň po inkubácii: s bunecným médiom (A, kontrola), s bunecným médiom a lidokainom (B), s brušnou tekutinou (C, kontrola), a brušnou tekutinou a lidokainom (D).

Obrázok 2 schématicky znázorňuje počet progresívne sa pohybujúcich spermii, ktoré sa nachádzajú každý jednotlivý deň po inkubácii: s bunecným médiom

(A, kontrola), s bunečným médiom a lidokainom (B), s brušnou tekutinou (C, kontrola), a brušnou tekutinou a lidokainom (D).

Obrázok 3 schématicky znázorňuje počet progresívne ale pohybujúcich sa spermii, ktoré sa nachádzajú každý jednotlivý deň po inkubácii: s bunečným médiom (A, kontrola), s bunečným médiom a lidokainom (B), s brušnou tekutinou (C, kontrola), a brušnou tekutinou a lidokainom (D).

Obrázok 4 schématicky znázorňuje počet živých alebo nehybných spermii, ktoré sa nachádzajú každý jednotlivý deň po inkubácii: s bunečným médiom (A, kontrola), s bunečným médiom a lidokainom (B), s brušnou tekutinou (C, kontrola), a brušnou tekutinou a lidokainom (D).

Obrázok 5 schématicky znázorňuje počet mŕtvych spermii, ktoré sa nachádzajú každý jednotlivý deň po inkubácii: s bunečným médiom (A, kontrola), s bunečným médiom a lidokainom (B), s brušnou tekutinou (C, kontrola), a brušnou tekutinou a lidokainom (D).

Podrobný popis vynálezu

S odkazom na obrázky 1 až 6 použitie miestnych anestetík na výrobu lieku pre použitie proti neplodnosti alebo na zvýšenie plodnosti. Miestne anestetikum sa vyberá z látky, ktorá má miestne znecitlivujúci účinok. Príkladom takýchto látok sú bupivakain (1-butyl-N-(2,6-dimethylfenyl)-2-piperidinkarboxamid), lidokain (2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylfenyl)acetamid), mepivakain (N-(2,6-dimethylfenyl)-1-methyl-2-piperidinkarboxamid), prilokain (N-(2-methylfenyl)-2-(propilamino)propanamid) a ropivakain ((S)-N(2,6-dimethylfenyl)-1-propyl-2-piperidinkarboxamid). Môžu sa použiť aj iné miestne anestetiká. S výhodou sa používa lidokain.

Ďalším rysom tohoto súčasného vynálezu je farmaceutická zlúčenina, ktorá sa skladá z farmaceuticky účinnej koncentrácie miestneho anestetika spolu s farmaceuticky prijateľným vehikulom. Koncentrácia je taká, aká má účinok na neplodnosť u ženy alebo aká zvyšuje plodnosť u ženy. O dávke a koncentrácii rozhoduje praktický lekár. Koncentrácia účinnej látky je aspoň 5 µg/ml. Používa sa

100 až 2000 μg v jednom až 20 ml, s výhodou 118 μg . Dávka, ktorá sa podáva je aspoň 100 μg , hlavne však 1000 μg . Zlúčenina sa s výhodou podáva do brušnej dutiny, s výhodou cez vajcovody. Miestne anestetikum je vyššie definované.

Aktívna zložka sa zmieša s vehikulami, ktoré sú farmaceuticky prijateľné a zlúčiteľné s aktívnou zložkou vhodnou na tu uvedený liečebný spôsob. Navyše, ak sa to vyžaduje, môžu sa použiť zlúčeniny, ktoré obsahujú menšie množstvo pomocných látok, ako sú zvlhčujúce a emulgačné látky, látky upravujúce pH a podobné, ktoré zvyšujú účinnosť aktívnej zložky.

Farmaceutická zlúčenina súčasného vynálezu zahŕňa aj farmaceuticky prijateľné soli tu uvedených zlúčenín. Farmaceuticky prijateľné soli zahŕňujú prídavné soli kyselín, ktoré sú tvorené s anorganickými kyselinami, ako je napr. kyselina chlór vodíková alebo kyselina fosforečná, alebo s organickými kyselinami, ako je napr. kyselina octová, vínna alebo mandľová.

Fyziologicky prípustné nosiče sú odborníkom dobre známe. Príkladom tekutých nosičov sú sterilné vodné roztoky, ktoré už neobsahujú žiadne prídavné látky k aktívnym zložkám a vode, alebo obsahujú pufer, ako je napr. fosforečnan sodný pri hodnote fyziologického pH, fyziologický roztok, alebo obidva, ako napr. fyziologický roztok pufovaný fosfátom. Vodné roztoky môžu obsahovať viac ako jednu pufovaciú soľ, rovnako tak soli, ako je napr. chlorid draselný a sodný, dextróza, propylén glykol, polyetylen glykol a iné roztoky.

Zlúčeniny môže tvoriť aj hyaluronan, čo je viskózna látka ako je napr. mravenčanový gel. Hyaluronan umožňuje pomalé uvoľňovanie aktívnej látky, čo je výhodné pre liečbu podľa vynálezu, pretože oplodnenie môže nastať až 24 hodín po ovulácii. Ďalšou výhodou je, že hyaluronan má stimulujúci účinok na spermie (Zimmerman ER, Drobnis E, Robertson KR, Nakajima ST, Kim H: Semen preparation with the Sperm Select system versus washing technique. Fertil Steril 1994; 61: 269 - 275).

Neplodnosť sa všeobecne nepovažuje za chorobu. Vynález taktiež zahŕňa proces liečby neplodnosti u ženy farmaceutickou zlúčeninou podľa vynálezu, ktorá sa vyznačuje tým, že sa podáva cez vajcovody.

Vynález sa hlavne týka kozmetického a neliečebného spôsobu liečby neplodnosti alebo zvýšenia plodnosti, kde a) je diagnostikovaná ovulácia, b) sa

podáva liečba lokálnym anestetikom, akonáhle sa očakáva ovulácia podľa bodu a). Liečba sa s výhodou vykonáva cez vajcovody. Nasledujúce kroky sú s výhodou: Spontánna ovulácia: primárna liečba počas normálneho menštruačného cyklu. Stimulácia len u pacientov s anovulačným cyklom a primárna stimulácia klomifenom (tabletky), ktorá je jednoduchá a lacná. Je potrebná jedna vzorka krvi po ovulácii na overenie, že počas liečebného cyklu prebehla ovulácia.

Test LH (luteinizačný hormón): vzostup LH 24 až 36 hodín pred ovuláciou sa diagnostikuje domácim testom na vzorke moču.

Pertubácia: Pokiaľ je LH-test pozitívny podáva sa liek cez vajcovody napr. 10 ml 100 µg/ml lidokainu vo fyziologickom NaCl alebo v Ringerovom roztoku počas normálneho gynekologického vyšetrenia. Nie je potrebné žiadne znecitlivenie.

Oplodnenie: Žiadna umelá liečba. Pár sa pokusí dosiahnuť tehotenstvo normálnym spôsobom pohlavným stykom doma potom, čo je podaná liečba vajcovodami.

Bolo zistené, že nie sú prítomné vedľajšie účinky na prežívanie spermií, čo dokazuje, že spermie nie sú ovplyvnené lidokainom a to bolo tiež dokázané v ďalších štúdiách. (Bennett S J, Bolton V, Parson J. The effects of lignocaine on human sperm motility. *J Assisted Reprod. & genetics* 1992; 9: 271-3). Zdá sa, že to isté platí aj pre vajíčka, lebo vysoké hladiny lidokainu boli namerané bez akýchkoľvek problémov s oplodnením alebo s fetálnym vývinom. (Bailey-Pridham DD, Cook CL, Reshef E, Hurst HE, Drury K, Yussman MA. Follicular Fluid lidocaine levels during transvaginal oocyte retrieval. *Fertil Steril* 1990; 53: 171-173). Najvyššie hladiny boli 118 µg /ml, čo znamená, že dávka 1000 µg lidokainu na inkubáciu v skúmavke by mohla byť riedená napr. 100 µg /ml v 10 ml izotonickéj tekutiny. Táto koncentrácia bude použitá teraz na klinické štúdie úspešného tehotenstva po pertubácii uskutočnenej 24 hodín pred ovuláciou na zaistenie lepšieho prežívania spermií.

Lidokain sa používa už veľa rokov, bez toho, aby boli zaznamenané nežiadúce účinky počas tehotenstva, ako to bolo tiež preukázané v štúdiách na zvieratách. (Ramazzotto J, Curro FA, Paterson JA, Tanner P, Coleman M. Toxicological Assessment of Lidocaine in the Pregnant Rat. *J Dent Res* 1985; 64: 1214-1218) a preto je ho možné použiť na liečbu neplodnosti u pacientiek s endometriózou.

Tento vynález je znázornený na nasledujúcom príklade. Všetky tu použité technické a vedecké pojmy, pokiaľ nie sú ináč definované, majú rovnaký význam ako pri bežnom používaní odborníkmi. Tu použité spôsoby sú dobre známe odborníkom v danom obore pokiaľ nie je určené inakšie. Publikácie tu uvedené sú zahnuté v referenciách.

Príklady prevedenia vynálezu

Príklad 1

Redukcia fagocytózy spermií v brušnej tekutine u žien s endometriózou.

Táto štúdia bola robená za účelom ďalšej analýzy funkcie leukocytov pri zníženej plodnosti počas endometriózy a tiež za účelom hľadania možného liečebného prístupu. Aby sa vylúčili imunologické vplyvy zúčastnil sa na pokuse len jeden darca spermií. Pripravené vzorky spermií boli inkubované s necentrifugovanou brušnou tekutinou zdravých žien a žien s endometriózou na vyhodnotenie významu fagocytózy spermií na zníženú plodnosť počas endometriózy. Počet životaschopných spermií pri inkubácii bol denne počítaný počas 5 dní s a bez prítomnosti lokálneho anestetika, ktoré bolo pridávané pri hľadaní metódy zníženia aktivity populácie brušných leukocytov.

Materiál a metódy

Pacienti

Ženy: Pacientky boli rozdelené do troch rôznych skupín. Kontrolná skupina (n=9, priemerný vek = 38,5 rokov) sa skladala zo žien, ktoré sa podrobili laparoskopickému sterilizácii alebo žien s nejasnými bolesťami brucha. Kontrolné skupiny mali laparoskopický nález v norme s anatomicky normálnou maternicou a vajcovodami.

Štúdijská skupina obsahovala ženy, ktoré sa podrobili laparoskopii za účelom zistenia príčiny neplodnosti alebo trpeli bolesťami brucha a bola im diagnostikovaná endometrióza (n = 11, priemerný vek = 34,5 rokov). V tejto skupine bola laparoskopická diagnóza u 8 pacientiek a anamnestická pravdepodobnosť

endometriózy u 3 pacientiek, u ktorých sa ale nevyvinul žiadny implantát endometriózy, ktorý by mohol byť zistený laparoskopicky.

Muži: Darcom spermií bol zdravý 38-ročný muž s normálnou plodnosťou s 2-3 dňovou sexuálnou zdržanlivosťou pred každým odberom vzorky spermií. Vzorky spermií boli pripravené plávajúcou technikou na výber optimálnej populácie (Russel LD, Rogers B J. Improvement in the quality and fertilization potential of a human sperm population using the rise technique. J Androl 1987; 8:25).

Vzorky peritoneálnej tekutiny získanej pri laparoskopii

Vzorky krvi boli odobrané potom, čo bolo pacientkám podané anestetikum, na neskoršie stanovenie hyaluronanu, ktorý sa používa ako markér prebiehajúceho zápalu na vylúčenie zápalového ochorenia malej pánvy. Na začiatku laparoskopie s bezpečnými nástrojmi v brušnej dutine bola všetká dosiahnuteľná peritoneálna tekutina v Douglasovom priestore pomocou odsávačky odsávaná cez teflónový katéter (priemer 1,7 mm, Optinova, Godby, Finsko) a potom bola táto tekutina premiešaná ihneď po odbere s 10 IU heparínu / ml v teflónovej fľaši. (Olive DL, Weinberg JB, Haney AF. Peritoneal macrofages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. Fertil Steril 1985; 44: 772-777). Množstvo peritoneálnej tekutiny bolo zistené vážením na elektrických váhach. Teflón bol vybraný ako materiál, ktorý vykazuje nízku priľnavosť k bunkám cicavcov. (Grinnell F, Milam M, Srere PA. Studies on cell adhesion. Arch Biochem Biophys 1972; 153: 193-198). Bol použitý heparín ako protizrážlivá látka, aby sa zabránilo zhlukovaniu bielych krviniek. (Makarand et al. 1985). Predtým sa používal citrát (Edelstam et al. 1994), ktorý mal nežiadúce účinky na životaschopnosť spermií pri inkubácií. Všetky vzorky boli odobrané so súhlasom pacientov a proces so vzorkami bol schválený etickou komisiou, Lekárska fakulta, Univerzita v Uppsale, Švédsko.

Inkubácia spermií a peritoneálnej tekutiny

Pre všetky inkubácie viď nižšie, ktoré boli robené vo vlhkom bunkovom inkubátore, boli použité teflónové skúmavky:

- a) bunečné médium (1 ml), spermie (10^6 v 1 ml bunečného média) a 0,1 ml NaCl.

- b) bunečné médium (1 ml), spermie (10^6 v 1 ml bunečného média) a 0,1 ml lidokainu 10 mg/ml (Xylocain®, ASTRA).
- c) spermie (10^6 v 1 ml bunečného média), peritoneálna tekutina (1 ml) a 0,1 ml NaCl
- d) spermie (10^6 v 1 ml bunečného média), 0,1 ml lidokainu (10 mg/ml) a peritoneálna tekutina (1ml).

Earlovo bunečné médium (Sigma) s 0,35 % BSA (hovädzí sérový albumín). Zostávajúca časť peritoneálnej tekutiny bola centrifugovaná a supernatant zamrazený ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pre následné stanovenie hyaluronanu. (Edelstam a kol. 1994) Skúmavky boli analyzované denne po dobu piatich dní a nasledujúce parametre boli merané vo všetkých A až D inkubáciach až do počtu 100 spermií:

- počet voľných spermií, ktoré nepriľnuli k bielym krvinkám
- počet spermií s progresívnou pohyblivosťou
- počet spermií s neprogresívnym pohybom
- počet spermií, ktoré sú nehybné, ale živé
- počet mŕtvych spermií

Taktiež bolo denne stanovené percento životaschopných peritoneálnych bielych krviniek za použitia trypanovej modrej.

Výsledky

Predovšetkým bolo zistené, že v skúmavkách, ktoré boli inkubované s peritoneálnou tekutinou a lidokainom, bolo štatisticky významne menej fagocytovaných spermií ($p < 0,02$). Spermie boli zachytené vo veľkých zhlukoch bielych krviniek a niektoré boli zjavne fagocytované a tým bol znížený počet voľných funkčných spermií.

Prežívanie spermií s a bez endometriózy: Po dvojdennej inkubácii bolo zistené štatisticky významne viac voľných spermií pri inkubácii s peritoneálnou tekutinou od normálnej skupiny v porovnaní so skupinou s endometriózou. (Kruskal Wallis $p < 0,014$).

Prežívanie spermií s a bez lidokainu: Neboli zistené žiadne nežiadúce účinky na prežívanie spermií a nebol zistený štatisticky významný rozdiel medzi inkubáciou

spermií s alebo bez lidokainu po 24 alebo 48 hodinách. Hodnoty p (Wilcoxon) sú znázornené v tabuľke I a II.

Prežívanie spermií s a bez peritoneálnej tekutiny a lidokainu, bez ohľadu na diagnózu: Progresívna pohyblivosť sa znižuje omnoho viac bez prítomnosti peritoneálnej tekutiny (obrázok 2) v porovnaní s inkubáciou spermií samotných.

Prežívanie spermií s a bez peritoneálnej tekutiny v skupine s endometriózou: V prítomnosti peritoneálnej tekutiny a lidokainu bolo zistené štatisticky významne viacej voľných spermií; zvlášť po dvojdenných inkubáciach v skupine s endometriózou. Vid'. obrázok 1 a tabuľku II.

Bolo zistené viacej mŕtvych spermií pri inkubáciach s lidokainom v oboch diagnostikovaných skupinách. Obrázok 5, tabuľka II.

Koncentrácie hyaluronánu v peritoneálnej tekutine nevykazovali žiadne známky prebiehajúceho zápalového procesu, to znamená, že sa potvrdilo, že všetci pacienti boli zdraví.

Tabuľka č. I: P-hodnoty pre rôzne parametre zapisované počas inkubácie pri porovnávaní inkubácie s a bez lidokainu. Údaje po 24 hodinovej inkubácii.

	Spermie ± lidokain	Spermie + peritoneálna tekutina, normálna, ± lidokain	Spermie + peritoneálna tekutina, endometrióza, ± lidokain	Všetci pacienti bez určitej diagnózy ± lidokain
Voľné, nepriľnuté k bielym krvinkám	_____	Všetky voľné s aj bez lidokaina	0,59	0,27
Progresívna pohyblivosť	0,88	0,046(a)	0,67	0,11
Neprogresívna pohyblivosť	0,59	0,59	0,79	0,58
Stacionárne	0,76	0,40	0,31	0,18
Nepohyblivé (mŕtve)	0,28	0,14	0,09	0,024(b)
Životaschopnosť bielych krviniek	_____	0,26	0,29	0,92
Spermie priľnuté na povrch bielych krviniek	_____	Žiadne priľnuté na povrch bielych krviniek v oboch skupinách	0,68	0,80

a) viacej progresívna pohyblivosť spermíí pri inkubácii s lidokainom

b) viacej mŕtvych v skupine s lidokainom

Tabuľka č. II: P-hodnoty pre rôzne parametre zapisované počas inkubácie pri porovnávaní inkubácie s a bez lidokainu. Údaje po 24 hodinovej inkubácii.

	Spermie ± lidokain	Spermie + peritoneálna tekutina, normálna, ± lidokain	Spermie + peritoneálna tekutina, endometrióza, ± lidokain	Všetci pacienti bez určitej diagnózy ± lidokain
Volné, nepriľnuté k bielym krvinkám	_____	1,0	0,018 (d)	0,0021 (d)
Progresívna pohyblivosť	Žiadna progresívna pohyblivosť s a bez lidokainu	1,00	0,89	0,95
Neprogresívna pohyblivosť	0,18	0,025 (c)	0,21	0,021 (c)
Stacionárne	0,78	0,26	0,58	0,22
Nepohyblivé (mŕtve)	0,50	0,038 (c)	0,003 (c)	0,00025 (c)
Životaschopnosť bielych krvínok	_____	0,78	0,51	0,57
Spermie priľnuté na povrch bielych krvínok	_____	1,00	0,53	0,63

c) viacej s lidokainom

d) viacej voľných v skupine s lidokainom

Tento vynález obsahuje vplyv lidokainu na prežívanie spermíí a účinok na fagocytózu spermíí bielymi krvinkami brušnej dutiny v skúmavke počas inkubácie po dobu 5 dní.

Táto štúdia zahrňuje len jedného darcu spermíí, aby sa zabránilo rôznym imunologickým kombináciám, ktoré by boli nekontrolovateľným faktorom v pokusoch. Táto štúdia taktiež sleduje prežívanie spermíí až do doby piatich dní, zatiaľčo predchádzajúce štúdie skúmali prežívanie spermíí po dobu 24 hodín. Ďalej nebol počítaný len počet voľných nepohltených spermíí, ale tiež počet tých, ktoré vykazovali progresívnu alebo stacionárnu pohyblivosť, rovnako aj počet živých, mŕtvych alebo voľných (tzn. neprilnutých na povrch bielych krviniek) spermíí.

V tomto vynáleze boli potvrdené predchádzajúce nálezy, ktoré popisuje Muscato a kol. 1982 a týkajú sa zníženej plodnosti u pacientiek s endometriózou na podklade pohlcovania spermíí. Zvýšená kapacita pohlcovania peritoneálnych makrofágov u pacientiek s endometriózou bola tiež preukázaná pomocou fluórescenčných guľčiek. (Samejima T, Masuzaki H, Ishimaru T, Yamabe T. Activity of Peritoneal Macrophages in Endometriosis. Asia Oceania J Obstet Gynaecology 1989, 15: 175-181).

Ďalšie štúdie, ktoré sa týkajú pohlcovania spermíí, neberú do úvahy problém so stratou bielych krviniek, ktoré priľnú viac na iný materiál (Grinell et al. 1972). Makarand a kol. 1985 použil sklenenú nádobu na uskladnenie peritoneálnej tekutiny. Sklo vykazuje najväčšiu priľnavosť bielych krviniek (Grinell et al. 1972) a používa sa k oddeľovaniu makrofágov (Smedsroed B, Pertoft H. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. J Leukocyte Biol. 1985; 38). Muscato a kol. v roku 1989 si vybral polypropylén, ktorý je lepšou možnosťou ako sklo z hľadiska problému priľnavosti buniek, ale menej vhodný ako teflón.

Predpokladá sa, že zistené väčšie množstvo mŕtvych spermíí pri inkubácii s lidokainom, je dôsledkom zníženého pohlcovania spermíí v prítomnosti lidokainu, vzhľadom na to, že pri inkubácii samotných spermíí s a bez lidokainu neboli zistené žiadne nežiadúce účinky na spermie. Takto sa tiež vysvetľuje nález zvýšenej neprogresívnej pohyblivosti spermíí pri inkubácii s lidokainom (Obrázok 2). Táto redukcia progresívnej pohyblivosti bez prítomnosti peritoneálnej tekutiny nasvedčuje

tomu, že peritoneálna tekutina obsahuje látky nezbytné pre zachovanie funkcií spermií.

Ako je už uvedené v úvode vlákna vajcovodov sú nepretržite zvlhčované peritoneálnou tekutinou, čo v prípade pacientiek s endometriózou znižuje kapacitu zachytených vajíčiek. (Suginami et al. 1986). Ako ukazuje táto i predchádzajúca štúdia biele krvinky v peritoneálnej tekutine pacientiek s endometriózou sú viacej účinné pri pohlcovaní spermií. (Muscato a kol. 1982). Preto môžu byť u žien s endometriózou dva faktory, ktoré sa podieľajú na ich zníženej plodnosti. Táto štúdia tiež ukazuje možnosť využitia účinku lidokainu na zníženie pohlcovania spermií.

Súhrnne táto štúdia dokazuje znížené pohlcovanie spermií v prítomnosti lidokainu. Tento jav sa musí ďalej sledovať pri randomizovaných klinických štúdiách pertubácii za pomoci fyziologického roztoku alebo roztoku lidokainu vo fyziologickom roztoku pred ovuláciou. (obdobie zvýšenej hladiny LH)

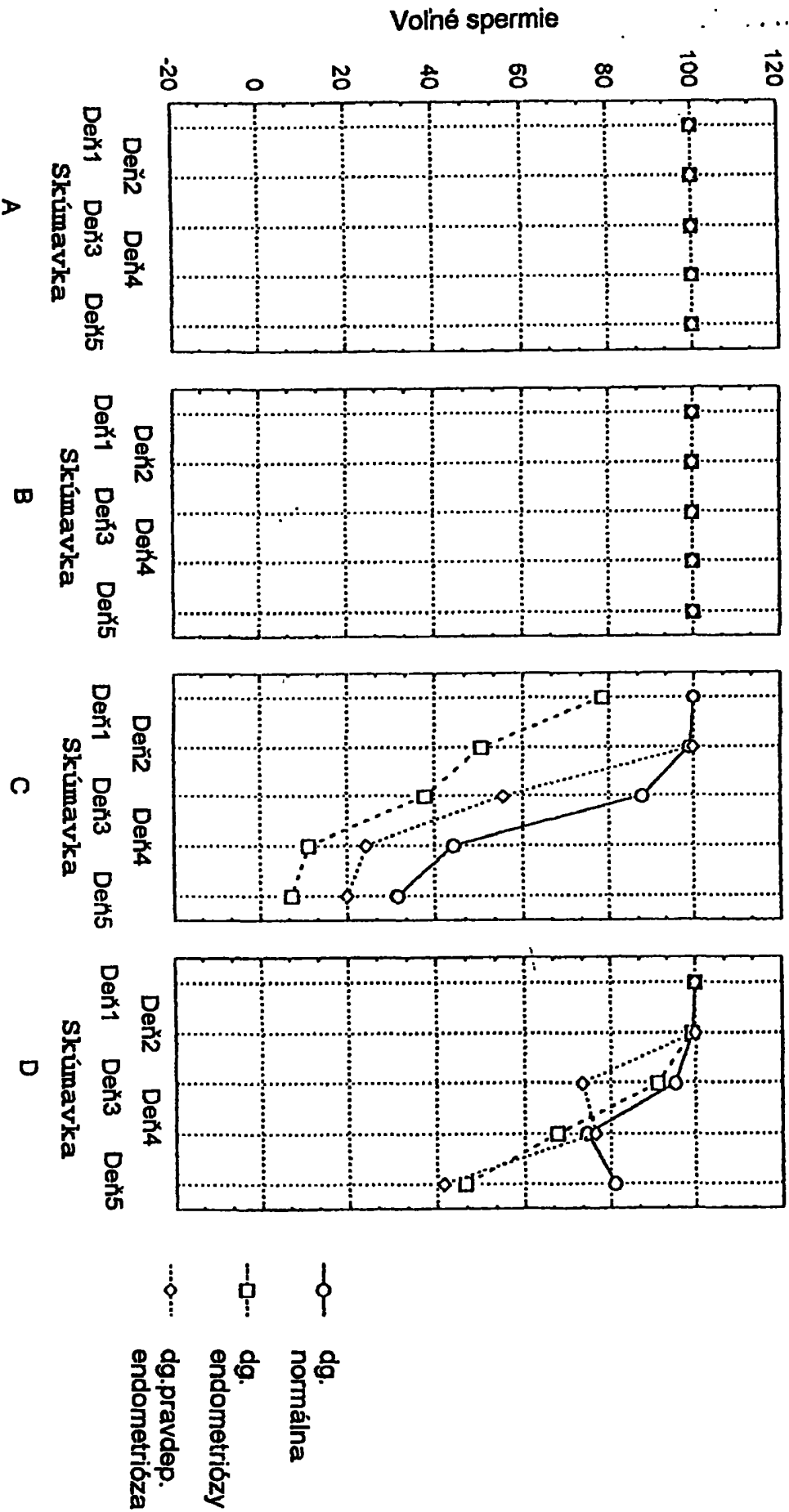
Zatiaľ čo súčasný vynález je popisovaný v spojení s výhodnými zlúčeninami a látkami, musí sa chápať, že sa môžu prevádzať určité náhrady a úpravy, bez odchylky od rozsahu nasledujúcich nárokov.

PATENTOVÉ NÁROKY

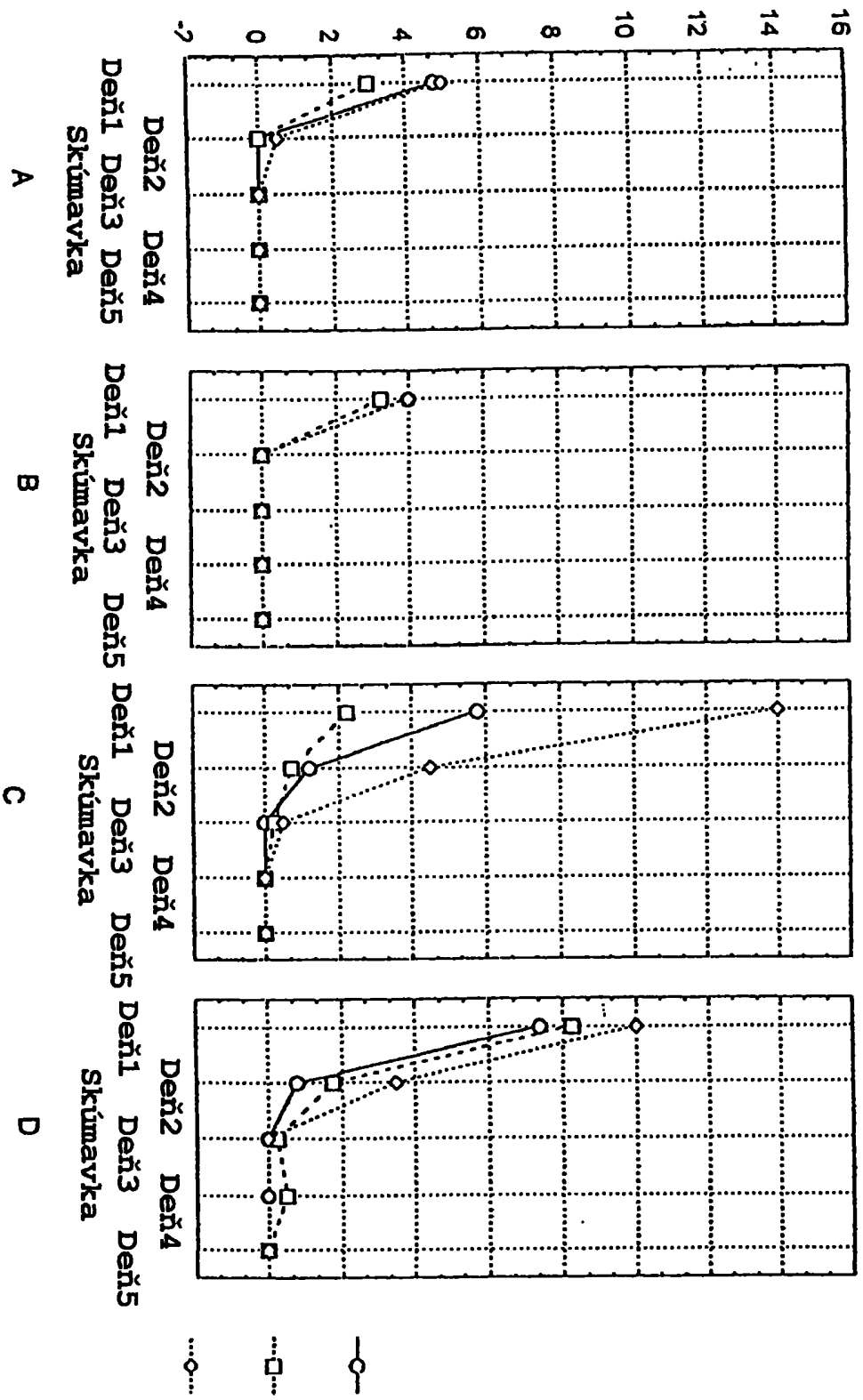
OPRAVENÁ STRANA

1. Použitie lokálneho anestetika na výrobu lieku vyznačujúci sa tým, že sa používa proti neplodnosti alebo na zvýšenie plodnosti.
2. Použitie podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že lokálne anestetikum je vybrané zo skupiny, ktorá obsahuje bupivakain, lidokain, mepivakain, prilokain a ropivakain.
3. Farmaceutická látka vyznačujúca sa tým, že obsahuje farmaceuticky účinnú koncentráciu lokálneho anestetika s farmaceuticky prijateľným vehikulom.
4. Farmaceutická látka podľa nároku 3, vyznačujúca sa tým, že farmaceuticky účinná koncentrácia je aspoň 5 µg/ml.
5. Farmaceutická látka podľa nároku 3 vyznačujúca sa tým, že lokálne anestetikum je vybrané zo skupiny, ktorá obsahuje bupivakain, lidokain, mepivakain, prilokain a ropivakain.
6. Farmaceutická látka podľa nároku 3 vyznačujúca sa tým, že farmaceuticky prijateľné vehikulum obsahuje fyziologický roztok NaCl alebo Ringerov roztok.
7. Farmaceutická látka podľa ktoréhokoľvek nároku 3 až 6 vyznačujúca sa tým, že obsahuje hyaluronan.
8. Spôsob zvýšenia plodnosti u žien pomocou farmaceutickej látky podľa nároku 3 vyznačujúci sa tým, že farmaceutická látka je podávaná do dutiny brušnej s výhodou cez vajcovody.

Grafy priemerov
pri trojitom križeni
OBRÁZOK 1



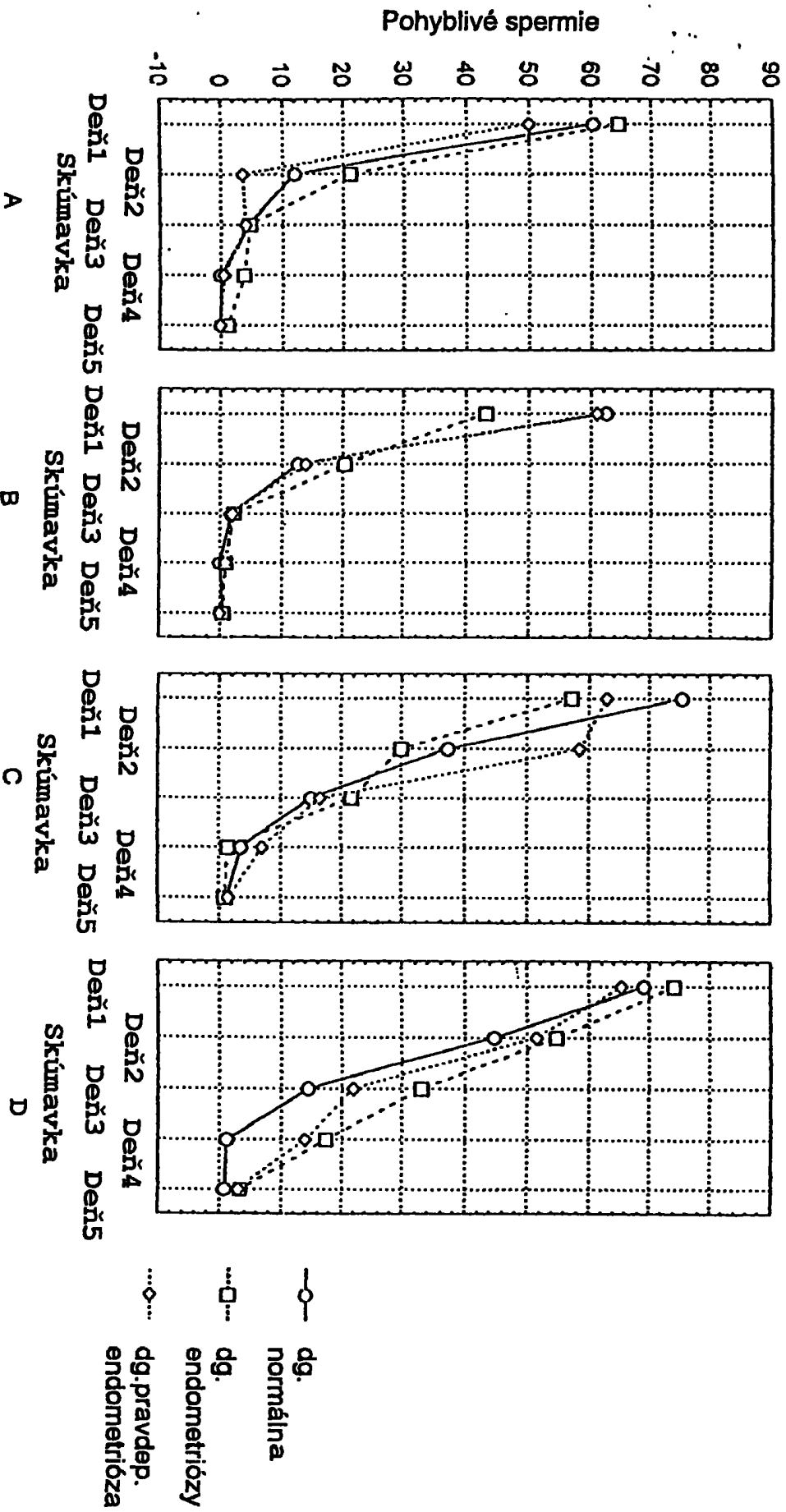
Progresívna pohyblivosť



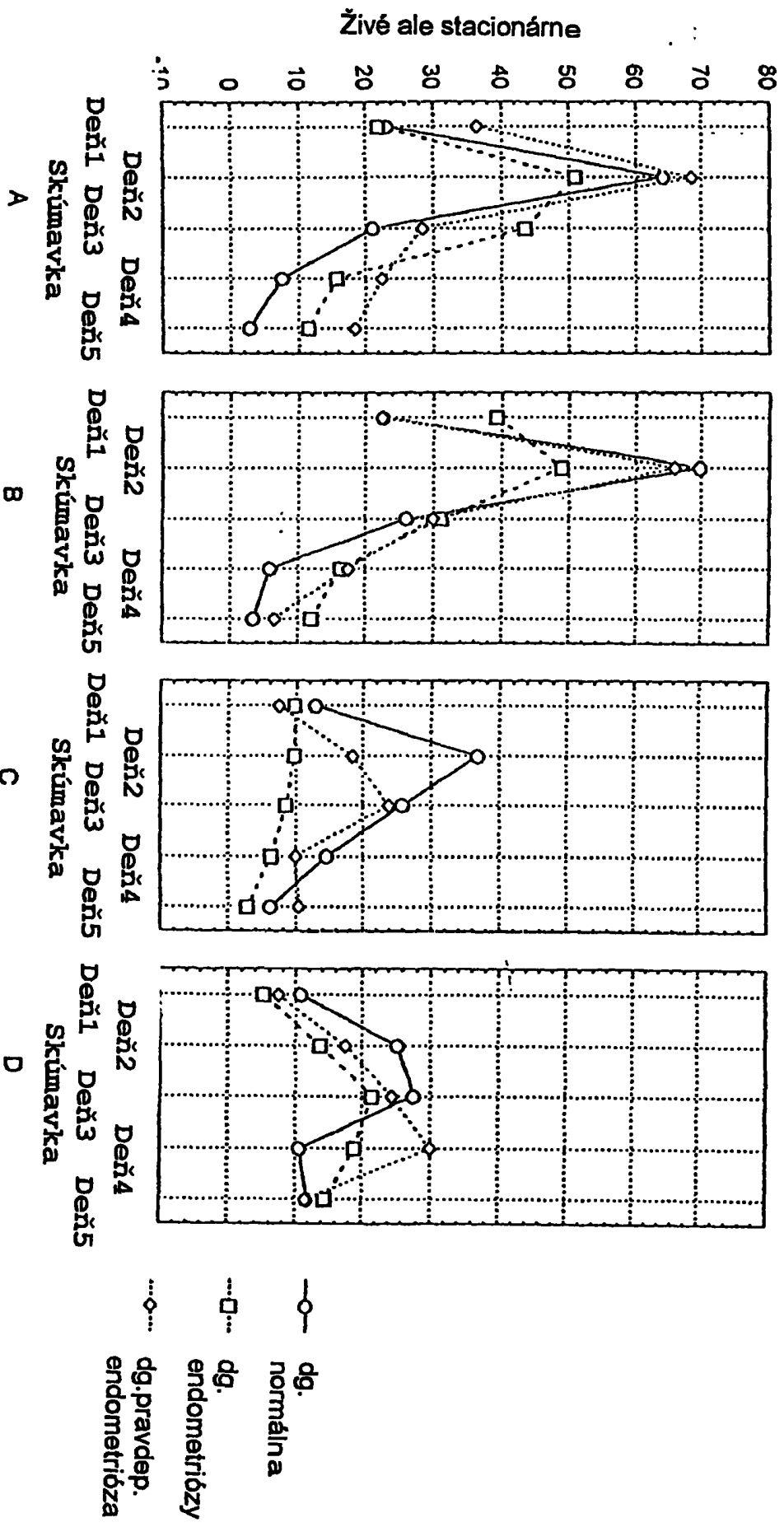
—○— dg. normálna
 - - - □ - - - dg. endometriózy
 ····◇···· dg. pravdep. endometrióza

Grafy priemerov pri trojitom krížení
 OBRÁZOK 2

Grafy priemerov
pri trojitom križení
OBRÁZOK 3



Grafy priemerov
pri trojitom križení
OBRÁZOK 4



Grafy prímerov
pri trojitom križení
OBRAZOK 5

