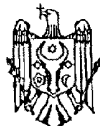




MD 2035 F1 2002.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2035 (13) F1
(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 35/78;
A 61 P 9/04

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2001 0172 (22) Data depozit: 2001.05.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.11.30, BOPI nr. 11/2002
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CARDIOLOGIE AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: POPOVICI Mihail, MD; COBEȚ Valeriu, MD; IVANOV Victoria, MD; POPOVICI Ion, MD; CALENICI Oleg, MD; TODIRAȘ Mihai, MD; GUDUMAC Valentin, MD; RUDIC Valeriu, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE CARDIOLOGIE AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Metodă de micșorare a contracției vasculare induse de agenții
vasoconstrictori naturali

(57) Rezumat:

Invenția se referă la medicină, în special la
cardiologie.

Esența invenției constă în aceea că pentru
micșorarea contracției vasculare induse de agenții
vasoconstrictori naturali, zilnic se administrează
extract de spirulină în microdoze de 10...12 mg, *per*

5 os, sau 41...49 μg/kilocorp intravenos, atingând
astfel concentrația serică eficientă de 55...65 μg%.
Revendicări: 1

MD 2035 F1 2002.11.30

3

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la cardiologie.

Se cunoaște o metodă de micșorare a contracției vasculare induse de diferiți agenți vasoconstrictori naturali, care prevede administrarea unui preparat cu efect vasotrop, cum este prozasina (Ps), care posedă proprietăți alfa-1-blocante [1].

Dezavantajul constă în aceea că prazosina este slab eficientă în sensul micșorării contracției vasculare induse de Ang II.

Mai este cunoscută o metodă de micșorare a contracției vasculare induse de agenții vasoconstrictori naturali, care prevede administrarea de captopril (Cp), efectul hipotensiv al căruia este datorat blocării enzimei de conversie, fapt care conduce la sinteza limitată a agentului vasoconstrictor natural, cum este Ang II [2].

Dezavantajul constă în aceea că Cp nu realizează o micșorare semnificativă a contracției vasculare induse de catecolamine și endoteline.

De asemenea este cunoscută metoda de micșorare a contracției vasculare induse de Ang II, care prevede administrarea inhibitorului specific al receptorilor angiotensinici de tip AT1, losartan (DUP 753), forma clinico-farmaceutică utilizată pe piață fiind Cozaar [3].

Dezavantajul constă în aceea că losartanul nu influențează tonusul vascular crescut de noradrenalină și ET și, plus la aceasta, preparatul medicamentos indicat (Cozaar) este foarte scump.

Totodată se mai cunoaște o metodă de micșorare a contracției vasculare induse de agenții vasoconstrictori naturali, care prevede administrarea de nifedipină (Nf), preparat vasotrop cu efect de blocare a canalelor de calciu [4].

Dezavantajul constă în aceea că în tratamentul de lungă durată Nf agravează evoluția insuficienței cardiace și crește mortalitatea prin afecțiunile cardiovasculare (Opie L. H., Meeserli F. H. Nifedipine and mortality. Grave defects in the dossier, Circulation, 1975, № 92, p. 1068-1073; Ian J., Robertson S., Ball G., Hypertension for clinician, Boston, 1995, p.328).

Problema pe care o rezolvă invenția este elaborarea unei metode de micșorare eficientă a contracției vasculare și lărgirea arsenalului de preparate utilizate cu acțiune vasotropă.

Esența invenției constă în aceea că pentru micșorarea contracției vasculare induse de agenții vasoconstrictori naturali, zilnic se administrează extract de spirulină în microdoze de 10...12 mg, *per os*, sau 41...49 μg/kilogram intravenos, atingând astfel concentrația serică eficientă de 55...65 μg%.

Rezultatul constă în elaborarea unei metode eficiente de micșorare a contracției vasculare induse de agenții vasoconstrictori naturali, lărgind arsenalul de medicamente cu acțiune vasotropă.

Conform conceptului contemporan, aspectul patogenic al HA ține de deranjamentele morfo-funcționale ale endoteliului vascular, acțiunea excesului de catecolamine, angiotensină II (Ang II), endoteline (ET), de tulburarea homeostaziei calciului în miocitele netede, care repercutează în creșterea tonusului bazal vascular.

În acest context interesul nostru s-a axat pe studiul capacității eventuale a extractului de spirulină (ExSp) de a micșora contracția vasculară indusă de agenții vasoconstrictori naturali, dat fiind faptul că anterior s-a demonstrat experimental cu certitudine (*in vitro*, perfuzie în cordul izolat după metoda Langendorff) efectul de augmentare al perfuziei în bazinul coronarian a extractului de spirulină.

Experimentele s-au efectuat pe inele intacte de aortă de șobolan în baie clasică de perfuzie a segmentului de vas izolat. Creșterea tonusului vascular s-a realizat prin administrarea în soluția de perfuzie Krebs-Henzeleit a agenților vasoconstrictori naturali, cu rol-cheie în patogenia HA și care sunt recunoscuți ca substanțe naturale clasice utile în evaluarea și testarea preparatelor cu acțiune vasotropă (norepinefrină (NE), angiotensină II și endotelină I).

Norepinefrina, agonist neselectiv al receptorilor adrenergici alfa-1 și alfa-2, se va administra în baie de perfuzie a aortei izolate de șobolan în concentrația de 10^{-7} M.

Angiotensina II este agentul vasoconstrictor de bază al sistemului renin-angiotensină-aldosteron și se va administra în baie de perfuzie a aortei izolate în concentrația de 10^{-6} M.

Pentru studiul comparativ s-au selectat cele mai eficiente și utile remedii farmacologice pentru normalizarea tonusului vascular, administrate în cadrul hipertensiunii arteriale, și anume prazosina, captoprilul, losartanul (Lsn) și nifedipina. Cel puțin unul din aceste preparate este inclus în terapia complexă a HA sau cu el se realizează monoterapia acestui sindrom. Cu efectele exercitate de aceste preparate se va compara efectul extractului de spirulină asupra tonusului vascular crescut de NE, ET1 și Ang II, în ce privește efectul vasorelaxant.

Soluțiile sus-numite vor fi administrate în baie de perfuzie a aortei izolate în concentrația corespunzătoare efectului vasorelaxant maximal, determinat cert în condiții experimentale.

MD 2035 F1 2002.11.30

4

Evaluarea concentrației optime a extractului de spirulină s-a realizat prin administrarea ExSp în platoul de contracție al NE (10^{-7} M) în 7 concentrații: 40, 50, 55, 60, 65, 70 și 80 $\mu\text{g}\%$, un interval inerent celui care anterior a condiționat o creștere notabilă a perfuziei coronariene a cordului izolat de șobolan în regim izovolumetric de contracție fără recirculație. Valoarea contracției segmentului de aortă, induse de norepinefrină, s-a calificat ca fiind de 100%. Rata procentuală de micșorare a contracției vasculare, induse de NE, sub acțiunea celor 7 concentrații de ExSp este notată în tabelul 1.

Tabelul 1

Gradul de micșorare (în %) a contracției vasculare induse de NE la administrarea în platou a ExSp

NE (10^{-7} M) (n=11)	ExSp (40 $\mu\text{g}\%$)	ExSp (50 $\mu\text{g}\%$)	ExSp (55 $\mu\text{g}\%$)	ExSp (60 $\mu\text{g}\%$)	ExSp (65 $\mu\text{g}\%$)	ExSp (70 $\mu\text{g}\%$)	ExSp (80 $\mu\text{g}\%$)
100%	54±2%	47±2%	42±2%	35±2%	39±2%	43±2%	62±2%
Devieri, media, %	46%	53%	58%	65%	61%	57%	38%

10

După cum se vede extractul de spirulină a diminuat contracția indusă de NE la concentrația de 60 $\mu\text{g}\%$ în ser, decrementul fiind în medie de 65%. Cea mai slabă diminuare a contracției NE s-a constatat la concentrația ExSp de 80 $\mu\text{g}\%$ în ser, ea constituind 38%. În celelalte 5 concentrații (40, 50, 55, 65 și 70 $\mu\text{g}\%$) decrementul a constituit respectiv 46, 53, 58, 61 și 57%.

15

Așadar, extractul de spirulină administrat în platoul de contracție al NE în concentrația de 60 $\mu\text{g}\%$ în ser, conduce la o vasorelaxare considerabilă.

Anume această concentrație a ExSp a fost utilizată ulterior în protocolul experimental.

În primul rând, s-a evaluat comparativ efectele vasorelaxante ale ExSp și ale soluțiilor apropiate în cadrul administrării lor în platoul de contracție al NE (tab. 2).

20

Tabelul 2

Gradul de micșorare (în %) a contracției vasculare induse de NE (10^{-7} M) la administrarea în platou a

Cb, Ps, Cp, Lsn, Nf și ExSp

NE (10^{-7} M)	Cb (10^{-6} M)	Ps (10^{-6} M)	Cp (10^{-5} M)	Lsn (10^{-5} M)	Nf (10^{-6} M)	ExSp (60 $\mu\text{g}\%$)
100% (n=11)	51±2%	30±3%	100%	100%	27±1%	43±2%
Devieri, %	49%	70%	0	0	73%	57%

Carbacolul, agonistul M-receptorilor colinergici a micșorat contracția NE cu circa 49%, efect mediat nemijlocit prin intermediul endotelului vascular cu participarea obligatorie a EDRF-ului (factorul endotelial de relaxare, identificat ca NO) și EDHF-ului (factorul endotelial hiperpolarizant). În condiții naturale acest efect este egalat cu efectul acetilcolinei.

Prazosina a micșorat contracția NE cu circa 70%, efectul fiind datorat blocadei alfa-1-receptorilor adrenergici.

Captoprilul nu a modificat valoarea platoului de contracție vasculară indusă de NE. Cp acționează doar asupra enzimei de conversie, care nu este antrenată în vasoconstricția adrenergică.

Losartanul de asemenea nu a modificat valoarea platoului de contracție vasculară indusă de NE. Lsn blochează specific receptorii angiotensinici de tip AT1, care în acest caz nu sunt antrenați în vasoconstricția adrenergică.

Nifedipina a micșorat contracția NE cu circa 73%. Acest efect este datorat capacității Nf de a bloca în special canalele-L (lente) de calciu, limitând prin aceasta influxul de calciu în miocitul neted vascular.

Extractul de spirulină a micșorat contracția NE cu circa 57%.

Acest efect vasorelaxant a fost mai pronunțat decât efectul carbacolului și mai moderat comparativ cu efectul prazosinei și nifedipinei.

Carbacolul fiind o soluție funcțională a acetilcolinei realizează vasodilatare prin amorsarea receptorilor colinergici, deci prin mobilizarea mecanismelor naturale implicate în controlul dinamic al tonusului vascular, cel mai important fiind monoxidul de azot (carbacolul nu poate fi acceptat ca remediu în tratamentul HA, deoarece fiind agonist M-colinomimetic induce un șir de efecte adverse și indezirabile, în primul rând constricția bronșică, bradiaritmie).

Efectul ExSp a fost aproape de efectul carbacolului, ce sugerează prezența unuia sau a unor mecanisme naturale eventual comune, declanșate prin stimularea eliberării factorilor vasorelaxanți endoteliali, prioritar a EDRF. Este de menționat că spirulina este un produs natural, bogat în aminoacizi și în particular în L-arginină – sursă principală de monoxid de azot. Astfel se poate concluziona că unul din mecanismele implicate în inducerea relaxării vasculare este datorat capacității ei de a suplimenta cantitatea de monoxid

MD 2035 F1 2002.11.30

5

de azot, promotorul acțiunii vasorelaxante și a altor agenți naturali vasorelaxanți, în primul rând a bradikininei, unor prostaglandine.

Totuși, efectul vasorelaxant al ExSp a fost mai evident decât al carbacolului, fapt care determină sugerarea existenței concomitente și a altor mecanisme ce repercutează spre vasorelaxare, cum ar fi limitarea influxului de calciu în miocitele netede vasculare.

Pentru a justifica aceste sugestii s-a cercetat efectul vasotrop al ExSp pe vas dezendotelizat, anihilând astfel mecanismele endoteliale vasorelaxante plauzibile.

Datele obținute sunt reflectate în tabelul 3.

10

Tabelul 3

Gradul de micșorare (în %) a contracției vasului dezendotelizat induse de NE la administrarea în platou a Cp, Nf și ExSp

Ne (10^{-7}) (n=10)	Cp (10^{-6} M)	Nf (10^{-6} M)	ExSp (60 μ g%)
100%	100%	31 $\pm$ 2%	82 $\pm$ 7%
Devieri medii, %	0	69%	18%

Așadar, carbacolul nu a modificat constricția vasului dezendotelizat indusă de NE, ce confirmă repetat faptul că Cb realizează efect vasorelaxant prin intermediul endotelului.

Nifedipina a manifestat și pe vas dezendotelizat efect relaxant, practic la aceeași valoare ca și pe vasul intact (69% față de 73%).

Extractul de spirulină chiar și în lipsa endotelului vascular a produs vasorelaxare, numai că ea a fost notabil mai mică, comparativ cu vasul intact (-18% față de - 57%). Acest fapt justifică ipoteza că efectul vasorelaxant al spirulinei are la bază cel puțin două pârghii de promovare: una, prioritară, fiind prin intermediul endotelului vascular, iar cealaltă musculotropă, posibil legată de modularea homeostazei ionilor de calciu.

În acest context s-a studiat efectul vasotrop al ExSp asupra contracției vasculare, induse de endotelina 1, recunoscută astăzi ca cel mai potent vasoconstrictor natural. De menționat că ET1 este sintetizată nemijlocit de către endotelioците și acționând asupra situsurilor specifice de pe miocitele netede condiționează creșterea influxului ionilor de calciu.

Datele obținute sunt sumarizate în tabelul 4.

25

Tabelul 4

Gradul de micșorare (în %) a contracției vasculare induse de ET1 la administrarea în platou a Cb, Cp,

30

Lsn, Ps, Nf și ExSp

NE (10^{-8} M) (n=10)	Cb (10^{-6} M)	Cp (10^{-5} M)	Lsn (10^{-5} M)	Ps (10^{-6} M)	Nf (10^{-6} M)	ExSp (60 μ g%)
100%	68 $\pm$ 5%	967%	926%	966%	292%	523%
Devieri medii, %	32%	4%	8%	4%	71%	48%

S-a constatat că captoprilul, losartanul, precum și prazosina practic nu modifică platoul vasoconstricției induse de ET1. Acest lucru este explicabil, întrucât preparatele menționate acționează asupra altor sisteme de inducție a vasoconstricției, așa cum respectiv inhibarea kininazei II (enzimei de conversie), blocada receptorilor angiotensinici de tip AT1 și blocada receptorilor adrenergici alfa-1.

În aceste condiții cel mai pronunțat efect vasorelaxant a fost caracteristic pentru nifedipină (-71%), în baza faptului că contracția endotelinică este calciu-dependentă.

Carbacolul a relaxat vasul cu circa 1/3 (-32%), iar extractul de spirulină cu circa 48%. Deci, și în cazul vasoconstricției induse de endotelina 1, ExSp realizează vasorelaxare mai puternică decât carbacolul, deoarece ea se manifestă prin cel puțin două verigi: una determinată de amorsarea factorilor de origine endotelială și alta determinată de modularea influxului ionilor de calciu în miocitele netede vasculare.

Astfel, extractul de spirulină este un potent vasorelaxant chiar și în condițiile de inducție a vasoconstricției de către endotelina 1, factor de origine endotelială.

Pentru a evalua complex acțiunea vasorelaxantă a spirulinei s-a studiat efectul ei în condițiile de inducere a vasoconstricției de către angiotensina II. Ang II are o acțiune vasoconstrictoare scurtă din cauza fenomenului de tahifilaxie. De aceea, substanțele studiate s-au administrat cu 5 minute înaintea administrării Ang II.

Datele obținute sunt relatate în tabelul 5.

50

MD 2035 F1 2002.11.30

6

Tabelul 5

Gradul de micșorare (în %) a contracției vasculare induse de Ang II pe fondul de pretratare cu Ps, Cp, Lsn, Nf și ExSp

Ang II (10^{-6} M) n=12	Ps (10^{-6} M) +Ang II	Cp (10^{-5} M) +Ang II	Lsn (10^{-5} M) +Ang II	Nf (10^{-6} M) +Ang II	ExSp (60 μ g%) +Ang II
100%	93 $\pm$ 7%	97 $\pm$ 6%	0%	23 $\pm$ 2	58 $\pm$ 3
Devieri medii, %	7%	3%	100%	77%	42%

5 Așadar, inhibitorul receptorilor AT1, losartanul a abolit efectul vasoconstrictor al Ang II prin faptul că a anihilat transmiterea semnalului intracelular spre sistemele respective de declanșare a reacției vasoconstrictoare.

Captoprilul practic nu a influențat acțiunea vasoconstrictoare a Ang II, întrucât enzima de conversie nu modulează acțiunea angiotensinei II, dar participă nemijlocit la formarea ei din Ang I.

10 Prazosina de asemenea nu a modificat semnificativ acțiunea vasoconstrictorie a Ang II, deoarece blocada alfa-1-receptorilor adrenergici nu influențează substanțial gradul de activare a receptorilor angiotensinici.

Nifedipina a determinat o constricție angiotensinică mai slabă cu circa 77%, pe contul reducerii influxului ionilor de calciu în miocitele netede vasculare.

15 De menționat că extractul de spirulină a limitat cu circa 42% efectul vasoconstrictor la administrarea de Ang II. Acest fenomen merită atenție deosebită, luând în considerație faptul că sistemul renin-angiotensină joacă un rol oportun în patogenia hipertensiunii arteriale, precum în remodelarea vasului, cât și a miocardului.

20 Prin urmare metoda propusă de micșorare a contracției vasculare induse de agenții vasoconstrictori naturali, prin acțiunea extractului de spirulină în concentrația optimă de 60 μ g% asupra vasului izolat, reprezintă o măsură eficientă de reducere a contracției vasculare. Acest efect este constatat la acțiunea celor mai importanți agenți vasoconstrictori naturali: norepinefrina, endotelina și angiotensina II.

25

(57) Revendicare:

30 Metodă de micșorare a contracției vasculare induse de agenții vasoconstrictori naturali, care constă în administrarea preparatului cu acțiune vasotropă, **caracterizată prin aceea că** în calitate de preparat vasotrop se administrează extractul de spirulină în microdoze 10...12 mg, *per os*, sau 41...49 μ g/kilocorp intravenos.

(56) Referințe bibliografice:

1. Чазов Е. И. Болезни органов кровообращения. Москва, 1997, с. 831
2. Gavras H. Angiotensin-converting enzyme inhibition and the cardiovascular system, Hypertension. Nr. 23, 1994, p. 813...818
3. Franz H. Meesseril, Current Cardiovascular Drug Therapy, New Orlean, 2000, p. 1400
4. Thomas W. Smith, Cardiovascular Therapeutics, Brigham, 1996, p. 715

Șef Secție:

EGOROVA Tamara

Examinator:

IUSTIN Viorel

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0172		
(22) Data depozit: 2001.05.28		
(51) ⁷ : A 61 K 35/78; A 61 P 9/04 Alți indici de clasificare: Titlul : Metodă de micșorare a contracției vasculare induse de agenții vasoconstrictori naturali (71) Solicitantul : Institutul de Cardiologie al Ministerului Sănătății din Republica Moldova, MD Termeni caracteristici : vascular, contracție.		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
C.I.B. 7: Au fost consultate ceririle de brevet și brevetele MD și EA pe anii 1993-2000 și respectiv 1996-2000, pe clasele A 61 K 35/78, A 61 P 9/04.		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2002.09.02
Examinatorul		Iustin Viorel