



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2008123806/15**, **15.11.2006**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.11.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.11.2005 US 60/597,172(43) Дата публикации заявки: **27.12.2009** Бюл. № 36(45) Опубликовано: **10.07.2012** Бюл. № 19(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **WO 2004028448 A2**, **08.04.2004**. **WO 0239978**
A1, **23.05.2002**. **RU 2211037 C1**, **27.08.2003**. **WO**
2004098619 A2, **18.11.2004**.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **16.06.2008**(86) Заявка РСТ:
SE 2006/050479 (15.11.2006)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/058612 (24.05.2007)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

ПЕЖИНОВСКИЙ Стефан (SE)

(73) Патентообладатель(и):

ЭНТРЕСС АБ (SE)**(54) ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, ПРИМЕНЯЮЩЕЕСЯ ПРИ ПОРАЖЕНИЯХ ХРЯЩА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и фармакологии и представляет собой применение фармацевтически приемлемой соли альфа-кетоглутаровой кислоты для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики поражений хряща в условиях,

включающих потерю веса и/или нарушенного питания, недостаточного питания, гастрэктомии, частичной гастрэктомии или перевязки желудка. Изобретение обеспечивает эффективное облегчение и лечение суставных болей и артрита. 2 н. и 18 з.п. ф-лы, 8 табл., 3 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/194 (2006.01)**A61K 38/03** (2006.01)**A61P 19/02** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008123806/15, 15.11.2006**(24) Effective date for property rights:
15.11.2006

Priority:

(30) Convention priority:
15.11.2005 US 60/597,172(43) Application published: **27.12.2009 Bull. 36**(45) Date of publication: **10.07.2012 Bull. 19**(85) Commencement of national phase: **16.06.2008**(86) PCT application:
SE 2006/050479 (15.11.2006)(87) PCT publication:
WO 2007/058612 (24.05.2007)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

PEZhINOVSKIJ Stefan (SE)

(73) Proprietor(s):

EhNTRESS AB (SE)**(54) DRUG PREPARATION USED FOR CARTILAGE DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and pharmacology, and represents the use of a pharmaceutically acceptable salt of alpha-ketoglutaric acid for preparing a pharmaceutical composition for treatment or prevention of cartilage

diseases in response to weight loss and/or nutritional disorder, poor nutrition, gastrectomy, partial gastrectomy or gastric ligation.

EFFECT: invention provides effective relief and management of articular pain and arthritis.

20 cl, 8 tbl, 3 dwg

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к лекарственным композициям и применению таких композиций для лечения, облегчения и профилактики состояний, связанных с поражением хряща и связанных с ними болей, или профилактики артроза и ревматоидного артрита и связанных с ними болей.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Каждый третий взрослый человек в промышленном мире страдает хроническими болями, связанными с симптомами артрита. Самый распространенный симптом - постоянная боль в суставе - может проявляться в виде боли в бедре, боли в колене, боли в руке и боли в запястье, а также в виде суставной боли в других частях тела. Симптомы вызывают страдание и приводят к экономическим потерям, когда субъект вынужден прекратить работу или сократить количество рабочих часов. Также большие суммы тратятся на медикаментозное лечение. Очевидно, что существует необходимость эффективных по стоимости решений для облегчения или лечения суставных болей и артрита.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Осуществление изобретения включает применение вещества, включающего по меньшей мере один член из группы, состоящей из альфа-кетоглутаровой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты и фармацевтически приемлемых солей этих кислот, амидов альфа-кетоглутаровой кислоты и аминокислот или ди- или трипептидов глутамина и других аминокислот, трипептидов глутамина и других аминокислот, дипептидов глутаминовой кислоты и других аминокислот, трипептидов глутаминовой кислоты и других аминокислот и фармацевтически приемлемых солей указанных дипептидов и трипептидов, фармацевтически приемлемых физических растворов альфа-кетоглутаровой кислоты или ее фармацевтически приемлемых солей и по меньшей мере одной аминокислоты для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики состояний воспалительного или невоспалительного поражения хряща и боли, связанной с ним.

Дальнейшее осуществление изобретения включает применение вышеуказанных веществ для лечения или профилактики артроза и ревматоидного артрита и связанной с ними боли.

Дальнейшее осуществление изобретения включает применение вышеуказанных веществ для лечения или профилактики поражений суставного хряща при состояниях, включающих потерю веса и/или нарушения питания, или гастрэктомию, частичную гастрэктомию или перевязку желудка.

Дальнейшее осуществление изобретения включает применение вышеуказанных веществ для лечения или профилактики поражений суставного хряща при состояниях, включающих недостаточное питание.

Дальнейшее осуществление изобретения включает применение вышеуказанных веществ для облегчения боли, связанной с поражениями суставного хряща при вышеупомянутых состояниях.

Дальнейшее осуществление изобретения включает применение вышеуказанных веществ для лечения или профилактики остеопороза, связанного с гастрэктомией.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Настоящее изобретение будет объяснено в нижеследующем описании при помощи предпочтительных осуществлений, примеров исследований и сопровождающих чертежей, на которых

Фиг.1 - диаграмма, описывающая влияние рациона альфа-кетоглутарата и

гастрэктомии на вес тела крыс,

Фиг.2 - четыре трансиллюминационных фотографии верхнего отдела черепа (свода черепа) экспериментальных крыс,

Фиг.3 - диаграмма, показывающая область углублений, обнаруженных на траниллюминационных фотографиях свода черепа экспериментальных крыс.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, согласно одному из аспектов настоящего изобретения обеспечивается новое применение по меньшей мере одного из членов группы, состоящей из альфа-кетоглутаровой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты и фармацевтически приемлемых солей этих кислот, амидов альфа-кетоглутаровой кислоты и аминокислот или ди- или трипептидов глутамина и других аминокислот, трипептидов глутамина и других аминокислот, дипептидов глутаминовой кислоты и других аминокислот, трипептидов глутаминовой кислоты и других аминокислот и фармацевтически приемлемых солей названных дипептидов и трипептидов, фармацевтически приемлемых физических растворов альфа-кетоглутаровой кислоты или ее фармацевтически приемлемых солей и по меньшей мере одной аминокислоты для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики состояний артроза, ревматоидного артрита и разрушения хряща и боли, связанной с вышеупомянутыми нарушениями.

Согласно предпочтительному осуществлению изобретения применяются альфа-кетоглутаровая кислота, или ее соли щелочных или щелочноземельных металлов, или комбинация вышеуказанных соединений.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения обеспечивается способ лечения или профилактики состояния усиливающейся боли для по меньшей мере одного из членов группы, состоящей из артроза у млекопитающих, включая человека, где способ включает в себя введение субъекту в целях такового лечения или профилактики действительной боли доз по меньшей мере одного из членов группы, состоящей из альфа-кетоглутаровой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты и фармацевтически приемлемых солей этих кислот, амидов альфа-кетоглутаровой кислоты и аминокислот или ди- или трипептидов глутамина и других аминокислот, трипептидов глутамина и других аминокислот, дипептидов глутаминовой кислоты и других аминокислот, трипептидов глутаминовой кислоты и других аминокислот и фармацевтически приемлемых солей названных дипептидов и трипептидов, фармацевтически приемлемых физических растворов альфа-кетоглутаровой кислоты или фармацевтически приемлемых ее солей и по меньшей мере одной аминокислоты.

Согласно предпочтительному осуществлению этих аспектов вводятся альфа-кетоглутаровая кислота, или ее соли щелочных или щелочноземельных металлов, или комбинация вышеуказанных соединений. Наиболее предпочтительно введение альфа-кетоглутарата натрия.

Фармацевтические препараты активного компонента или компонентов, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, могут вводиться позвоночным, включая млекопитающих, таким как грызуны, таким как мыши, крысы, морские свинки или кролики; птицам, таким, как индюки, курицы или цыплята и другие бройлеры и животные свободного содержания; коровам, лошадям, свиньям и пороссятам и другим сельскохозяйственным животным, собакам, кошкам и другим домашним животным, а также человеку.

Введение может осуществляться различными способами в зависимости от вида позвоночного, которому оказывается лечение, от состояния позвоночного,

нуждающегося в названных методах и конкретных показаний к лечению.

В одном из осуществлений введение осуществляется в форме пищи или пищевых добавок, таких как диетические добавки и/или ингредиенты в форме твердой пищи или напитков. Следующие осуществления могут быть в суспензиях или растворах, как
 5 напиток, описанный ниже. Также форма выпуска может быть в таблетках или капсулах, жевательных или растворимых, например шипучих таблетках, а также порошках и других сухих формах, известных квалифицированному специалисту в данной области, таких как драже, микропеллеты и гранулы.

10 Введение может быть парентеральным, ректальным или в виде пероральной пищи или пищевой добавки, как указывается выше. Парентеральная среда включает раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла.

15 Пища и пищевые добавки также могут быть эмульгированы. Активный терапевтический ингредиент или ингредиенты затем могут быть смешаны с формообразующими основами, которые фармацевтически приемлемы и совместимы с активным ингредиентом. Подходящие ингредиенты, например вода, солевой раствор, декстроза, глицерин, этанол или подобные и их сочетания. К тому же при
 20 необходимости композиция может содержать незначительные количества вспомогательных средств, таких как увлажняющие или эмульгирующие агенты, рН буферные агенты, которые усиливают эффективность активного ингредиента.

Могут применяться различные формы парентеральной пищи, такие как твердая пища, жидкости, лиофилизированные или, напротив, обезвоженные формы. Они могут
 25 включать растворители или различные буферы (например, трис-НCl, ацетат, фосфат), рН и ионные усилители, добавки, такие как альбумин или желатин для предотвращения поверхностного всасывания, детергенты (например, Твин 20, Твин 80, Плурионик F68, соли желчных кислот), растворяющие агенты (например,
 30 глицерин, полиэтиленглицерин), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, метабисульфит натрия), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парааминбензойная кислота), разрыхляющие субстанции или модификаторы тонуса (например, лактоза, маннитол), ковалентные соединения с композицией полимеров, таких как полиэтиленгликоль, формирование комплексов с ионами металлов,
 35 включение материала в или к препаратам из полимерных композиций, таких как полимолочная кислота, полиглицоловая кислота, гидрогели и т.д., или внутрь липосом, микроэмульсий, мицеллей, униламеллярных или мультиламеллярных везикул, гемолизированных эритроцитов или сферопластов.

40 В одном осуществлении изобретения пища или пищевая добавка вводятся в форме напитка или сухой композиции вышеуказанных соединений в каждом из методов согласно изобретению.

Напиток включает эффективное количество активного ингредиента или ингредиентов вышеуказанных соединений, вместе с пищевым водорастворимым
 45 носителем, таким как минералы, витамины, углеводы, жиры и белки. Все эти компоненты применяются в сухом виде, если напиток производится в сухой форме. Напиток, производящийся готовым к употреблению, содержит воду. Готовый раствор также может иметь определенный тонус и кислотность, как, например, буферный
 50 раствор, согласно общим указаниям в предыдущем абзаце.

Предпочтителен рН в диапазоне от 2 до 5, и в особенности от 2 до 4, чтобы избежать роста бактерий и грибков. Простерилизованный напиток может также применяться при рН около 6-8.

Напиток может применяться один или в сочетании с одним или более терапевтически эффективными соединениями.

Согласно дальнейшему осуществлению изобретения фармацевтический препарат в виде лекарства для перорального и ректального применения может быть в форме 5 таблеток, пастилок, капсул, порошков, водных или масляных суспензий, сиропов, эликсиров, водных растворов и подобных, включающих в себя активный ингредиент с примесью фармацевтически приемлемых носителей и/или добавок, таких как растворители, консерванты, солюбилизаторы, эмульгаторы, адъюванты и/или 10 носители, применяемые в методе и открыто применяющиеся в настоящем изобретении.

Используемое в дальнейшем словосочетание «фармацевтически приемлемые носители» известно квалифицированным специалистам в данной области и может включать, но не ограничивается, 0,01-0,05 М фосфатным буфером или 0,8% соевым 15 раствором. Кроме того, такие фармацевтически приемлемые носители могут быть водными или неводными растворами, суспензиями и эмульсиями. Примерами неводных растворов являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, алкогольные/водные растворы, эмульсии 20 или суспензии, включая солевой раствор и буферную среду. Парентеральные основы включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, антимикробные вещества, антиоксиданты, хелатообразующие агенты, инертные газы и подобные.

Аминокислоты, составляющие часть амидов с альфа-кетоглутаровой кислотой или 25 дипептидов с глутамином или глутаминовой кислотой или трипептидов с глутамином и/или глутаминовой кислотой, могут быть любой аминокислотой, встречающейся в природе в составе пептидов. То же относится к фармацевтически приемлемым 30 физическим растворам альфа-кетоглутаровой кислоты или солей вышеуказанных соединений с по меньшей мере одной аминокислотой. Предпочтительны аминокислота/аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из аргинина, орнитина, лейцина, изолейцина и лизина.

Названные аминокислоты предпочтительно применять в L-конфигурации.

Примеры амидов из альфа-кетоглутаровой кислоты с аминокислотой и ди- или 35 трипептидом включают, но не ограничиваются, амидом альфа-кетоглутаровой кислоты с аминокислотой выбранной из группы, состоящей из глутамина, глутаминовой кислоты, аргинина, орнитина, лизина, пролина, изолейцина и лейцина и 40 амидов альфа-кетоглутаровой кислоты с дипептидом глутамина и любым из следующих веществ: глутаминовой кислотой, аргинином, орнитином, лизином, пролином, изолейцином и лейцином и с дипептидом глутаминовой кислоты и любым из следующих веществ: аргинином, орнитином, лизином, пролином, изолейцином и лейцином.

Примеры ди- и пептидов глутамина и глутаминовой кислоты с другими 45 аминокислотами включают вышеупомянутые в соединении с амидами альфа-кетоглутаровой кислоты с ди- и трипептидами.

Примеры физических растворов α -кетоглутаровой кислоты и ее солей с по меньшей 50 мере одной аминокислотой включают, но не ограничиваются, физическим раствором по меньшей мере одного из компонентов группы, состоящей из альфа-кетоглутаровой кислоты и ее солей натрия, калия, кальция, магния с любым из следующих веществ: глутамином, глутаминовой кислотой, аргинином, орнитином, лейцином, изолейцином,

лизином и пролином и любой комбинацией названных аминокислот.

Молярное соотношение между альфа-кетоглутаровой кислотой или ее солями и аминокислотой или аминокислотами из названного физического раствора должно в общем находиться в пределах от 1:0,01 до 1:2, предпочтительно от 1:0,1 до 1:1,5 и наиболее предпочтительно от 1:0,2 до 1:1,0.

Вводимая доза варьируется в зависимости от применяющегося действующего компонента или компонентов, заболевания, возраста, пола, веса и т.д. пациента, но должна в общем находиться в пределах от 1 до 1000 мг/кг веса в день или от 10 до 400 мг/кг веса в день, предпочтительно от 10 до 100 мг/кг веса в день.

Изобретение будет в дальнейшем проиллюстрировано рядом примеров, которые не следует толковать как ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕР

Анамнез: Хирургическое удаление желудка (гастрэктомия, Gx) ведет к остеопорозу у людей и животных. Гастрэктомия преимущественно повреждает структуру губчатой кости. Неясно, оказывает ли она также отрицательное воздействие на эпифизарный хрящ. Пищевой альфа-кетоглутарат (AKG) - источник гидроксипролина, наиболее богатого аминокислотой в кости и хряще про-коллагена. Целью исследований было осветить влияние AKG на костные/хрящевые поражения, связанные с гастрэктомией.

Способы: были использованы 40 самок крыс Спрейга-Дэули. Двадцать крыс были подвергнуты гастрэктомии и разделены на две группы: Gx+AKG и Gx+Плацебо. Другие двадцать крыс были подвергнуты имитации операции и разделены на две другие группы: Имитация+AKG и Имитация+Плацебо. Через 8 недель животные были умерщвлены и были отобраны черепа, бедренные кости и голени. Были установлены плотность костей (BMD) и минеральная насыщенность костной ткани (BMC) в правых бедренных костях и костях голени и проведена гистоморфометрия левых костей. Были также выполнены измерения черепов по трансиллюминационным снимкам.

Результаты: пищевой альфа-кетоглутарат оказывает сильное защитное воздействие на пораженные кости черепа крыс, подвергшихся гастрэктомии. AKG проявляет сильное антидеструктивное действие на клетки эпифизарного хряща, объем губчатых костей и форму трабекул крыс, подвергнутых гастрэктомии.

Заключение: AKG минимизирует повреждения кости и хряща, связанные с резекцией желудка у крыс.

Хирургическое удаление желудка ведет к остеопении и артриту у людей, крыс и других экспериментальных животных. У людей гастрэктомия связана с остеопенией. Дисфункция желудка также может способствовать развитию остеопороза с возрастом. Поэтому в большинстве исследований, связанных с заболеваниями костей, участвуют пациенты после резекции желудка.

Гастрэктомия поражает преимущественно губчатые кости, а порой также трубчатые кости, включая упомянутый эффект на разрушение костей черепа. Имеются сведения о сокращении массы трубчатых и губчатых костей у людей обоего пола. Объем губчатых костей бедра и голени сокращается на 60% через 16 недель после гастрэктомии. Потери костной массы повышают риск переломов бедра, позвоночника и других участков тела пациентов, подвергшихся гастрэктомии, что представляет серьезную проблему в настоящее время.

Предполагается, что потеря костной массы у пациентов, подвергшихся гастрэктомии, не является результатом недостаточности питания или недостатком желудочного сока или витамина D. Механизм гастрэктомия-индуцированной остеопении до сих пор неизвестен. Однако предполагается, что главной причиной

остеопорозов является малоэффективная резистентность коллагена кости после массового разрушения его остеокластами. Основным компонентом костного про- коллагена является пролин - аминокислоты, синтезируемые в желудочно-кишечном тракте из АКГ и через пролин, который в свою очередь превращается из костного про- коллагена в гидроксипролин в присутствии АКГ, витамина С и Fe^{2+} . Недавно было показано, что АКГ эффективен для предотвращения потери костной массы у крыс, подвергнутых овариэктомии, и в денервированных костях у индюков. С учетом всего вышесказанного главной целью исследований было установить, может ли пищевой АКГ предотвратить потери костной и хрящевой массы у крыс, подвергнутых гастрэктомии.

Животные и хирургические операции

Сорок самок крыс Спрейга-Дэули в возрасте 10 недель (220-230 г) содержались в клетках Macrolon® (по 2 крысы в каждой клетке) и получали питание из стандартного сухого корма для крыс (Lactamin, Vadstena, Sweden) и плацебо или АКГ *ad libitum*, растворенный в воде (Таблица 1). Исследование продолжалось 8 недель. Крыс каждую неделю взвешивали.

Крысы пили от 25 до 50 миллилитров каждый день. В целом можно считать, что крысы выпивали от 10 до 20% от массы тела.

Крысы из группы АКГ выпивали приблизительно 25 мл АКГ напитка в день. В 25 мл АКГ напитка содержится 0,36 г АКГ, что дает примерно от 1 до 1,4 г АКГ на кг веса крысы в день. Крысы в группе плацебо (контрольной группе) пили приблизительно 50 мл напитка-плацебо в день.

Хирургическая операция

Двадцать крыс были подвергнуты гастрэктомии и разделены на 2 группы: Gx+АКГ и Gx+плацебо (10 крыс в каждой группе). Железистый отдел желудка (т.е. часть, выделяющая кислоту, дно и пилорическая полость) были отсечены, после чего не- железистый отдел (кардиальный отдел желудка) был соединен с двенадцатиперстной кишкой конец-в-конец. 20 крыс были подвергнуты имитации операции и разделены на две группы: Имитация+АКГ и Имитация+Плацебо. Имитация операции включала абдоминальный разрез по средней линии, манипуляции с желудком и закрытие разреза. Для анестезии применялись подкожные инъекции Ketalar® (50 мг/кг, Parke-Davis, Morris Plains, NJ, U.S.A.) и Stresnil® (40 мг/кг; Janssen-Cilag Pharma, Vienna, Austria). Для анальгезии применялись подкожные инъекции Temgesic® (0,18 мг/кг, Schering-Plough, Kenilworth, NJ, U.S.A.). Лечение групп Имитация+Плацебо и Gx+Плацебо проводилось путем применения плацебо, в то время как группы Gx+АКГ и Имитация+АКГ получали лечение АКГ.

Крысы Gx каждую вторую неделю (начиная с первой недели после операции) получали внутримышечную инъекцию 0,4 мг/кг витамина В12 (Betolvex® 1 мг/мл, Dumex, Copenhagen, Denmark), чтобы возместить потери внутреннего фактора, влияющего на абсорбцию витамина В12, и 20 мг Fe^{3+} /кг из полимальтозного комплекса гидроксида железа (Ferrum 50мг Fe^{3+} мг/мл, Vifor (International) Inc., St.Gallen/Switzerland) как добавку, предупреждающую плохое всасывание железа в связи с потерей желудочного сока.

Эти добавки не оказывали воздействия на развитие веса тела крыс, не подвергавшихся хирургическим процедурам.

В течение эксперимента 8 животных умерло. Количество животных (n) составляло 7 в группе Имитация+Плацебо, 10 в группе Имитация+АКГ, 8 в группе Gx+Плацебо и 7 в группе Gx+АКГ.

Все животные были умерщвлены путем вскрытия брюшной аорты под анестезией, упомянутой выше.

Исследования были одобрены местным Комитетом по защите прав животных, Lund, Sweden.

Отбор и анализ тканей

Череп каждой крысы был вскрыт и очищен от мягких тканей путем тщательного удаления надкостницы. Высушивание достигалось покрытием каждого черепа марлей, смоченной в солевом растворе, и помещением их в воздухонепроницаемый контейнер при +4°C до изучения. Каждый череп был помещен в стеклянную чашку Петри на вершину источника света (промышленной осветительной трубы), излучающей свет постоянной интенсивности. Получившиеся трансиллюминационные изображения были сделаны камерой, присоединенной к операционному микроскопу, увеличение ×16. Изображения были подвергнуты анализу на гистоморфометрическом компьютере, выполненному ImageJ v. 1.33a. Была оценена потеря костной массы (при наблюдении площади лакун).

И бедренная, и большеберцовая кость были отобраны и хранились в 70% растворе этанола до дальнейшего анализа.

Правые бедренная и большеберцовая кости были подвергнуты анализу PIXIMUS, который показывает BMD в г/см и BMC в г/см.

Закрепленные этанолом бедренная и большеберцовая кость были декальцинированы в 7% азотной кислоте в течение 48 часов. Образцы дистальной части бедренной кости и проксимальной части большеберцовой кости (состоящей из эпифиза с восьмимиллиметровой частью метафиза) были использованы в дальнейшем гистологическом процессе. Образцы были погружены в парафин. Лонгитюдинальный срез образцов бедренной и большеберцовой кости (6 μм толщиной) был сделан автоматическим микромом Microm HM 360. Было сделано 20 срезов каждой кости (с промежутком 20 μм после каждых 5) одной особи. Срезы были окрашены гематоксилин/эозином при стандартных условиях. Были сняты микроскопические изображения каждого окрашенного среза. Снимки для оценки состояния губчатой кости были сделаны с помощью Nikon Eclipse E800 - светового микроскопа, увеличение ×40 и Nikon D70 - цифровой фотокамеры. Микроскопическое изображение срезов бедренной и большеберцовой кости были подвергнуты гистоморфометрическому компьютерному анализу. Анализ трабекул был сделан при помощи ImageJ v. 1.33a. Снимки для оценки состояния эпифизарного хряща были сделаны посредством контрастной техники Нормански и отобраны с оснащенного AXIOVERT 200 M с LSM 5 Pascal сканирующей лазерной головкой, Zeiss, увеличение ×100, с аргоновым лазером с длиной волны 514 нм. Анализ эпифизарного хряща был сделан при помощи Analysis v 3.0. Снимки суставного хряща были получены при помощи флуоресцентного режима AXIOVERT 200 M с LSM 5 Pascal сканирующей лазерной головкой, Zeiss, увеличение ×100, с аргоновым лазером с длиной волны 514 нм. Снимки суставного хряща были оценены Zeiss LSM Image Examiner v. 3.1.0.99. Параметрами оценки трабекул под эпифизарным хрящом были: объем губчатой кости (BV/TV %), измеряемый для получения характеристик губчатой кости, и фрактальный размер трабекул (Box Counting Method). Параметрами оценки эпифизарного хряща были: количество хрящевых клеток в ROI (зоне интереса), состоящей из зоны покоя, пролиферативной зоны и зоны гипертрофированного хряща. Оценка относительного содержания коллагена в суставном хряще была сделана при помощи измерения флуоресцентной интенсивности эозин-окрашенного коллагена в произвольно

выбранной ROI (с такой же площадью каждого среза - 6 пластинок по 83 μ m в диаметре каждая по всему протяжению суставного хряща), с детектором LSM 5 Pascal сканирующей лазерной головки с 12-битовым уровнем серого в качестве шкалы измерения. Измерения каждого среза были проведены в абсолютно одинаковых стандартных условиях.

Статистика

Данные были сверены при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), т-теста Стьюдента и $p < 0,05$ рассматривалась как статистически достоверная.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В конце эксперимента масса тела животных, подвергнутых операции, была на 8% меньше, чем у животных, подвергнутых имитации операции. Статистически достоверной разницы между группами не было (Фиг.1).

Трансиллюминационные снимки черепа

Трансиллюминационные снимки черепа показывают достоверный рост процента костных лакун в группах крыс Gx+плацебо и Gx+АКГ по сравнению с группами Имитация+Плацебо и Имитация+АКГ (Фиг.2). В группе крыс Gx+АКГ также был выявлен достоверно более низкий процент лакун по сравнению с группой Gx+плацебо. (* $p = 0,031$) (Фиг.3) Разница между группами Имитация+Плацебо и Имитация+ АКГ не была статистически достоверной.

Плотность костей (BMD) и минеральная насыщенность костной ткани (BMC) в бедренной и большеберцовой костях

В группах Gx+плацебо и Gx+АКГ BMD и BMC был ниже, чем в группах Имитация+Плацебо и Имитация+АКГ (данные не показаны). Однако BMD в группе Gx+АКГ имел тенденцию быть выше, чем в группе Gx+плацебо ($p=0,19$).

Гистоморфометрия

Анализ суставного хряща

Количество хрящевого коллагена в группе Gx+АКГ было то же, что в контрольных (подвергнутых имитации операции группах), и было достоверно выше по сравнению с группой Gx+плацебо (Таблица 2).

Анализ эпифизарного хряща

Количественная оценка роста клеток эпифизарного хряща показала снижение количества клеток в группе крыс Gx+АКГ по сравнению с группами крыс Имитация+Плацебо и Имитация+АКГ. Кроме того, количество хрящевых клеток в группе Gx+АКГ было достоверно больше, чем в обеих группах имитации (Таблица 3, 4).

Объем губчатой кости

Объем губчатой кости снижался в группах Gx+плацебо и Gx+АКГ по сравнению с группами Имитация+Плацебо и Имитация+АКГ. Однако сокращение площади трабекул в Gx+АКГ было меньше, чем в Gx+плацебо группе (Таблица 5, 6).

Фрактальный размер костной трабекулы

Фрактальный размер костной трабекулы в Gx+АКГ был одинаковым в контрольных группах и был выше, чем в Gx+плацебо (Таблица 7, 8).

ПОЯСНЕНИЕ

Целью эксперимента была оценка влияния пищевого альфа-кетоглутарата на потерю костной массы, вызванную гастрэктомией. Полученные данные подтвердили эту гипотезу. Действительно пищевой АКГ предотвращает потерю костной и хрящевой массы у крыс, подвергшихся гастрэктомии. Наши результаты согласуются с данными последних экспериментов, показывающих, что АКГ предотвращает развитие

остеопороза у крыс, подвергнутых овариэктомии и у женщин после менопаузы.

Гастрэктомия вызвала потерю хрящевого коллагена и хрящевых клеток в группах Gx+плацебо, но не в группе Gx+АКГ. В группе Gx+АКГ было подтверждено наличие на 22% больше хрящевых клеток, чем в Gx+плацебо группе. Это свидетельствует о том, что АКГ эффективен для предотвращения потери хрящевой массы у крыс, подвергшихся гастрэктомии. Анализ выявил защитное влияние АКГ на костный и хрящевой коллаген. Количество коллагена в группе Gx+АКГ находилось в пределах диапазона контрольной группы эксперимента и было примерно на 18% выше, чем у группы крыс Gx+Плацебо.

Наблюдался защитный эффект АКГ на кости черепа крыс, подвергнутых гастрэктомии. В черепах крыс группы Gx+АКГ обнаружилось на 20% меньше повреждений, чем в черепах крыс группы Gx+Плацебо. Значения BMD и BMC показывали, что гастрэктомия вызвала остеопению в Gx+плацебо и Gx+АКГ группах, что согласуется с другими экспериментами. Однако применяя более чувствительные гистоморфометрические технологии, мы показали, что АКГ, возможно, эффективен для предотвращения остеопении у Gx крыс.

Далее исследование объема костных трабекул показало на 38% меньше снижения в группе крыс Gx+АКГ по сравнению с группой животных Gx+Плацебо. Более того, фрактальное измерение трабекул в группе Gx+АКГ показало почти тот же уровень, что в группах имитации операции. Таким образом, альфа-кетоглутарат действительно оказывает сильное влияние на обновление костных трабекул.

Гастрэктомия оказывает сильное деструктивное влияние на скелет, вызывая остеопению и артропатию. АКГ не может полностью остановить эти повреждения, но он определенно ограничивал развитие деструктивных изменений кости и хряща, связанных с гастрэктомией, и, вероятно, способствовал обновлению скелетной системы. Итоги этих исследований могут быть важны для клинического наблюдения людей, например, когда частичная гастрэктомия рекомендована для снижения веса пациентам, страдающим ожирением. У всех этих пациентов развивается остеопороз и артропатия. Таким образом, введение этим пациентам пищевого АКГ может остановить или ограничить деструктивные изменения костей.

Таблица 1 Композиции напитков АКГ и плацебо		
Ингредиенты	АКГ (г/дм ³)	Плацебо (г/дм ³)
АКГ (альфа-кетоглутарат)	14,6	0
HCl соляная кислота	0	3,32
C ₆ H ₁₂ O ₆ глюкоза	30,0	30,0
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ сахароза	15,0	15,0
NaOH гидроксид натрия	3,6	3,6
KOH гидроксид калия	0,75	0,75
Ca(OH) ₂ гидроксид кальция	0,46	0,46
Mg(OH) ₂ гидроксид магния	0,18	0,18
pH	4,6	4,6

Для достижения одинакового уровня pH в каждом растворе напитков плацебо был оттитрован 0,1М HCl до pH 4,6 (уровень pH АКГ-напитка).

Таблица 2 Влияние АКГ и гастрэктомии на относительное содержание коллагена в суставном хряще		
Лечение	Флуоресценция	SD
Gx+АКГ	2363 ^a	623

Гх+Плацебо	1928 ^b	647
Имитация+АКГ	2475 ^a	457
Имитация+Плацебо	2171 ^a	374

5 Разные буквы, приведенные в столбце результатов, описывают достоверную разницу при $p < 0,05$.

$n=7$ в Гх+АКГ, $n=8$ в Гх+Плацебо, $n=10$ в Имитация+АКГ, $n=7$ в Имитация+Плацебо

10

Таблица 3 Влияние АКГ и гастрэктомии на количество хондроцитов в эпифизарном хряще бедра		
Лечение	Количество, клеток/мм ²	SD
Гх+АКГ	2220 ^a	490
Гх+Плацебо	1760 ^b	360
Имитация+АКГ	1890 ^b	330
Имитация+Плацебо	1850 ^b	220

15

Разные буквы, приведенные в столбце результатов, описывают достоверную разницу при $p < 0,05$.

$n=7$ в Гх+АКГ, $n=8$ в Гх+Плацебо, $n=10$ в Имитация+АКГ, $n=7$ в Имитация+Плацебо

20

Таблица 4 Влияние АКГ и гастрэктомии на количество хондроцитов в эпифизарном хряще большеберцовой кости		
Лечение	Количество, клеток/мм ²	SD
Гх+АКГ	2470 ^a	470
Гх+Плацебо	1950 ^b	330
Имитация+АКГ	1840 ^b	410
Имитация+Плацебо	2110 ^b	340

25

Разные буквы, приведенные в столбце результатов, описывают достоверную разницу при $p < 0,05$.

$n=7$ в Гх+АКГ, $n=8$ в Гх+Плацебо, $n=10$ в Имитация+АКГ, $n=7$ в Имитация+Плацебо

30

Таблица 5 Влияние альфа-кетоглутарата и гастрэктомии на объем губчатой кости бедра		
Лечение	Площадь трабекул (%)	SD
Гх+АКГ	18,8 ^a	3,7
Гх+Плацебо	11,2 ^b	2,1
Имитация+АКГ	25,5 ^c	7,8
Имитация+Плацебо	24,5 ^c	5,9

35

40 Разные буквы, приведенные в столбце результатов, описывают достоверную разницу при $p < 0,05$.

$n=7$ в Гх+АКГ, $n=8$ в Гх+Плацебо, $n=10$ в Имитация+АКГ, $n=7$ в Имитация+Плацебо

45

Таблица 6 Влияние альфа-кетоглутарата и гастрэктомии на объем губчатой кости в большеберцовой кости		
Лечение	Площадь трабекул (%)	SD
Гх+АКГ	16,7 ^a	3,4
Гх+Плацебо	10,5 ^b	2,5
Имитация+АКГ	24,9 ^c	5,3
Имитация+Плацебо	21,1 ^c	5,7

50

Разные буквы, приведенные в столбце результатов, описывают достоверную разницу при $p < 0,05$.

n=7 в Gx+AKG, n=8 в Gx+Плацебо, n=10 в Имитация+AKG, n=7 в Имитация+Плацебо

Таблица 7

Влияние альфа-кетоглутарата и гастрэктомии на фрактальном измерении бедренной кости

Лечение	Площадь трабекул (%)	SD
Gx+AKG	1,22 ^b	0,02
Gx+Плацебо	1,19 ^a	0,03
Имитация+AKG	1,24 ^b	0,04
Имитация+Плацебо	1,25 ^b	0,03

Разные буквы, приведенные в столбце результатов, описывают достоверную разницу при $p < 0,05$.

n=7 в Gx+AKG, n=8 в Gx+Плацебо, n=10 в Имитация+AKG, n=7 в Имитация+Плацебо

Таблица 8

Влияние альфа-кетоглутарата и гастрэктомии на фрактальном измерении большеберцовой кости

Лечение	Площадь трабекул (%)	SD
Gx+AKG	1,22 ^b	0,02
Gx+Плацебо	1,17 ^a	0,02
Имитация+AKG	1,22 ^b	0,03
Имитация+Плацебо	1,21 ^b	0,04

Разные буквы, приведенные в столбце результатов, описывают достоверную разницу при $p < 0,05$.

n=7 в Gx+AKG, n=8 в Gx+Плацебо, n=10 в Имитация+AKG, n=7 в Имитация+Плацебо

Пояснение к чертежам:

Фиг.1 Влияние пищевого альфа-кетоглутарата и гастрэктомии на вес тела крыс. Контрольные группы: ИМИТАЦИЯ+ПЛАЦ, GX+ПЛАЦ. Экспериментальные группы: ИМИТАЦИЯ+AKG, GX+AKG (ИМИТАЦИЯ - крысы, подвергнутые имитации операции, GX - крысы, подвергнутые гастрэктомии).

Фиг.2 Отобранные снимки черепов экспериментальных животных. Контрольные группы: ИМИТАЦИЯ+ПЛАЦ, GX+ПЛАЦ. Экспериментальные группы: ИМИТАЦИЯ+AKG, GX+AKG (ИМИТАЦИЯ - крысы, подвергшиеся имитации операции, GX - крысы, подвергшиеся гастрэктомии).

Фиг.3 Влияние пищевого альфа-кетоглутарата и гастрэктомии на трансиллюминационных снимках черепа. Контрольные группы: ИМИТАЦИЯ+ПЛАЦ, GX+ПЛАЦ. Экспериментальные группы: ИМИТАЦИЯ+AKG, GX+AKG (ИМИТАЦИЯ - крысы, подвергшиеся имитации операции, GX - крысы, подвергшиеся гастрэктомии).

Формула изобретения

1. Применение фармацевтически приемлемой соли альфа-кетоглутаровой кислоты для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики поражений хряща в условиях, включающих потерю веса и/или нарушенного питания, недостаточного питания, гастрэктомии, частичной гастрэктомии или перевязки желудка.

2. Применение по п.1, в котором фармацевтически приемлемая соль альфа-кетоглутаровой кислоты является солью щелочных или щелочноземельных металлов или их комбинаций, выбранных из солей натрия, калия, кальция, магния.

3. Применение по п.1, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту.

4. Применение по п.3, в котором аминокислота выбирается из: глутамина, глутаминовой кислоты, аргинина, орнитина, лейцина, изолейцина, пролина и их сочетаний.

5. Применение по п.2, где фармацевтически приемлемая соль альфа-кетоглутаровой кислоты является солью щелочных металлов.

6. Применение по п.2, где фармацевтически приемлемая соль альфа-кетоглутаровой кислоты является солью щелочноземельных металлов.

7. Применение по п.1, где фармацевтически приемлемой солью альфа-кетоглутаровой кислоты является альфа-кетоглутарат натрия.

8. Применение по любому из пп.1-7, в котором вводимая пациенту доза вещества находится в интервале от 1 до 1000 мг/кг массы тела/день.

9. Применение по любому из пп.1-7, в котором вводимая пациенту доза вещества находится в интервале от 10 до 400 мг/кг массы тела/день.

10. Применение по любому из пп.1-7, в котором вводимая пациенту доза вещества находится в интервале от 10 до 100 мг/кг массы тела/день.

11. Способ лечения или профилактики поражений хряща в условиях, включающих потерю веса и/или нарушенного питания, недостаточного питания, гастрэктомии, частичной гастрэктомии или перевязки желудка, где способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемую соль альфа-кетоглутаровой кислоты.

12. Способ по п.11, в котором фармацевтически приемлемая соль альфа-кетоглутаровой кислоты является солью щелочных или щелочноземельных металлов или их комбинаций, выбранных из солей натрия, калия, кальция, магния.

13. Способ по п.11, в котором фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту.

14. Способ по п.13, в котором аминокислота выбирается из: глутамина, глутаминовой кислоты, аргинина, орнитина, лейцина, изолейцина, пролина и их сочетаний.

15. Способ по п.12, где фармацевтически приемлемая соль альфа-кетоглутаровой кислоты является солью щелочных металлов.

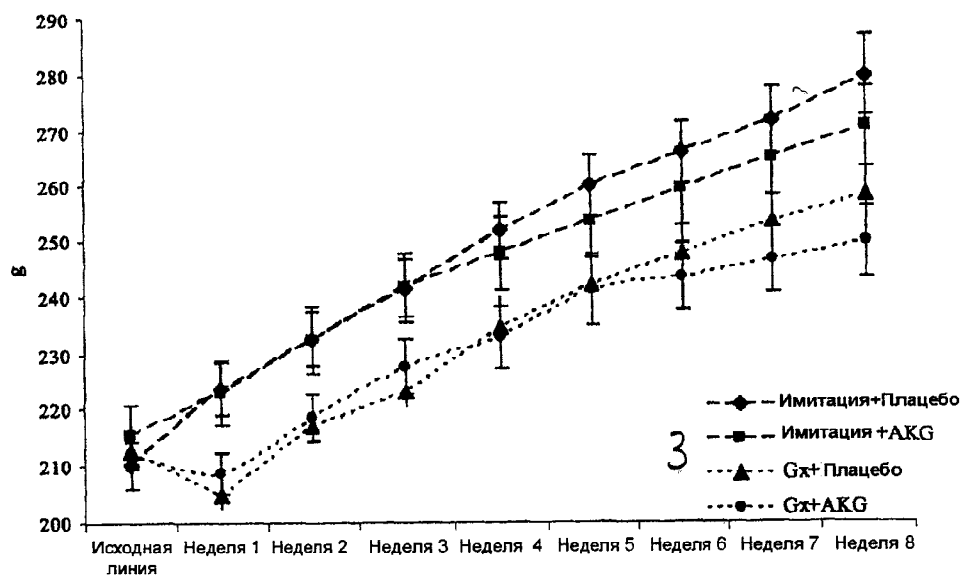
16. Способ по п.12, где фармацевтически приемлемая соль альфа-кетоглутаровой кислоты является солью щелочноземельных металлов.

17. Способ по п.11, где фармацевтически приемлемой солью альфа-кетоглутаровой кислоты является альфа-кетоглутарат натрия.

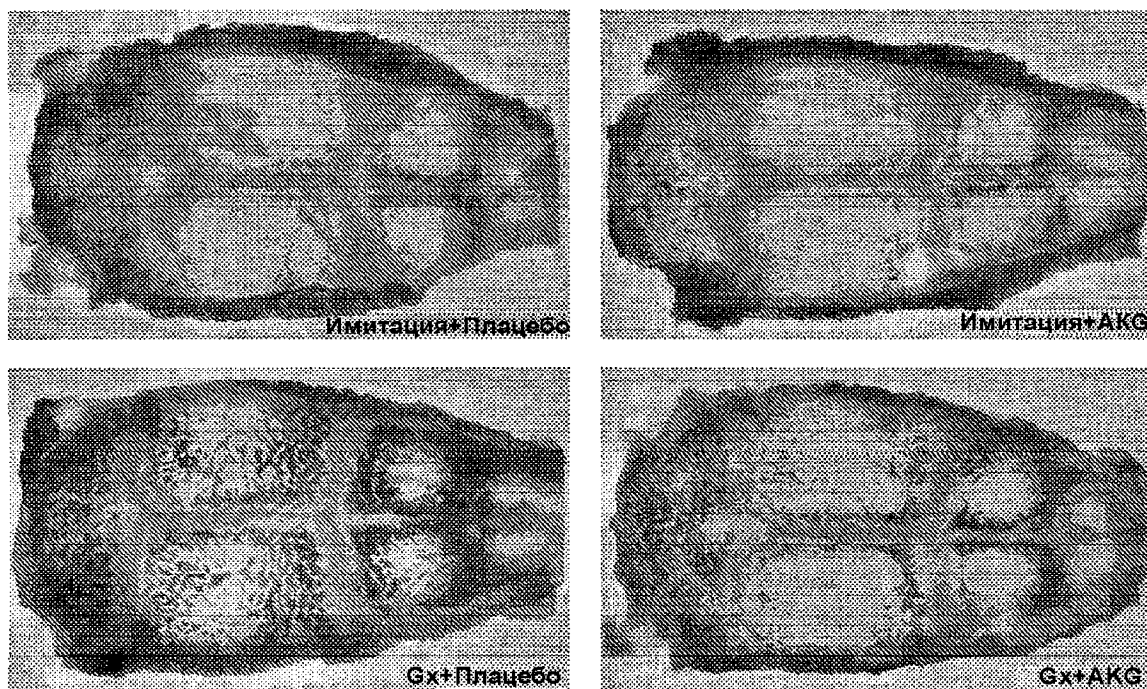
18. Способ по любому из пп.11-17, в котором вводимая пациенту доза вещества находится в интервале от 1 до 1000 мг/кг массы тела/день.

19. Способ по любому из пп.11-17, в котором вводимая пациенту доза вещества находится в интервале от 10 до 400 мг/кг массы тела/день.

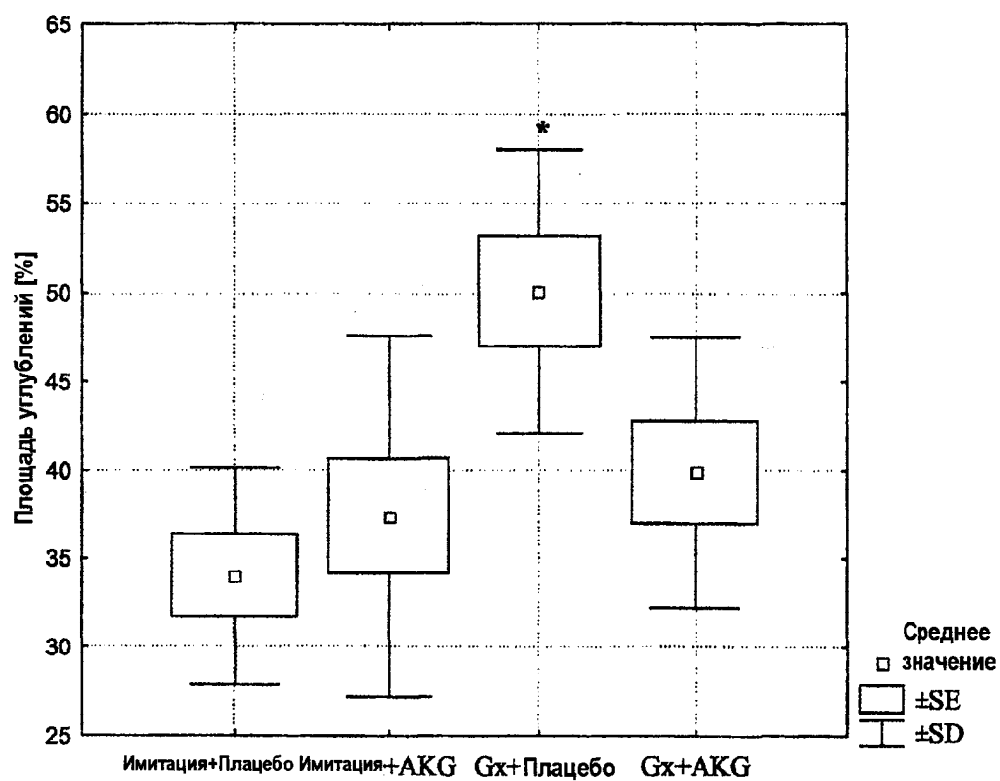
20. Способ по любому из пп.11-17, в котором вводимая пациенту доза вещества находится в интервале от 10 до 100 мг/кг массы тела/день.



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3