



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00692**

(22) Data de depozit: **08.09.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.03.2013** BOPI nr. 3/2013

(41) Data publicării cererii:
30.03.2010 BOPI nr. 3/2010

(73) Titular:
• **RAFIFARM S.R.L.**, ,,
DRĂGĂNEȘTI-VLAȘCA, TR, RO

(72) Inventatori:
• **MARCO PERETTO**, **CALEA CĂLĂRAȘI**
NR.3, AP.58, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **SĂRBULESCU CRISTINA**,
STR.C.A.ROSETTI NR.37, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **VICTOR VOICU**, **STR.C.A.ROSETTI**
NR.37, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:
RODALL S.R.L., **STR. POLONĂ NR.115,**
BLOC 15, SC. A, ET. 4, AP.19, SECTOR 1,
BUCUREȘTI

(56) Documente din stadiul tehnicii:

KUVANDIK GUVEN ȘI COLAB.: "EFFECTS OF ERDOSTEINE ON ACETAMINOPHEN - INDUCED HEPATOTOXICITY IN RATS", TOXICOLOGIC PATHOLOGY, 22.07.2008, SURSA SAGE JOURNALS ONLINE;
MORETTI M. ȘI COLAB.: "AN OVERVIEW OF ERDOSTEINE ANTIOXIDANT ACTIVITY IN EXPERIMENTAL RESEARCH", PHARMACOL RES., APRILIE 2007, REZUMAT, SURSA AMBASE/ELSEVIER;
ISIK BUNYAMIN ȘI COLAB., "ERDOSTEINE AGAINST ACETAMINOPHEN INDUCED RENAL TOXICITY", MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY, IULIE 2006, REZUMAT, SURSA PUBMED:16532256

(54) **UTILIZAREA ERDOSTEINEI CA ANTIDOT ÎN TRATAMENTUL INTOXICAȚIILOR, ÎN SPECIAL INTOXICAȚIILE CU METALE GRELE CUM AR FI PLUMB ȘI MERCUR**



1 Invenția se referă la utilizarea erdosteinei ca antidot în tratamentul intoxicațiilor cu
metale grele, în special, plumb și mercur.

3 Printre metalele grele cunoscute ca elemente toxice, cele mai întâlnite sunt mercurul
și plumbul.

5 Plumbul (Pb) este un element prezent în mod normal în natură. Utilizarea plumbului
ca aditiv pentru vopsele și carburanți a determinat creșterea riscului de intoxicații. Sărurile
7 de plumb pot fi absorbite prin ingestie sau inhalatie. Perioada de înjumătățire a plumbului în
sânge este de aproximativ 30...35 zile, iar a plumbului din oase de circa 10^4 zile (aproape
9 30 de ani).

11 Mercurul (Hg) se găsește în stare naturală, sub formă de săruri organice sau
anorganice. Mercurul în stare naturală este utilizat în termometre, sfingomanometre, baterii
și altele. Sărurile de mercur sunt utilizate în mai multe procese de producție. Mercurul
13 organic se utilizează în *coatings*, ca fungicid, și în unele procese industriale. Perioada de
înjumătățire a mercurului în organismul uman este de 40...70 zile. Mercurul în stare naturală
15 este volatil și poate fi absorbit pe cale respiratorie. Sărurile organice și anorganice de mercur
se absorb pe cale transcutanată sau gastrointestinală.

17 Sunt cunoscute câteva antidoturi pentru tratarea intoxicațiilor cu metale grele, în
primul rând, agenți chelanți, cum este etilenediaminetetraacetic acid (EDTA), un medicament
19 vechi și probabil cel mai mult folosit, eventual asociat cu dimercaprol (BAL). Principala
problemă, în acest caz, este nespecificitatea agenților chelanți față de ionii de metal pe care
21 îi izolează, aceștia acționând și asupra elementelor vitale pentru funcțiile fiziologice normale,
cum ar fi calciul și zincul. Utilizarea pe termen lung sau în tratamentul intoxicațiilor cronice
23 a acestor chelatori este descurajată din cauza efectelor adverse severe care apar în aceste
condiții.

25 N-acetilcisteina (NAC) este de multă vreme standardul de referință pentru tratamentul
intoxicațiilor cu paracetamol și în mai multe țări are o indicație clară pentru tratamentul
27 intoxicațiilor cu plumb. NAC este de asemenea un medicament în evaluare pentru câteva
alte indicații, fiind în prezent folosit în afara indicațiilor în tratamentul intoxicațiilor cu mercur,
29 susținut de câteva studii experimentale (Aremu et al., *Environ Health Perspect*, 2008
January, 116(1): 26-31; Koh et al., *Molecular Pharmacology*, Vol. 62, Issue 4, 921-926,
31 October 2002; Ballatori et al., *Environ Health Perspect*, 1998 May, 106(5): 267-271). NAC
este utilizat sub formă orală și injectabilă.

33 Nu am găsit în literatură nicio indicație de terapie profilactică pentru acest gen de
intoxicații; categoriile profesionale expuse la un mare grad de risc de intoxicație în timpul
35 activităților specifice fiind militarii, pompierii, muncitorii specializați și alții. Profilaxia poate fi
luată în considerare, de asemenea, și în unele situații de siguranță publică.

37 Erdosteina este un medicament înregistrat în mai multe țări ca mucolitic. Folosirea
pe scară largă, ca mucolitic, studiile publicate și datele de siguranță post marketing arată că
39 erdosteina este un medicament cu o toleranță excelentă, cel puțin în doza folosită ca
mucolitic. Datorită prezenței a două grupări tiolice, erdosteina a demonstrat *in vitro* o acțiune
41 antioxidantă puternică.

43 Considerăm că erdosteina poate fi un antidot eficient și mult mai sigur pentru o scară
largă de intoxicații, în special, în intoxicațiile cu metale grele.

45 În literatură, s-a dovedit că erdosteina per os, în intoxicațiile cu paracetamol, are efect
protectiv la nivel hepatic și renal (Kuvandik Guven et al., *Toxicologic pathology* 2008;
Moretti et al., *Pharmacological research*, 2007; Isik Buyandin et al., *Molecular and cellular*
47 *biochemistry*, 2007).

Erdosteina este foarte puțin solubilă în apă, ceea ce nu a permis dezvoltarea unei forme farmaceutice injectabilă, până acum. Consideram că inventarea unei forme injectabile și stabilă, pentru erdosteina, ar fi inovativ, la terapia unei intoxicații acute.

Pentru a testa eficacitatea în diferite intoxicații, am decis să efectuăm mai multe experimente. Am descoperit că erdosteina are o toxicitate intrinsecă extrem de redusă. Într-un prim experiment, comparăm loturi intoxicate cu plumb/mercur și apoi tratate cu erdosteina cu loturi intoxicate și netratate, și loturi intoxicate și tratate cu NAC, considerând NAC ca cel mai promițător antidot existent (disponibil și în formă orală și în formă injectabilă). NAC este probabil mai sigur decât EDTA sau BAL. NAC este din punct de vedere chimic asemănător cu erdosteina și am considerat important să le comparăm între ele.

Am decis testarea atât per os (p.o.), cât și intravenos (i.v.), creând o formulă farmaceutică specifică. În primul experiment, a fost testată p.o. și în al doilea forma i.v. a erdosteinei, în comparație cu formele corespunzătoare de NAC. Am dezvoltat formule speciale pentru tratamentul i.v., evaluând toxicitatea intrinsecă și stabilitatea pentru aceste forme farmaceutice. Tratamentul cu erdosteina s-a dovedit a fi mai eficient în comparație cu lotul fără tratament și cu cel tratat cu NAC. În al treilea experiment, am comparat eficacitatea tratamentului cu erdosteina versus lot fără tratament, versus lot cu terapie tradițională EDTA+BAL, și versus lot tratat cu erdosteina adăugată terapiei EDTA+BAL, la animale intoxicate cu plumb. Terapia cu erdosteina s-a dovedit a fi mai eficientă față de absența terapiei și față de terapia tradițională, atât în ceea ce privește mortalitatea, cât și parametrii vitali la supraviețuitori.

În al patrulea experiment, am comparat erdosteina injectabilă cu NAC (terapia standard), la animale intoxicate cu paracetamol. Din punct de vedere chimic, paracetamolul fiind foarte diferit de metalele grele, putem extrapola utilizarea erdosteinei ca un antidot cu spectru larg. S-a dovedit că lotul tratat cu erdosteina a înregistrat o mortalitate mai scăzută comparativ cu lotul netratat, și a avut rezultate mai bune la supraviețuitori în comparație cu lotul tratat cu NAC.

În al cincilea experiment, s-a testat efectul profilactic al erdosteinei în intoxicația cu metale grele. Profilaxia cu erdosteina s-a dovedit a nu afecta starea generală de sănătate a subiecților înaintea intoxicației; în același timp, a avut efect protector împotriva intoxicației.

Exemplul 1. Primul exemplu este reprezentat de evaluarea efectelor erdosteinei p.o. la șobolani intoxicați cu plumb și la șobolani intoxicați cu mercur, în comparație cu loturi netratate și cu loturi tratate cu NAC.

MATERIALE ȘI METODE

Pentru fiecare experiment, loturile sunt omogene și diferențele între loturi pot fi puse pe seama terapilor diferite. S-a încercat, cât de mult posibil, menținerea constantă a condițiilor pentru toate experimentele, cu excepția celor specificate în anumite momente.

Cele mai importante variabile care nu au fost constante în diferitele experimente sunt vârsta animalelor și condițiile externe (temperatură, umiditate). Loturile analoage din experimente diferite (neexecutate în paralel) nu pot fi comparate.

Substanțe și soluții utilizate în experiment

- Acetat de plumb trihidrat (formula moleculară $C_4H_6O_2Pb \cdot 3H_2O$, masa moleculară 379,33, solubilitate 45,61 g la 100 ml apă la 15°C, DL_{50} pe cale orală 4665 mg/kg) (*Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 18, p. 185, 1991).

- Clorură de mercur (formula moleculară $HgCl_2$, masa moleculară 271,5, solubilitate în apă 7,4 g/100 ml apă la 20°C, DL_{50} pe cale orală mg/kg, 42 mg/kg) (*Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 18, p. 185, 1991).

1 - N-acetilcisteină/NAC (formula moleculară $C_5H_9NO_3S$, greutatea moleculară 163,19, ușor solubilă în apă. DL_{50} la șobolan. i.v. 1140 mg/kg (European Journal of Respiratory Diseases vol. 61, p. 138) per os 5050 mg/kg (*Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 18, p. 185, 1991).

5 - Erdosteina (formula moleculară $C_8H_{11}NO_4S_2$, greutatea moleculară 249,31, moderat solubil în apă, DL_{50} la șobolan i.v. >3500 mg/kg, per os 8750 mg/kg (*European Patent Application*, vol. 0061 1386).

Materialul biologic

9 Au fost introduse în experiment 210 animale de laborator, șobolani rasa Wistar, masculi și femele. Animalele au fost repartizate în loturi omogene de câte 30 animale (15 femele, 15 masculi), ținute în microclimat adecvat (vivariu), cu acces liber la hrană și apă, în afara contactului cu insecticide.

Metode de administrare a soluțiilor de lucru

13 - Acetatul de plumb s-a administrat per os la șobolan, în doză de 4665 mg/kg (1 DL_{50}).

15 - Clorura de mercur s-a administrat per os. în doză de 42 mg/kg (1 DL_{50}).

17 - N-Acetilcisteina s-a administrat per os. în doză de 500 mg/kg (reprezentând 1/10 din DL_{50} pe cale orală, doza considerată în literatura de specialitate ca doză eficientă), la 2 loturi diferite, imediat după administrarea per os a unui DL_{50} de acetat de plumb și, respectiv, clorură mercurică. Administrarea N-acetilcisteinei s-a repetat zilnic, timp de 7 zile.

21 - Erdosteina s-a administrat per os. în doză de 875 mg/kg (corespunzătoare unei fracțiuni de 1/10 din DL_{50} . pe cale orală - doza considerată în literatura de specialitate ca eficientă). imediat după administrarea per os, la 2 loturi diferite, a unui DL_{50} de acetat de plumb și, respectiv. clorură mercurică. Administrarea erdosteinei s-a repetat zilnic. timp de 7 zile. Soluțiile de lucru au fost administrate per os, prin gavare, în volum de 10 ml/kg.

27 Solventul utilizat la prepararea soluțiilor de lucru a fost reprezentat de apă distilată, în cazul N-acetilcisteinei, și, respectiv, un amestec de apă bidistilată și bicarbonat de sodiu, acesta din urmă echimolar cu erdosteina.

Monitorizarea animalelor

29 Monitorizarea animalelor înaintea experimentului a constat în urmărirea curbei ponderale și a stării de sănătate, pe o perioadă de 7 zile, înaintea începerii experimentului. Cu 24 h înainte de începerea experimentului, animalelor li s-a restricționat accesul la hrană, având acces liber la apă.

35 Monitorizarea animalelor în timpul experimentului a constat în urmărirea stării de sănătate, înregistrarea semnelor de intoxicație și a mortalității, pe toată perioada experimentului.

37 Monitorizarea biologică a constat în determinări cantitative, efectuate la supraviețuitori, la 7 zile după intoxicație, și tratament, ale valorilor hemoglobinei, hematocritului, numărul de eritrocite și leucocite, a ureei, creatininei și acidului uric (specimen: 1 ml) și determinarea cantitativă a plumbului și, respectiv, a mercurului în urină.

Etapile experimentului

41 Au fost utilizate două modele experimentale de intoxicație acută pentru intoxicația cu plumb, și, respectiv, pentru intoxicația cu mercur, pentru a testa eficacitatea erdosteinei comparativ cu cea a N-acetilcisteinei utilizate ca substanță de referință.

45 S-a înregistrat mortalitatea pe tot parcursul intervalului studiat (7 zile). La 7 zile după intoxicație și tratament, s-au determinat următorii parametri: hemoleucograma, numărul de eritrocite și leucocite, hematocrit, uree, creatinină, acid uric și valorile plumbului și mercurului în urină. Animalele au fost sacrificate prin decapitare sub anestezie generală cu eter, pentru

RO 125302 B1

recoltarea de organe (ficat, tub digestiv, rinichi). 6 animale din fiecare lot (3 masculi și 3 femele) au fost selectate aleatoriu, pentru examen anatomopatologic macro și microscopic.	1
<i>Evaluarea efectului erdosteinei pe modelul experimental de intoxicație cu plumb</i>	3
Au fost introduse în experiment 4 loturi a câte 30 animale (15 masculi și 15 femele).	
Repartizarea a fost făcută în loturi omogene, astfel:	5
Lotul 1 - martor normal, neintoxicat și netratat.	
Lotul 2 - intoxicat cu acetat de plumb și netratat, la care s-a administrat acetat de plumb în doză de 4665 mg/kg (1 DL ₅₀) per os.	7
Lotul 3 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu erdosteină. La acest lot s-a administrat acetat de plumb în doză de 4665 mg/kg per os. Imediat după intoxicație și zilnic timp de 7 zile, s-a administrat per os erdosteină, în doze de 875 mg/kg (corespunzătoare unei fracțiuni de 1/10 din DL ₅₀ pe cale orală).	9
Lotul 4 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu N-acetilcisteină. La acest lot s-a administrat acetat de plumb în doză de 4665 mg/kg p.o. Imediat după intoxicație, s-a administrat N-acetilcisteină, per os, în doze de 500 mg /kg (1/10 din DL ₅₀ pe cale orală).	11
Administrarea NAC s-a repetat zilnic timp de 7 zile.	13
<i>Evaluarea efectului erdosteinei pe modelul experimental de intoxicație cu mercur</i>	15
Au fost introduse în experiment 3 loturi a câte 30 animale (15 masculi și 15 femele pe lot), astfel:	17
Lotul 5 - intoxicat cu clorură de mercur și netratat, la care se va administra, per os, clorură de mercur în doză de 42 mg/kg.	19
Lotul 6 - intoxicat cu clorură de mercur și tratat cu erdosteină. S-a administrat, per os, clorură de mercur în doză de 42 mg/kg. Imediat după intoxicație și zilnic timp de 7 zile, s-a administrat per os erdosteină, în doze de 875 mg/kg . Administrarea erdosteinei s-a repetat zilnic, timp de 7 zile.	21
Lotul 7 - intoxicat cu clorură de mercur și tratat cu N-acetilcisteină. La acest lot se va administra, per os, clorură de mercur în doză de 42 mg/kg. Imediat după intoxicație, se va administra N-acetilcisteină, per os, în doze de 500 mg /kg. Administraea NAC s-a repetat zilnic, timp de 7 zile.	23
<i>Metoda de analiza statistică</i>	25
Analiza statistică a rezultatelor experimentale s-a efectuat prin testarea semnificației diferenței mediilor valorilor rezultate experimental prin utilizarea testului t Student, varianta impară, din cadrul programului de calcul statistic Origin 5.0. Analiza mortalității a fost efectuată prin testul Chi pătrat. Au fost considerate semnificative statistic rezultatele cu p<0,05.	27
<i>Instrumente analitice</i>	29
Teste biochimice au fost efecuate prin Reflodon 2000, teste hematologice prin Hemastar 4, sumar de urine prin Urilux, Pb în urină cu GC-MS Varian.	31
REZULTATE	33
Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele următoare.	35
<i>Mortalitate</i>	37
	39
	41

Tabelul 1

Evaluarea protecției realizate prin administrarea erdosteină în intoxicația acută cu plumb și mercur față de netratat și comparativ cu cea dată de N-acetilcisteină

Nr. lot (30 animale/lot)	Mortalitate totală	Mortalitate procentuală
Lot 1 martor	0	0
Lot 2 (intoxicat cu acetat de plumb și netratat)	11	36,6%
Lot 3 (intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu erdosteină)	5	16,6%
Lot 4 (intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu N-acetilcisteină)	9	30%
Lot 5 (intoxicat cu clorură mercurică și netratat)	13	43,3%
Lot 6 (intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu erdosteină)	51	16,6%
Lot 7 (intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu N-acetilcisteină)	10 ²	33,3%

¹ semnificativ diferit față de lotul intoxicat și netratat;

² nesemnificativ diferit față de lotul intoxicat și netratat.

Lotul intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu erdosteină a înregistrat o mortalitate statistic semnificativ mai mică față de lotul intoxicat cu clorură mercurică și netratat. Loturile tratate cu erdosteină arată o mortalitate scăzută față de loturile tratate cu NAC, dar aceste diferențe nu sunt statistic semnificative.

Supraviețuitori - Rezultate biochimice

Tabelul 2

Evidențierea efectului erdosteină asupra toxicității renale din intoxicația cu plumb și mercur, prin evaluarea valorilor ureei sanguine, creatininei și acidului uric față de grupurile martor normal, netratat și tratat cu NAC

Nr. lot (30 animale/lot)	Valori medii uree (mg/dl)	Valori medii creatinină	Valori medii acid uric (mg/dl)
Lot 1 martor normal	48,46	0,50	2,32
Lot 2 - intoxicat cu acetat de plumb și netratat	159,76 ³	0,82 ³	2,67 ³
Lot 3 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu erdosteină	50,93 ^{1,2}	0,48 ^{1,2}	1,90 ³
Lot 4 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu N-acetilcisteină	104,15 ³	0,66 ³	2,36 ¹
Lot 5- intoxicat cu clorură de mercur și netratat	189,73 ³	2,20 ³	2,68 ³
Lot 6 - intoxicat cu clorură de mercur și tratat cu erdosteină	49,18 ^{1,2}	0,47 ^{1,2}	2,40 ¹
Lot 7 - intoxicat cu clorură de mercur și tratat cu N-acetilcisteină	85,45 ³	0,56 ³	2,38 ¹

¹ nesemnificativ față de martor normal;

² semnificativ diferit față de lotul tratat cu NAC;

³ semnificativ față de martor normal.

RO 125302 B1

Supraviețuitori - rezultate hematologice

Tabelul 3

Evidențierea efectului erdosteinei asupra tabloului hematologic din intoxicația cu plumb și mercur, față de grupurile martor normal, netratat și tratat cu NAC

Nr. lot (30 animale/lot)	Valori medii nr. eritrocite (*10 ⁶ /mm ³)	Valori medii Hemoglobină (g/dl)	Valori medii Hematocrit	Valori medii nr. leucocite
Lot 1 martor normal	7,77	16,84	49,15	6,24
Lot 2 (intoxicat cu acetat de plumb și netratat)	6,98 ³	15,46 ³	41,00 ³	11,95 ³
Lot 3 (intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu erdosteină)	6,82 ³	13,75 ³	39,41 ³	7,31 ³
Lot 4 (intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu N-acetilcisteină)	6,55 ³	13,58 ³	41,42 ³	6,82 ³
Lot 5 (intoxicat cu clorură mercurică și netratat)	6,96 ³	15,46 ³	40,47 ³	12,09 ³
Lot 6 (intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu erdosteină)	6,81 ³	13,75 ³	38,58 ³	7,81 ³
Lot 7 (intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu N-acetilcisteină)	6,92 ³	13,58 ³	41,50 ³	6,72 ³

³ semnificativ față de martor normal.

Nivelul urinar de Pb și Hg

Tabelul 4

Pb în urină, măsurat cu GS MS Varian 4100

Nr. lot (30 animale/lot)	Pb valori medii
Lot 1 martor normal	225 µg/l
Lot 2 (intoxicat cu Pb, netratat)	5,2 mg/l
Lot 3 (intoxicat cu Pb, tratat cu erdosteină)	10,9 mg/l
Lot 5 (intoxicat cu Pb, tratat cu NAC)	13,2 mg/l

Tabelul 5

Hg în urină, măsurat cu GS MS Varian 4100

Nr. lot (30 animale/lot)	Hg valori medii
Lot 1 martor normal	0
Lot 7 (intoxicat cu Hg, netratat)	2,8 mg/l
Lot 8 (intoxicat cu Hg, tratat cu erdosteine)	14,7 mg/l
Lot 10 (intoxicat cu Hg, tratat cu NAC)	11,5 mg/l

Rezultate anatomopatologice

Examenele macroscopice și microscopice au evidențiat următoarele rezultate:

În intoxicația cu Pb s-au determinat leziuni cerebrale moderate, leziuni hepatice și leziuni severe la nivel gastric și renal. Tratamentul cu NAC nu a ameliorat leziunile, în timp ce tratamentul cu erdosteină a determinat afectări mai puțin importante.

În intoxicația cu Hg, alterările cerebrale, gastrice și renale sunt severe. Animalele tratate cu erdosteină sau cu NAC au prezentat leziuni mai puțin importante.

DISCUȚII EXEMPLUL 1

Tratamentul cu erdosteină a redus semnificativ mortalitatea în grupul intoxicat cu clorură mercurică, chiar cu un număr relativ mic de animale pe lot, în timp ce pentru lotul tratat cu NAC, nu s-a obținut un rezultat statistic diferit față de lotul netratat. Erdosteina a redus mortalitatea aproape la jumătate față de NAC, în grupurile intoxicate cu acetat de plumb, dar ca urmare a numărului redus de animale, diferența nu este semnificativă.

La animalele supraviețuitoare, toxicitatea plumbului și a mercurului este severă și a fost evidențiată biochimic și anatomopatologic, prin alterări ale funcției renale (uree, creatinină, acid uric), digestive și ale parametrilor hematologici (nr. eritrocite, hemoglobină, hematocrit, nr. leucocite).

Administrarea erdosteinei a oferit un indice de protecție mai bun decât lotul netratat în intoxicațiile cu plumb și mercur, prin reducerea apariției efectelor toxice, cât și prin accelerarea eliminării urinare a toxicelor.

Administrarea erdosteinei oferă o protecție mai bună decât NAC asupra toxicității renale, valorile ureei și ale creatininei fiind în limite normale. Diferențele față de grupurile tratate cu NAC au fost semnificative.

Administrarea atât a erdosteinei, cât și a NAC, nu a antagonizat toxicitatea hematologică și inflamația, prezente în intoxicațiile cu plumb și mercur.

Evaluările anatomopatologice au confirmat că erdosteina a oferit o protecție superioară și a evidențiat leziuni mai reduse la nivel hepatic, renal și al aparatului digestiv, comparativ cu loturile intoxicate-netratate și intoxicate-tratate cu NAC.

Exemplul 2. Al doilea exemplu de realizare este reprezentat de evaluarea efectului erdosteinei administrate intravenos în intoxicația cu plumb și cu mercur, utilizând N-acetilcisteină ca substanță de referință.

Substanțele și soluțiile utilizate în experiment sunt identice cu cele de la exemplul 1.

Materialul biologic

Au fost introduse în experiment 335 de animale de laborator, șobolani rasa Wistar, masculi și femele. Animalele au fost repartizate random în 11 loturi: 9 loturi de câte 35 animale (20 femele, 15 masculi) plus 2 loturi de 10 animale fiecare (5 femele, 5 masculi), ținute în microclimat adecvat (vivariu), cu acces liber la hrană și apă, în afara contactului cu insecticide.

Metode de administrare a soluțiilor de lucru

- Acetatul de plumb s-a administrat per os, la șobolan, în doză de 4665 mg/kg (1 DL₅₀).

- Clorura de mercur s-a administrat per os, în doză de 42 mg/kg (1 DL₅₀).

- N-Acetilcisteina s-a administrat i.v. în vena laterală a cozii, în doză de 114 mg/kg (reprezentând 1/10 din DL₅₀ pe cale i.v.), la 2 loturi diferite, imediat după administrarea per os a 1 DL₅₀ de acetat de plumb și, respectiv, clorură mercurică. Administrarea N-acetilcisteinei s-a repetat zilnic, timp de 7 zile. NAC a fost dizolvat în apă bidistilată.

- Erdosteina s-a administrat i.v. lent (1...2 min) în vena laterală a cozii, imediat după administrarea per os a plumbului sau mercurului, 2 doze la 4 loturi diferite, și anume:	1
ERDO1: 350 mg/kg (aproximativ 1/10 DL ₅₀) la 2 loturi ERDO2: 175 mg/kg (aproximativ 1/20 DL ₅₀), la 2 loturi.	3
Administrarea erdosteinei s-a repetat zilnic, timp de 7 zile. Erdosteina a fost dizolvată într-un amestec de apă bidistilată și bicarbonat de sodiu echimolar și administrată i.v. într-un volum de 10 ml/kg. Într-un studiu preliminar al nostru, s-a testat raportul erdosteină/ bicarbonat, pentru valori între 0,5/1 și 1,5/1, și volumul de dizolvare. A fost evidențiat că raportul optim este 1:1 350 mg erdosteine + 118 mg bicarbonat și este posibilă dizolvarea în volum de 10 ml. S-a păstrat același volum de dizolvare și la doză mai mică.	5
<i>Monitorizarea animalelor</i>	11
Monitorizarea animalelor înaintea experimentului a constat în urmărirea curbei ponderale și a stării de sănătate, pe o perioadă de 7 zile, înaintea începerii experimentului. Cu 24 h înainte de începerea experimentului, animalelor li s-a restricționat accesul la hrană, având acces liber la apă.	13
Monitorizarea animalelor în timpul experimentului a constat în urmărirea stării de sănătate, înregistrarea semnelor de intoxicație și a mortalității pe toată perioada experimentului.	15
Monitorizarea biologică a constat în determinări cantitative, efectuate la supraviețuitori, la 7 zile după intoxicație, și tratament, ale valorilor hemoglobinei, hematocritului, nr. eritrocite și leucocite, a ureei, creatininei și acidului uric (specimen: 1 ml) și determinarea cantitativă a plumbului și, respectiv, a mercurului în urină.	17
<i>Etapele experimentului</i>	19
Au fost utilizate două modele experimentale de intoxicație acută, pentru intoxicația cu plumb și, respectiv, pentru intoxicația cu mercur, pentru a testa eficacitatea erdosteinei comparativ cu cea a N-acetilcisteinei utilizate ca substanță de referință.	21
S-a înregistrat mortalitatea pe tot parcursul intervalului studiat (7 zile). La 7 zile după intoxicație și tratament, s-au determinat următorii parametri: hemoleucograma, nr. eritrocite și leucocite, hematocrit, uree, creatinină, acid uric și valorile plumbului și mercurului în urină. De la câteva animale, s-a colectat urina emisă spontan, pentru a determina nivelul de Pb și Hg. Animalele au fost sacrificate prin decapitare sub anestezie generală cu eter, pentru recoltarea de organe (ficat, tub digestiv, rinichi). 6 animale din fiecare lot (3 masculi și 3 femele) au fost selectate aleatoriu, pentru examen anatomopatologic macro și microscopic.	23
<i>Evaluarea efectului erdosteinei administrate parenteral pe modelul experimental de intoxicație cu plumb</i>	27
Au fost introduse în experiment 5 loturi a câte 35 animale (15 masculi și 20 femele), repartizate în loturi omogene, astfel:	29
Lotul 1 - martor normal neintoxicat și netratat.	31
Lotul 2 - intoxicat cu acetat de plumb și netratat, la care s-a administrat acetat de plumb în doză de 4665 mg/kg (1 DL ₅₀) per os.	33
Lotul nr. 3 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu ERDO1. La acest lot s-a administrat acetat de plumb în doză de 4665 mg/kg per os. Imediat după intoxicare și zilnic, timp de 7 zile, s-a administrat i.v. erdosteină în doză de 350 mg/kg (doza reprezentând <1/10 din 1 DL ₅₀ pe cale i.v.).	35
Lotul nr. 4 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu ERDO2. La acest lot s-a administrat acetat de plumb în doză de 4665 mg/kg per os. Imediat după intoxicare și zilnic, timp de 7 zile, s-a administrat i.v. erdosteină în doză de 175 mg/kg (doza reprezentând <1/20 din 1 DL ₅₀ pe cale i.v.).	37

RO 125302 B1

Lotul nr. 5 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu N-acetilcisteină. La acest lot s-a administrat acetat de plumb în doză de 4665 mg/kg p.o. Imediat după intoxicare și zilnic, timp de 7 zile, s-a administrat i.v. N-acetilcisteină, i.v. în doză de 114 mg /kg (doza reprezentând 1/10 din 1 DL₅₀ pe cale i.v.).

Evaluarea efectului erdoesteinei pe modelul experimental de intoxicație cu mercur
Au fost introduse în experiment, în paralel cu celelalte 5, 4 loturi a câte 35 animale (15 masculi și 20 femele pe lot):

Lotul 7 - intoxicat cu clorură de mercur și netratat, la care s-a administrat, per os, clorură de mercur, în doză de 42 mg/kg.

Lotul nr. 8 - intoxicat cu clorură de mercur și tratat cu ERDO1, la care s-a administrat, per os, clorură de mercur, în doză de 42 mg/kg. Imediat după intoxicare și zilnic, timp de 7 zile, s-a administrat i.v. erdoesteină, în doză de 350 mg/kg.

Lotul nr. 9 - intoxicat cu clorură de mercur și tratat cu ERDO2, la care s-a administrat, per os, clorură de mercur, în doză de 42 mg/kg. Imediat după intoxicare și zilnic, timp de 7 zile, s-a administrat i.v. erdoesteină în doză de 175 mg/kg .

Lotul nr. 10 - intoxicat cu clorură de mercur și tratat cu N-acetilcisteină. La acest lot s-a administrat, per os, clorură de mercur, în doză de 42 mg/kg. Imediat după intoxicare, s-a administrat N-acetilcisteină i.v., în doze de 114 mg /kg (corespunzătoare unei fracțiuni de 1/10 din 1 DL₅₀ pe cale i.v.).

Evaluarea stressului de injectare și a toxicității erdoesteinei

S-au introdus în studiu, în paralel cu cele 5 loturi, două loturi, de câte 10 animale fiecare (5 masculi și 5 femele), unul pentru a verifica condițiile de stres la amestecul de solvenți, și unul pentru a obține o verificare preliminară asupra toxicității intrinseci a erdoesteinei. S-a urmărit mortalitatea pe tot parcursul intervalului studiat (7 zile).

Lotul nr. 6 (10 animale) la care s-a administrat i.v. lent amestec de solvenți (apă și bicarbonat 118 mg/kg echimolar cu ERDO1).

Lotul nr. 11 (10 animale) la care s-a administrat i.v o doză de erdoesteină de 3500 mg/kg (corespunzătoare aproximativ DL₅₀).

Pentru aceste loturi, a fost evaluată doar mortalitatea.

Metoda de analiză statistică și instrumente analitice

Aceleași descrise în exemplul 1.

REZULTATE

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele următoare.

Mortalitate

Tabelul 6

Evaluarea protecției realizate prin administrarea erdoesteinei i.v. în intoxicația acută cu plumb și mercur față de netratat și comparativ cu cea dată de N-acetilcisteină

Nr. lot (nr. animale/lot)	Mortalitate totală	Mortalitate procentuală
Lot 1 martor	0	0
Lot 2 intoxicat cu acetat de plumb și netratat	22	62,8%
Lot 3 intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu ERDO1	5 ^{1,2}	14,3%
Lot 4 intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu ERDO2	10 ¹²	28,6%
Lot 5 intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu NAC	28 ³	80%

Tabelul 6 (continuare)

Nr. lot (nr. animale/lot)	Mortalitate totală	Mortalitate procentuală
Lot 7 intoxicat cu clorură mercurică și netratat	29	82,9%
Lot 8 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu ERDO1	8 ^{1,2}	22,6%
Lot 9 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu ERDO2	12 ^{1,2}	34,3%
Lot 10 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu NAC	30 ³	85,7%
Lot 6 stresat cu injecție de apă + bicarbonat (10 animale)	0/10	0
Lot 11 intoxicat cu erdosteină 3500 mg/kg (10 animale)	1/10	10%

¹ semnificativ diferit față de lotul intoxicat și netratat

² semnificativ diferit față de lot tratat cu NAC

³ nesemnificativ diferit față de lotul intoxicat și netratat

Tratamentul i.v. cu erdosteină a scăzut semnificativ mortalitatea în ambele tipuri de intoxicație, cu acetat de plumb și cu clorură mercurică. Mortalitatea a fost mai redusă în loturile tratate cu erdosteină, comparativ cu loturile netratate și comparativ cu loturile tratate cu NAC i.v.

Tratamentul cu NAC nu a avut niciun efect asupra mortalității.

ERDO1 a redus mortalitatea mai mult decât ERDO2, însă diferențele nu sunt semnificative.

Stresul injecției nu are niciun efect asupra mortalității, iar formularea noastră i.v. de erdosteină a demonstrat o doză DL₅₀ mai mare decât 3500 mg/kg (toxicitatea intrinsecă a erdosteinii fiind foarte mică).

Supraviețuitori - rezultate biochimice

Tabelul 7

Evidențierea efectului erdosteinii asupra toxicității renale din intoxicația cu plumb și mercur, prin evaluarea valorilor ureei sanguine, creatininei și acidului uric, față de grupurile martor normal, netratat și tratat cu NAC

Nr. lot (35 animale/lot)	Valori medii uree (mg/dl)	Valori medii creatinină (mg/dl)	Valori medii acid uric (mg/dl)
Lot 1 martor normal	49,48	0,45	1,61
Lot 2 intoxicat cu acetat de plumb și netratat	157,91 ⁴	0,81 ⁴	2,75 ⁴
Lot 3 intoxicat cu plumb și tratat cu ERDO1	48,95 ^{1,2,3}	0,49 ^{1,2}	2,28 ⁴
Lot 4 intoxicat cu plumb și tratat cu ERDO2	54,4 ^{1,2}	0,46 ^{1,2}	1,76 ^{1,2}
Lot 5 intoxicat plumb și tratat cu NAC	80,98 ⁴	0,78 ⁴	2,13 ⁴
Lot 7 intoxicat cu mercur și netratat	256,4 ⁴	5,90 ⁴	2,3 ⁴
Lot 8 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu ERDO1	50,36 ^{1,2}	0,60 ²	2,25 ⁴
Lot 9 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu ERDO2	53,15 ^{1,2}	0,51 ^{1,2}	2,23 ⁴
Lot 10 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu NAC	79,52 ⁴	1,06 ⁴	2,02 ⁴

¹ nesemnificativ diferit față de martor normal

² semnificativ diferit față de lot tratat cu NAC

³ semnificativ diferit față de ERDO2

⁴ semnificativ diferit față de martor normal

RO 125302 B1

Tratamentele cu erdosteină au determinat la supraviețuitori aceleași valori medii pentru uree și creatinină ca și la lotul 1 neintoxicat, ceea ce indică o înaltă protecție renală. Tratamentele cu erdosteină au rezultate semnificativ diferite față de tratamentele cu NAC. Tratamentele cu NAC au rezultate semnificativ diferite față de lotul neintoxicat.

Supraviețuitori - rezultate hematologice

Tabelul 8

Evidențierea efectului erdosteinei asupra tabloului hematologic din intoxicația cu plumb și mercur, față de martor și comparativ cu N-acetilcisteină

Nr. lot (35 animale/lot)	Valori nr. eritrocite (*10 ⁶ /mm ³)	Valori Hemoglobină (g/dl)	Valori medii Hematocrit	Valori nr. leucocite
Lot 1 martor normal	8,07	18,02	46	5,96
Lot 2 intoxicat cu acetat de plumb și netratat	5,43 ³	15,68 ³	39,34 ³	18,75 ³
Lot 3 intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu ERDO1	7,01 ³	15,71 ³	37,21 ³	11,36 ³
Lot 4 intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu ERDO2	7,07 ³	15,95 ³	37,7 ³	14,35 ³
Lot 5 intoxicat cu acetat de de plumb și tratat cu NAC	6,93 ³	15,86 ³	35,48 ³	16,36 ³
Lot 7 intoxicat cu clorură mercurică și netratat	7,13 ³	15,00 ³	40,78 ³	18,46 ³
Lot 8 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu ERDO1	6,98 ³	15,05 ³	38,43 ³	17,36 ³
Lot 9 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu ERDO2	6,55 ³	13,86 ³	36,83 ³	8,61 ³
Lot 10 intoxicat cu clorură mercurică și tratat cu NAC	6,76 ³	14,57 ³	38,97 ³	10,5 ³

³ semnificativ diferit față de martor normal

Administrarea atât a erdosteinei, cât și a NAC, nu a antagonizat toxicitatea hematologică și inflamația, prezente în intoxicațiile cu plumb și mercur.

Nivelul urinar de Pb și Hg

Tabelul 9

Pb în urină, măsurat cu GS MS Varian 4100

Nr. lot (30 animale/lot)	Pb valori medii
Lot 1 martor normal	225 µg/l
Lot 2 (intoxicat cu Pb, netratat)	5,2 mg/l
Lot 3 (intoxicat cu Pb, tratat cu ERDO1)	15,9 mg/l
Lot 4 (intoxicat cu Pb, tratat cu ERDO2)	13 mg/l
Lot 5 (intoxicat cu Pb, tratat cu NAC)	12,9 mg/l

Hg în urină, măsurat cu GS MS Varian 4100

Nr. lot (30 animale/lot)	Hg valori medii	
Lot 1 martor normal	0	3
Lot 7 (intoxicat cu Hg, netratat)	3,5 mg/l	5
Lot 8 (intoxicat cu Hg, tratat cu ERDO1)	18,7 mg/l	
Lot 9 (intoxicat cu Hg, tratat cu ERDO2)	14,4 mg/l	7
Lot 10 (intoxicat cu Hg, tratat cu NAC)	13,9 mg/l	

9

Rezultatele arată că tratamentul cu erdosteină crește nivelul toxicului eliminat. Din cauza dificultății de a colecta urina eliminată spontan, s-au utilizat pentru comparație loturile 1 și 2 din experimentul anterior.

11

Rezultate anatomopatologice

13

În intoxicațiile cu Pb s-au găsit leziuni tipice. Tratamentele cu NAC și ERDO2 nu au ameliorat leziunile, în timp ce tratamentul cu ERDO1 a determinat leziuni mai puțin importante.

15

În intoxicația cu Hg, afectările creierului, cele gastrice și cele renale sunt severe. Animalele tratate cu ERDO2 prezintă leziuni mai puțin importante, în timp ce tratamentele cu ERDO1 și NAC par a prezenta leziunile cel mai puțin severe.

17

19

DISCUȚII EXEMPLUL 2

Tratamentele cu erdosteină i.v. au scăzut mortalitatea în mod impresionant atât în intoxicația cu Pb, cât și în cea cu Hg.

21

Tratamentele cu NAC nu au arătat o diferență semnificativă față de lotul netratat, neînregistrând niciun beneficiu. În lotul intoxicat cu acetat de plumb, mortalitatea a scăzut de la 62,8%, în grupul netratat, și 80% în grupul tratat cu NAC, la 14,3% în grupul tratat cu ERDO1. În lotul intoxicat cu clorură mercurică, mortalitatea a scăzut de la 82,9%, în grupul netratat, și 85,7% în grupul tratat cu NAC, la 22,6% la grupul tratat cu ERDO1.

23

25

27

Tratamentele cu ERDO1 și ERDO2 nu au înregistrat diferențe semnificative între ele, deși există o tendință pozitivă în favoarea ERDO1, care a înjumătățit mortalitatea în comparație cu ERDO2 în intoxicația cu Pb.

29

Probabil din cauza numărului relativ mic de animale, rezultatele nu sunt semnificative statistic.

31

La supraviețuitori, toxicitatea plumbului și mercurului este severă, dovedită din punct de vedere biochimic și anatomopatologic, prin alterarea funcției renale (uree, creatinină, acid uric), a funcției digestive și prin alterarea parametrilor hematologici (eritrocite, leucocite, hematocrit, hemoglobină).

33

35

Administrarea de erdosteină a oferit o protecție superioară comparativ cu loturile intoxicate cu Pb și Hg, și netratate, reducând efectele toxice și crescând rata de eliminare urinară a acestor substanțe toxice.

37

39

Administrarea de erdosteină a conferit o protecție superioară asupra toxicității renale în comparație cu lotul tratat cu NAC și lotul netratat, valorile de uree și creatinină fiind aceleași cu cele normale (lotul martor neintoxicat). Diferențele sunt semnificative. Valorile ureei au fost mai bune la lotul tratat cu ERDO1 în comparație cu lotul tratat cu ERDO2.

41

43

Toxicitatea asupra parametrilor hematologici nu a fost influențată nici de erdosteină, nici de NAC.

45

Examenenele anatomopatologice confirmă că tratamentele cu erdosteina, în comparație cu absența tratamentului și tratamentul cu NAC, oferă o protecție mai bună, determinând leziuni mai puțin importante la nivel hepatic, renal și digestiv. ERDO1 a conferit o protecție mai bună în comparație cu ERDO2.

În concluzie, tratamentul cu erdosteina i.v. a scăzut mortalitatea și a antagonizat efectele toxice la supraviețuitori, în intoxicațiile cu Pb și Hg.

Exemplul 3. Al treilea exemplu este reprezentat de evaluarea efectului erdosteinei administrate i.v. la șobolani intoxicați cu plumb, în comparație cu loturi netratate și cu loturi tratate cu EDTA+BAL.

MATERIALE și METODE

Substanțe și soluții utilizate

- Acetat de plumb trihidrat ca în exemplele de înainte.
- Erdosteina (formula moleculară $C_8H_{11}NO_4S_2$, greutatea moleculară 249,31, moderat solubilă în apă, DL_{50} la șobolan i.v. >3500 mg/kg, șoarece i.v. >3500 mg/kg (*European Patent Application*, vol. 00611386).

- Dimercaprol (2,3-Dimercaptol-propanol BAL) chelează metalele grele, prevenind interacțiunea acestora cu grupările sulfhidril endogene. Formula chimică $C_3H_8OS_2$, greutate moleculară 124,22, greu solubil în apă, aspect uleios, miros dezagreabil de mercaptan, DL_{50} i.v. în șobolan.

- EDTA $CaNa_2$, substanță cu proprietăți chelatoare, la care plumbul extracelular substituie calciul, formând un compus stabil, care se elimină prin urină. Formula chimică $C_{10}H_{14}O_8CaNa_2H_2O$, solubilitate în apă 100 g/l, DL_{50} i.p.r. la șobolan 397 mg/kg (*Material Safety Data Sheets* <http://msds.chem.ox.ac.uk/ED/EDTA.html>).

Material biologic

Au fost introduse în experiment 140 animale de laborator, șobolani rasa Wistar, masculi și femele. Animalele au fost repartizate în 4 loturi omogene de câte 30 animale (15 femele, 15 masculi) și 2 loturi de 10 animale (5 femele și 5 masculi), ținute în microclimat adecvat (vivariu), cu acces liber la hrană și apă, în afara contactului cu insecticide.

Metode de administrare a soluțiilor de lucru

- acetatul de plumb s-a administrat per os la șobolanii din trei loturi, în doză de 4665 mg/kg corp (1 DL_{50}), într-un volum de 20 ml/kg corp;

- Dimercaprolul (BAL) s-a administrat i.m. în doză de 25,2 mg/kg, într-un volum de 2 ml/kg corp, imediat după administrarea a plumbului; EDTA s-a administrat i.m. în doză de 30 mg/kg corp, într-un volum de 2 ml/kg corp, după administrarea BAL. Administrarea s-a repetat zilnic, timp de 7 zile. DL_{50} i.m. la șobolan nu este clară în literatură. Cea mai mare doză posibilă, administrată în encefalopatia din intoxicația cu Pb la om, este de BAL 3...5 mg/kg corp, la fiecare 4 h, EDTA 30 mg/kg corp/zi, împărțite în 2...3 doze (*Medical Toxicology*, Richard Dart ed.m). Noi am administrat la șobolan dozajul proporțional, similar cu dozajul maxim la om.

- Erdosteina s-a administrat i.v. în doză de 350 mg/kg corp, imediat după administrarea per os de acetat de plumb. Administrarea de erdosteina s-a repetat zilnic, timp de 7 zile. Erdosteina 350 mg a fost dizolvată cu 118 mg bicarbonat de sodiu în 2 ml apă bidistilată (în loc de 10 ml ca în exemplul 2).

Imediat după intoxicație, Erdosteina a fost administrată prima, urmată rapid de BAL, apoi de EDTA, de către mai mulți operatori în paralel, cu scopul de a simula situația de la om, când este posibil să se facă simultan administrări i.m. și i.v. în perfuzie.

<i>Monitorizarea animalelor</i>	1
Monitorizarea animalelor înainte experimentului a constat în urmărirea curbei ponderale și a stării de sănătate, pe o perioadă de 7 zile, înainte începerii experimentului. Cu 24 h înainte de începerea experimentului, animalelor li s-a restricționat accesul la hrană, având acces liber la apă.	3
Monitorizarea animalelor în timpul experimentului a constat în urmărirea stării de sănătate, înregistrarea semnelor de intoxicație și a mortalității, pe toată perioada experimentului.	5
Monitorizarea biologică a constat în determinări cantitative, efectuate la supraviețuitori, la 72 h și 7 zile după intoxicație și tratament, ale valorilor hemoglobinei, hematocritului, a concentrației medii de hemoglobină, a numărului de eritrocite, leucocite, și trombocite a ureei, acidului uric AST, ALT (specimen: 1 ml), examen sumar de urină, precum și determinarea cantitativă a plumbului în urină.	7
<i>Etapele experimentului</i>	9
Au fost comparate următoarele loturi intoxicate cu Pb: netratate, tratate cu terapie tradițională (TT) BAL+EDTA i.m., tratate cu erdosteină i.v., tratate cu asocierea BAL+EDTA+erdosteină i.v.	11
Formularea soluției de administrare i.v. a fost obținută prin testarea dizolvării pentru un raport molar erdosteină:bicarbonat de sodiu cuprins în intervalul 2:1, 1.5:1, 1:1, 1:1.5, 1:2. Stabilitatea formulelor deja dizolvate a fost testată imediat (ziua 0) apoi în ziua 1, ziua 3, ziua 7, ziua 12, ziua 30, folosind spectrometrul RMN Varian.	13
Mortalitatea a fost înregistrată la 72 h și la 7 zile după intoxicare și începerea tratamentului, la supraviețuitori s-au măsurat parametrii enumerați mai sus, cu scopul de a evalua efectele tratamentului. După 7 zile, urina a fost recoltată prin puncție transvezicală.	15
<i>Evaluarea efectului erdosteinei la animalele intoxicate cu Pb</i>	17
S-au luat în studiu 4 loturi de câte 30 animale fiecare (10 masculi și 10 femele) și un lot de 10 animale, după cum urmează:	19
Lotul 1 - martor normal neintoxicat și netratat (10 animale),	21
Lotul 2 - intoxicat cu acetat de plumb și netratat, s-a administrat acetat de plumb în doză de 4655 mg/kg (1 DL ₅₀) per os.	23
Lotul 3 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu Dimercaprol (BAL)și EDTA. La acest lot s-a administrat acetat de plumb, în doză de 4655 mg/kg, per os. Imediat după intoxicație și zilnic timp de 7 zile, s-au administrat i.m.dimercaprol, în doză de 25,2 mg/kg și EDTA în doză de 30 mg/kg.	25
Lotul 4 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat erdosteină și BAL+ EDTA (TT). La acest lot s-a administrat acetat de plumb în doză de 4655 mg/kg p.o. Imediat după intoxicație și zilnic timp de 7 zile, s-a administrat i.m.dimercaprol în doză de 25,2 mg/kg, EDTA în doză de 30 mg/kg și simultan, cu acestea, erdosteină i.v. în doză de 350 mg/kg.	27
Lotul 5 - intoxicat cu acetat de plumb și tratat cu erdosteină, 30 animale. La acest lot s-a administrat acetat de plumb în doză de 4655 mg/kg p.o. Imediat după intoxicație și zilnic timp de 7 zile. s-au administrat i.v. erdosteină în doză de 350 mg/kg.	29
<i>Evaluarea stresului de injecție</i>	31
S-a introdus, în paralel cu celelalte 5 loturi, un lot de 10 animale (5 masculi și 5 femele) astfel: Lotul 6 - martor solvent, la care s-a administrat i.v lent o soluție de apă bidistilată + bicarbonat de sodiu 118 mg într-un volum total de 2 ml/kg (solventul utilizat la prepararea soluției de erdosteină), cu scopul de a determina stresul datorat solventului injectat.	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

Evaluarea experimentală a toxicității intrinseci a erdosteinei pe cale i.v.

Au fost introduse în experiment 4 loturi de câte 10 animale, după cum urmează:

Lotul 10 la care s-a administrat i.v. erdosteina în doză de 3500 mg/kg, 4,37 g erdosteina + 1,48 g bicarbonat de sodiu, dizolvate în 25 ml, administrată în volum de 2 ml/100 g greutate corporală.

Lotul 11 la care s-a administrat i.v. erdosteina în doză de 4000 mg/kg ca și la lotul 10, administrată în volum de 2,28 ml/100 g greutate corporală.

Lotul 12 la care s-a administrat i.v. erdosteina în doză de 4500 mg/kg 4,5 g dizolvate în 20 ml, administrată în volum de 2 ml/100 g greutate corporală. Concentrația soluției a fost aleasă în scopul de a păstra nemodificat volumul de injectat.

Lotul 13 la care s-a administrat i.v. erdosteina în doză de 5500 mg/kg ca și în lotul 12, administrată în volum de 2,44 ml/100 g greutate corporală.

Analiza statistică

Analiza statistică a rezultatelor experimentale s-a efectuat prin testarea semnificației diferenței mediilor valorilor rezultate experimental prin utilizarea testului t Student, varianta impară, din cadrul programului de calcul statistic Origin 5.0. Analiza mortalității a fost efectuată prin testul Chi pătrat.

Instrumentele analitice

Determinările biochimice au fost executate pe un analizor de chimie uscată, Refloton 2000, cele hematologice s-au realizat cu ajutorul unui analizor hematologic Hemastar 4, iar cele urinare cu ajutorul analizorului urinar Urilux. Analiza valorilor Pb în urină s-a realizat cu ajutorul GC-MS Varian.

REZULTATE EXEMPLUL 3

Date de stabilitate

S-au evaluat formulări ale soluției cu un raport molar erdosteina:bicarbonat cuprins între 2:1 și 1:2.

Formularea cu raportul molar 2:1 și 1,5:1 nu s-a dizolvat bine.

Formularea cu raportul molar 1:1 s-a dizolvat bine, iar produșii de degradare nu sunt detectabili în ziua 7, începând a fi detectabili în ziua 12.

Formularea cu raportul molar 1:1,5 s-a dizolvat bine și produșii de degradare încep să fie detectați în ziua 7.

Datele de stabilitate ne-au determinat să utilizăm formula 3,5 g erdosteina + 1,18 g bicarbonat, dizolvate în 20 ml de apă bidistilată, amestecate timp de 5 min, cu un agitator magnetic și încălzite ușor, timp de 2 min. Soluția a fost administrată la șobolani, în volum de 2 ml/100 g greutate corporală.

Mortalitate

Tabelul 11

Evaluarea la 7 zile a protecției realizate prin administrarea erdosteinei în intoxicația acută cu plumb. Comparație între loturi cu: absența tratamentului, tratament cu TT, asocierea erdosteina + TT și monoterapie cu erdosteina

Nr. lot	Total mortalitate	Mortalitate %
Lot 1 martor neintoxicat	0/10	0%
Lot 2 intoxicat cu Pb, netratat	26/30	87%
Lot 3 intoxicat cu Pb, tratat cu TT	19/30	63%

Tabelul 11 (continuare)

Nr. lot	Total mortalitate	Mortalitate %
Lot 4 intoxicat cu Pb, tratat cu TT asociat cu erdosteină	7/30	23%
Lot 5 intoxicat cu Pb, tratat cu erdosteină	11/30	37%
Lot 6 martor solvent	0/10	0%

- 2 vs. 3 nesemnificativ statistic;

- 2 vs. 4 semnificativ statistic $p < 0,001$;

- vs. 5 semnificativ statistic $p < 0,001$;

- vs. 4 semnificativ $p < 0,05$;

- vs. 5 semnificativ $p < 0,05$;

- vs. 5 nesemnificativ statistic.

Tratamentele cu erdosteină, în monoterapie sau asociată cu TT, au determinat reducerea mortalității.

Tratamentul cu TT nu are o diferență semnificativă statistic față de absența terapiei.

Tratamentul cu erdosteină reduce mortalitatea în comparație cu tratamentul cu TT.

Diferența dintre administrarea erdosteină în monoterapie sau în asociație cu TT nu este semnificativă.

Supraviețuitori - rezultate la 7 zile

Tabelul 12

Nr. lot	RBC	Hct	MCH	Hb	WBC	PLT	Uree	Uric acid	ASA T	ALA T
Lot 1 martor neintoxicat	8,232	48,98	25,62	21,06	4,56	828,8	53,62	1,87	35,8	163,6
Lot 2 intoxicat, netratat	6,254	34,8	20,08	13,66	11,62	431,4	148,9 333	3,18	158	419,66
Lot 3 intoxicat, tratat cu TT	6,546	39,22	23,4	14,82	10,88	471,6	79,88	2,784	79	202,6
Lot 4 intoxicat cu Pb, tratat cu TT + erdosteină	7,726 ^{1,3}	44,52 ³	23	17,48 ³	6,96 ³	612 ³	58,28 ^{2,3}	2,904	44,4 ^{2,3}	170,6 ^{2,3}
Lot 5 intoxicat, tratat cu erdosteină	7,156 ^{1,3}	42,9	23,46	16,98 ³	6,16 ³	574 ³	68,4 ³	2,632	57,2	159 ^{2,3}
Lot 6 martor solvent	8,23	51,04	25,4	20,76	4,52	804	55	1,69	35,6	172,6

¹ diferență semnificativă comparativ cu lotul 2;

² diferență nesemnificativă comparativ cu lotul 1;

³ diferență semnificativă comparativ cu lotul 3 tratat cu TT.

Rezultatele la 72 h arată un trend asemănător și nu sunt prezentate.

Pentru majoritatea parametrilor măsurați, tratamentul cu erdosteină în monoterapie sau asociată la TT are rezultate semnificativ mai bune în comparație cu tratamentul cu TT (BAL + EDTA).

Valorile pentru uree, ASAT și ALAT, la lotul tratat cu erdosteină+TT, nu diferă față de cele din lotul neintoxicat.

Valorile pentru ALAT din lotul tratat cu erdosteină în monoterapie nu sunt diferite de valorile ALAT din lotul neintoxicat.

Sumarul de urină la sfârșitul perioadei de tratament

Nr. lot	Densitate	pH	Leuc/ μl	Prot. mg/dl	Glucoza mg/dl	Chet mg/dl	UBG mg/dl	Bil. mg/dl	Eritrocite/ μl	Sediment urinar
Lot 1 martor neintoxicat	1020	7	neg	neg	norm	neg	norm	neg	10	Rare epitelii, cilindri absenți
Lot 2 intoxicat cu Pb, netratat	1010	8	35	150	100	15	2	4	250	Frecvente epiteliale, cilindri hialini, acid uric
Lot 3 intoxicat cu Pb, tratat cu TT	1025	7	30	150	50	15	1	3	250	Frecvente epitelii cilindri hialini și cristale acid uric Frecvente eritrocite
Lot 4 intoxicat cu Pb, tratat cu TT+erdosteină	1030	6,5	25	75	50	15	1	1	50	Relativ frecvente cristale de acid uric, rare epitelii, cilindri absenți, rare eritrocite
Lot 5 intoxicat cu Pb, tratat cu erdosteină	1020	6,5	28	90	50	10	1	3	100	Relativ frecvente epitelii, cilindri hialini și cristale acid uric
Lot 6 martor solvent	1020	8	neg	neg	norm	neg	norm	neg	25	Relativ frecvente cristale, cilindri absenți, epitelii absente

Tratamentul cu dimercaprol + EDTA (TT) nu a conferit protecție față de agresiunea renală.

Tratamentul cu erdosteină a arătat o ameliorare comparativ cu TT.

Asocierea erdosteină + TT pare a diminua cel mai mult afectarea atât la nivel tubular, cât și la nivelul funcției glomerulare.

Tabelul 14

Supraviețuitori: plumbul urinar la sfârșitul perioadei de tratament

Nr.lot	Media valorilor
Lot 1 martor neintoxicat	0,774 mg/l
Lot 2 intoxicat cu Pb, netratat	16,3 mg/l
Lot 3 intoxicat cu Pb, tratat cu TT	104,3 mg/l
Lot 4 intoxicat cu Pb, tratat cu TT + erdosteină	181,7 mg/l
Lot 5 intoxicat cu Pb, tratat cu erdosteină	164,6 mg/l
Lot 6 martor solvent	1,4 mg/l

Loturile 4 și 5 vs. lot 3: diferențe semnificative.

Lotul 4 vs. lot 5: diferențe semnificative.

RO 125302 B1

Creșterea eliminărilor de toxic este o dovadă indirectă a eficienței tratamentului. Nivelurile crescute de plumb în urină la lotul tratat cu erdosteină arată o mai mare eficiență a activității de chelator. Niveluri și mai mari de plumb eliminat în urină s-au obținut prin asocierea erdosteină+TT.

Tabelul 15

Evaluarea toxicității erdosteinei

Nr. lot	Mortalitate totală	Mortalitate procentuală
Lot 10 3500 mg/kg	1/10	10%
Lot 11 4000 mg/kg	4/10	40%
Lot 12 4500 mg/kg	7/10	70%
Lot 13 5500 mg/kg	10/10	100%

A fost evaluată toxicitatea formulării 350 mg erdosteină + 118 mg bicarbonat de sodiu (formula cu cea mai bună stabilitate).

Soluția utilizată la loturile 12 și 13 nu a fost perfect clară, ceea ce indică depășirea limitelor de solubilitate.

Este posibil ca mortalitatea înregistrată la loturile 12 și 13 să fie datorată și acestui fapt în plus față de toxicitatea erdosteinei.

Aceste rezultate demonstrează că dozajul utilizat în experiment este mai mic decât 1/10 din D1 ceea ce oferă posibilitatea teoretică de a crește dozele în caz de necesitate.

DISCUȚII EXEMPLUL 3

Tratamentul cu erdosteină a determinat o scădere impresionantă a mortalității în comparație cu terapia comună, recomandată de toate manualele, BAL+EDTA (TT).

Mortalitatea nu diferă între loturile tratate cu erdosteină în monoterapie și erdosteina asociată cu TT. Cele mai bune rezultate la supraviețuitori se găsesc atunci când erdosteina se asociază la TT. Eliminarea urinară a metalelor grele, confirmată și de celelalte experimente, susține ipoteza că mecanismul de acțiune ar putea fi crearea unei legături stabile cu toxicul, dând naștere unui compus netoxic sau mai puțin toxic. Acest ultim compus poate fi ușor eliminat prin urină. Chelatorii tradiționali nu elimină în mod specific ionii metalelor toxice, dar acționează și asupra elementelor chimice cu rol esențial în fiziologia normală a organismului, cum sunt calciul și zincul. Toxicitatea intrinsecă scăzută ar putea fi explicată printr-o mai mare selectivitate a erdosteinei, ceea ce explică și rezultatele obținute, care sunt mult mai bune.

1

Revendicări

3

1. Erdosteină pentru utilizare în tratamentul intoxicațiilor cu metale grele.

2. Erdosteină conform revendicării 1, în care metalele grele sunt plumb sau mercur.

5

3. Erdosteină conform revendicării 1, în care erdosteina este sub formă injectabilă.

7

4. Erdosteină conform revendicării 3, în care forma injectabilă conține erdosteină și bicarbonat de sodiu în raport molar de 1:1.

9

5. Erdosteină conform revendicării 3, în care forma injectabilă conține 175 mg de erdosteină și 59 mg de bicarbonat de sodiu, sau 350 mg de erdosteină și 118 mg de bicarbonat de sodiu, în 10 ml de apă dublu-distilată.

11

6. Formulare farmaceutică injectabilă care conține erdosteină și bicarbonat de sodiu în raport molar de 1:1 pentru utilizare în tratamentul intoxicațiilor cu metale grele.

13

7. Formulare farmaceutică, injectabilă, conform revendicării 6, care conține 350 mg de erdosteină și 118 mg de bicarbonat de sodiu, sau 175 mg de erdosteină și 59 mg de bicarbonat de sodiu, în 10 ml de apă dublu-distilată.

15



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 214/2013