

(19)



(10)

LT 4661 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

-
- (11) Patento numeris: **4661** (51) Int. Cl.⁷ **A61K 31/445**
A61K 31/16
- (21) Paraiškos numeris: **99-101**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1999 08 12**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 03 27**
- (45) Patento paskelbimo data: **2000 05 25**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US98/02267**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 02 09**
- (85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 08 12**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **8000737, 1997 02 15, US**
- (72) Išradėjas:
Greta Edelstam, SE
- (73) Patento savininkas:
EDELSTAM INC, 15537 Village Park Court, Lake Oswego, OR 97034, US
GRETA EDELSTAM, Saltangsvagen 2, S-131 50 Saltsjö-Duvnas, SE
- (74) Patentinis patikėtinis:
Tania Sterlina, 37, Naugarduko g. 34-10, 2600 Vilnius, LT
-

- (54) Pavadinimas:
Medikamentai prieš nevaisingumą ir vaisingumo skatinimui
- (57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su vietinio anestetiko panaudojimu gamyboje vaistų, kurie skirti gydyti nevaisingumą arba skatinti vaisingumą. Jis taip pat susijęs su farmacine kompozicija, susidedančia iš farmaciškai efektyvios dozės vietinio anestetiko drauge su farmaciškai priimtiniu užpildu. Pageidautina, kad farmacinė kompozicija būtų įterpiama į peritoninę sritį pertubavimo būdu.

5

Išradimo sritis

Šis išradimas susijęs su vietinio anestetiko panaudojimu gamyboje vaisto, skirto nevaisingumo gydymui arba vaisingumo skatinimui. Jis taip pat susijęs su farmacine kompozicija, sudaryta iš efektyvios dozės vietinio anestetiko drauge su farmaciškai priimtinu užpildu. Jis taip pat susijęs su moterų vaisingumo skatinimu, naudojant minėtą kompoziciją.

Išradimo prielaidos

15 Nevaisingumas arba jo stoka gali tapti problema žmonėms, kenčiantiems nuo jų. Nevaisingų moterų paplitęs gydymo būdas yra *in vitro* apvaisinimas (IVF). IVF gydymo pagrindą sudaro:

Ovuliacijos stimuliavimas: kasdieninės hormonų injekcijos, tyrimai ultragarsu ir kraujo analizės.

20 Ovocitų (nesubrendusių kiaušinėlių) pašalinimas: ultragarsu valdomos ovarinės punkcijos, atliekamos vaginaliai naudojant vietinę anesteziją.

Spermijų paruošimas: plukdymas aukštyje, plukdymas žemyn, spermos atrinkimas ir kiti būdai atrinkti optimalią populiaciją su geriausiu progresyviu judrumu.

25 *In vitro* apvaisinimas: ovocitų ir atrinktų populiacijos spermijų inkubacija ląstelės inkubatoriuje. Tiesioginis ląstelės atsiskyrimo stebėjimas mikroskopu ir labiausiai gyvybingo blastocito atrinkimas.

Embriono pernešimas: 2-3 gyvybingiausi blastocitai patalpinami į gimdos ertmę su viltimi, kad imlantuosis į gimdos gleivinę.

30 IVF gydymas yra brangus būdas, kuris eilei porų sukelia komplikuotus pašalinius fiziologinius efektus. Bandymai tapti nėščia techniniu ir dirbtiniu būdu besigydančiai porai neturi privalumų, kadangi gali žalingai paveikti jų savitarpio santykius. Po viso varginančio gydymo nėštumo lygis sudaro tik 25-30 %, neįskaitant

ty, kurioms nepasisekė su tarpusvio santykiais ir kurios vis dar neturi vaikų. IVF gydymo kaina per menstruacinį ciklą sudaro apie 20000-25000 Švedijos kronų (SEK).

Nežiūrint į eilę ankstesnių tyrimų, nevaisingumo priežastys esant endometriozei nėra aiškios, ir po gydymo net nepastebėta, kad būtų padidėjęs vaisingumas. Iš tikrųjų, kai nėra dubens sąaugų, santykis tarp švelnios endometriozeės ir nevaisingumo stokos yra neaiškus (Mahmood T.A., Templeton A., Patophysiology of mild endometriosis: review of literature. Human Reproduction, 1990; 5:765-784).

Pas pacientės su endometrialiniais peritoniniais implantais peritoniniame skystyje (PF) buvo rastas padidintas leukocitų kiekis ir tai traktuota kaip pastovus nevaisingumo uždegimas (Haney A. F., Muscato J.J., Weinberg J.B., Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. Fertil Steril, 1981; 35:696-698; Edelstam G. A. B., Lundkvist O. E., Venge P., Laurent T. C., Hyaluronan and myeloperoxidase in the peritoneal fluid during genital inflammation. Inflammation, 1994; 18:13-21). Padidėjęs leukocitų kiekis turi *in vivo* pagamintų makrofagų, išskiriančių makrofagą, gaminantį augimo faktorių (MDGF), kuris gali paaikškinti endometrialinio audinio proliferaciją (Halme J., White C., Kauma S., Estes J., Haskill S., Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity *in vitro*, J. Clin. Endocrin. and Metabolism., 1988; 66:1044-49). Kiti išskiriami iš makrofagų ir augimo faktorių produktai, tokie kaip TNF ir interferonas, rodo subrendusios lytinės ląstelės toksiškumą ir taip pat gali turėti žalingą poveikį vaisingumo procesui (Halme J., Role of peritoneal inflammation in endometriosis - associated infertility, Ann. NY Acad. Sci., 1991; 622:266-74).

Taip pat yra svarbus beląstelinis peritoninis skystis esant sumažintam vaisingumui, nes parodyta, kad jis žymiai sumažina kiaušintakių fimbrijų kiaušinėlio pasirinkimo galimybes (Suginami H.,Yano K., Watanbe K., Matsnura S., A factor inhibiting ovum capture by the oviductal fimbriae present in endometriosis peritoneal fluid. Fertil Steril, 1986; 46: 1140-1146). Pacienčių su endometrioze ir nepaaikškinamu nevaisingumu, atitinkamai, peritoniniame skystyje surastas sumažintas spermijų progresyvus greitis (Makarand K., Oak M., Chantler E. N., Vaughan Williams C. A., Elstein M., Sperm survival studies in peritoneal fluid from infertile women with endometriosis and unexplained infertility. Clinical reproduction and fertility, 1985; 3:

- 297-303). Net labiau įdomu tai, kad yra padidėjusi spermijų fagocitozė, kuri aptikta po 24 valandų inkubacijos *in vitro* su peritoniniu skysčiu iš pacienčių su endometrioze (Muscatto J. J., Haney A. F., Weinberg J. B., Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: a possible cause of infertility in endometriosis. Am. J. Obstet. Gynecol., 1982, 144:503-510). Tačiau šiame darbe buvo keletas skirtingų spermos donorų ir todėl negali būti atmesti iškilę imunologiniai faktoriai.

Išradimo esmė

Šis išradimas yra alternatyvus būdas gydyti nevaisingas moteris IVF būdu. *In vitro* tyrimais surasta, kad spermijų fagocitozė gali būti sumažinta lidokainu. Manoma, kad šis lidokaino efektas yra surištas su ląstelės membranos stabilizacija, trukdant Na^+ jonų prasiskverbimą ir tikriausiai ląstelės membranoje susikertant su ATP. Šio gydymo kaina sudarys apie 10 % nuo IVF gydymo, t. y. per menstruacinį ciklą sudarys 2500 SEK. Tai nėra techninis apvaisinimo būdas, kuris iššauktų pašalinius fiziologinius efektus. Šis gydymas gali būti taikomas pacientėms su endometrioze ir/arba su nežymiomis mechaninėmis nevaisingumo priežastimis. Jis gali būti atliekamas, kol laukiama IVF gydymo ir jis neatsiliepia į galimybę, kad vėlesnis IVF gydymas būtų sėkmingas.

Literatūroje nerasta duomenų apie nevaisingumo gydymą lidokainu. Tačiau, yra žinomi kiti lidokaino farmaciniai efektai. Pvz., EP 0507160 aprašo išorinės aplikacijos odai paruošimą su lidokainu; lidokainas, kuris įeina į vaisto atpalaidavimo sluoksnį, uždedamas ant pagrindo. Preparatas gali būti naudojamas gydyti juostinę pūslelinę neuralgiją ir popūslelinę neuralgiją.

Trumpas figūrų aprašymas

Kaip naudojama grafikuose, "endometr" reiškia endometriozę ir "end-galima" reiškia galimą endometriozę; d- reiškia dieną.

Fig. 1 yra schematinė iliustracija, rodanti laisvų spermijų skaičių, parodant kiekvieną inkubacijos dieną: su ląstelės terpe (A, kontrolė), su ląstelės terpe ir lidokainu (B), su peritoniniu skysčiu (C, kontrolė) ir su peritoniniu skysčiu ir lidokainu (D).

Fig. 2 yra schematinė iliustracija, rodanti progresyviai judančių spermijų skaičių, parodant kiekvieną inkubacijos dieną: su ląstelės terpe (A, kontrolė), su

ląstelės terpe ir lidokainu (B), su peritoniniu skysčiu (C, kontrolė) ir su peritoniniu skysčiu ir lidokainu (D).

Fig. 3 yra schematinė iliustracija, rodanti neprogesyvius, bet judančius spermijų skaičius, parodant kiekvieną inkubacijos dieną: su ląstelės terpe (A, kontrolė), su
5 ląstelės terpe ir lidokainu (B), su peritoniniu skysčiu (C, kontrolė) ir su peritoniniu skysčiu ir lidokainu (D).

Fig. 4 yra schematinė iliustracija, rodanti gyvų, bet stacionarių spermijų skaičius, parodant kiekvieną inkubacijos dieną: su ląstelės terpe (A, kontrolė), su
10 ląstelės terpe ir lidokainu (B), su peritoniniu skysčiu (C, kontrolė) ir su peritoniniu skysčiu ir lidokainu (D).

Fig. 5 yra schematinė iliustracija, rodanti negyvų spermijų skaičius, parodant kiekvieną inkubacijos dieną: su ląstelės terpe (A, kontrolė), su ląstelės terpe ir lidokainu (B), su peritoniniu skysčiu (C, kontrolė) ir su peritoniniu skysčiu ir lidokainu (D).

15

Detalus išradimo aprašymas

Su nuorodomis į fig. 1-6, išradime aprašomas vietinio anestetiko panaudojimas gamyboje vaistų, skirtų gydyti nevaisingumą arba skatinti vaisingumą. Vietinis anestetikas gali būti parenkamas iš bet kurios medžiagos, kuri pasižymi
20 vietinio anestetiko savybėmis. Tokių medžiagų pavyzdžiais gali būti bupivakainas (1-butyl-N-(2,6-dimetilfenil)-2-piperidinkarboksamidas), lidokainas (2-(diethylamino)-N-(2,6-dimetilfenil)acetamidas), mepivakainas (N-(2,6-dimetilfenil)-1-metil-2-piperidinkarboksamidas), prilokainas (N-(2-metilfenil)-2-(propilamino)propanamidas) ir ropivakainas ((S)-N-(2,6-dimetilfenil)-1-propil-2-piperidinkarboksamidas). Kiti
25 vietiniai anestetikai taip pat gali būti naudojami. Pirmenybė teikiama lidokainui.

Kitu šio išradimo objektu yra farmacinė kompozicija, susidedanti iš efektyvios koncentracijos vietinio anestetiko kartu su farmaciškai priimtiniu užpildu. Viena koncentracija paveikiama į moters nevaisingumą, o kita paveikiama į moters vaisingumo skatinimą. Dozę ir koncentraciją apsprendžia gydantis gydytojas.
30 Aktyviosios medžiagos koncentracija yra mažiausiai 5 µg/ml. Ji gali būti vartojama 100-2000 µg 1-20-tyje ml, pageidautina apie 118 µg. Skiriama dozė yra bent jau 100 µg, specialiais atvejais - iki 1000 µg. Kompozicija yra dažniausiai įvedama į pilvo ertmę, dažniausiai pertubavimo būdu. Vietinis anestetikas yra nurodytas aukščiau.

Aktyvusis ingredientas gali būti maišomas su užpildu, kuris yra farmaciškai priimtinas ir suderintinas su aktyviuoju ingredientu ir tokiais kiekiais, kurie tikėtų panaudoti gydymo būdams, aprašytiems šiame aprašyme. Priedo, jeigu norima, kompozicija gali turėti nedidelius kiekius pagalbinių medžiagų, tokių kaip vilgiklių arba emulsiklių, pH buferių ir kitų medžiagų, kurios pagerina aktyviojo ingrediento efektyvumą.

Šio išradimo farmacinė kompozicija gali turėti komponentų farmaciškai priimtinas druskas. Farmaciškai priimtinos druskos yra rūgščių prijungimo druskos, kurios susidaro su neorganinėmis rūgštimis, tokiomis kaip, pavyzdžiui, druskos arba fosforo rūgštis, arba su tokiomis organinėmis rūgštimis, kaip acto, vyno arba migdolų rūgštis.

Fiziologiškai toleruojami nešikliai yra gerai žinomi iš technikos lygio. Pavyzdiniu skystų nešiklių pavyzdžiu gali būti sterilaus vandens tirpalai, kurie neturi kitų pagalbinių medžiagų be aktyviojo ingrediento ir vandens, arba turi buferį, tokį kaip natrio fosfatą, fiziologinį natrio chlorido tirpalą arba abu, tokį kaip fosfatų buferintą fiziologinį natrio chlorido tirpalą, prie fiziologinių pH reikšmių. Dar toliau, vandeninis nešiklis gali turėti daugiau negu vieną buferinę druską, o taip pat ir kitas druskas, tokias kaip natrio arba kalio chloridai, dekstrozę, propileno glikolis, polietileno glikolis ir kitas ištirpintas medžiagas.

Kompozicija taip pat gali turėti hialuronano, kuris yra klampi medžiaga, t. y. gelio formoje. Hialuronanas užtikrina aktyviosios medžiagos lėtą išsiskyrimą, kas yra pageidautina, nes kiaušinėlio apvaisinimas įvyksta po 24 valandų po ovuliacijos ir kai gydoma pagal išradimą. Kitas pasiekimas yra tas, kad hialuronanas pasižymi stimuliuojančiu poveikiu į spermą (Zimmerman E. R., Drobnis E., Robertson K. R., Nakajima S. T., Kim H., Semen preparation with the Sperm Select system versus a washing technique. Fertil Steril, 1994; 61:269-275).

Aplamai, nevaisingumas nėra traktuojamas kaip liga. Išradimas taip pat apima moterų nevaisingumo gydymą naudojant farmacinę kompoziciją pagal išradimą, pasižymintį tuo, kad farmacinė kompozicija yra įterpiama pertubavimo būdu.

Išradimas ypatingai susietas su kosmetiniu arba neterapiniu būdu gydyti nevaisingumą arba skatinti vaisingumą, kai a) diagnozuota ovuliacija, b) gydoma vietiniu anestetiku, kai pagal a) stadiją laukiama ovuliacijos.

Pirmenybė gydymui teikiama pertubavimo būdu. Pageidautini šie veiksmai:

Savaiminė ovuliacija: pirminis gydymas normalaus menstruacinio ciklo metu.

Stimuliuojamos tik neovuliuojančios pacientės ir pirmiausia su klomifenu (tabletės), kuris yra lengvai prieinamas ir nebrangus. Reikia tik vieno kraujo tyrimo po ovuliacijos, patvirtinančio, kad ovuliacija įvyko gydymo ciklo metu.

- 5 LH (liuteinizacijos hormono) testas: 24-26 valandas prieš ovuliaciją yra diagnozuojamas LH-pakilimas, atliekamas savikontrolės testu iš šlapimo pavyzdžio.

Pertubavimas: kai LH-testas yra teigiamas, tai atliekamas pertubavimas su pvz., 10 ml 100 µg/ml dozės lidokainu fiziologiniame arba Ringerio tirpale paprasto ginekologinio apžiūrėjimo metu. Nereikalinga jokia anestezija.

- 10 Apvaisinimas: jokio dirbtino gydymo. Atlikus pertubavimą, pora bandys ir pasieks nėštumą normaliu lytiniu keliu namuose.

- Rasta, kad žalingo efekto spermos gyvybingumui nėra, tai parodo, kad spermijai yra nepaveikami lidokainu, ką parodė ir kiti tyrimai (Bennett S. J., Bolton V., Parsons J., The effects of lignocaine on human sperm motility, J. Assisted Reprod. & Genetics, 1992, 9:271-3). Atrodo, kad tas pats atvejis tinka ir ovocitams, kai buvo išmatuotas didelis lidokaino kiekis, kuris nesukėlė jokių problemų apvaisinimui arba embriono vystymuisi (Bailey-Pridham D. D., Cook C. L., Reshef E., Hurst H. E., Drury K., Yussman M. A., Follicular fluid lidocaine levels during transvaginal oocyte retrieval. Fertil Steril, 1990, 53: 171-173). Aukščiausias lygis buvo 118 µg/ml, kuris reiškia, kad
- 15 lidokaino 1000 µg dozė, naudota *in vitro* inkubacijoje turi būti naudojimui praskiesta iki, pvz., 100 µg/ml 10-tyje ml izotoninio skysčio. Ši koncentracija dabar bus naudojama nėštumo klinikiniais tyrimams, vykdomiems po pertubavimo 24 valandos prieš ovuliaciją tam, kad būtų padidintas spermos gyvybingumas.

- Lidokainas daugelį metų buvo vartojamas be jokio žalingo poveikio nėštumo
- 25 periodu, kas taip pat parodyta tyrimuose su gyvuliukais (Ramazzotto J., Curro F. A., Paterson J. A., Tanner P., Coleman M., Toxicological Assessment of Lidocaine in the Pregnant Rat, J. Dent. Res., 1985; 64: 1214-1218) ir todėl gali būti vartojamas gydyti pacienčių su endometrioze nevaisingumą.

- Išradimas iliustruojamas sekančiu pavyzdžiu. Visi techniniai ir moksliniai
- 30 terminai vartojami tokie, kad turėtų tą pačią prasmę kaip paprastai suprantami eilinių asmenų, patyrusių šioje srityje, išskyrus tuos atvejus, jeigu kitaip nenurodyti. Čia naudojamos technikos yra tokios, kurios žinomos kiekvienam, dirbančiam šioje srityje, išskyrus jeigu nurodyta kitaip. Publikacijos, minimos čia, yra įtrauktos.

1 pavyzdys. Spermijų fagocitozės sumažinimas iš moterų su endometrioze peritoninio skysčio (PF).

Šis tyrimas atliekamas tolimesnei leukocitų funkcijos analizei, kai yra sumažintas vaisingumas dėl endometriozės ir taip pat dėl tolimesnio potencialaus terapinio traktavimo. Išvengiant imunologinių įtakų, tik vienas spermos donoras dalyvavo eksperimentuose. Paruošti spermos pavyzdžiai buvo inkubuoti su necentrifuguotu peritoniniu skysčiu iš sveikos moters ir moters su endometrioze tam, kad būtų įvertintas spermijų fagocitozės svarbumas sumažintam nevaisingumui endometriozės metu. Buvo 5 dienas kasdien skaičiuojamas gyvų spermijų skaičius inkubacijoje esant ar nesant vietiniam anestetikui, kuris buvo pridedamas tyrimo metu tam, kad sumažintų peritoninių leukocitų populiacijos aktyvumą.

Medžiagos ir metodikos

15 Pacientai

Moterys. Moterys buvo padalintos į tris skirtingas grupes. Kontrolinė grupė ($n = 9$, amžiaus vidurkis = 38,5), sudaryta iš moterų, kurioms atlikta laporaskopinė sterilizacija arba iš moterų, jaučiančių neaiškų pilvo skausmą. Kontroliniai atvejai laparoskopiskai parodė, kad yra norma, su anatomiškai normalia gimda ir kiaušintakiais.

Tiriamąją grupę sudarė moterys, kurioms: laparoskopiskai nustatyta nevaisingumo arba pilvo skausmo priežastis ir kurioms konstatuota endometriozės diagnozė ($n = 11$, amžiaus vidurkis = 34,5). Šioje grupėje diagnozė laparoskopu nustatyta 8 pacientėms, ir anamnezinė galima endometrioze - 3 pacientėms, bet kuri dar nebuvo tiek išsivysčiusi, kad duotų endometrinius implantus, kurie būtų matomi laparoskopiskai.

Vyras. Spermos donoras buvo 38 metų amžiaus vyriškis su normalia vaisingumo galia ir su 2-3 dienų susilaikymo periodu prieš kiekvieną spermos išleidimą. Spermos pavyzdžiai buvo paruošti "plūduriavimo aukšyn" technika, kad būtų atrinkta optimali populiacija (Russel L. D., Rogers B. J., Improvement in the quality and fertilization potential of human sperm population using the rise technique, J. Androl., 1987; 8:25).

Peritoninio skysčio (PF) pavyzdžių surinkimas laparoskopu

Po to, kai pacientės buvo anestezuotos, buvo paimti kraujo pavyzdžiai hialuronano analizei, kuris PF-je gali būti naudojamas kaip einančio uždegimo žymeklis, kad galima būtų eliminuoti PID (dubens uždegimo liga). Laparoskopijos pradžioje su instrumentais labai atsargiai pilvo ertmėje visas esantis peritoninis skystis Douglas'o divertikulyje išsiurbiamas siurbimo prietaisu per teflono kateterį (diametras 1,7 mm, Optinova, Godby, Suomija) ir sumaišomas su 10 TV/ml heparino (Olive D. L., Weinberg J. B., Haney A. F., Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. *Fertil Steril*, 1985; 44:772-777) teflono butelyje (Nalgene, Brochester, NY, JAV) ir tuojau pat tiriamas. Peritoninio skysčio kiekis nustatomas elektrinėmis svarstyklėmis. Teflonas buvo pasirinktas kaip medžiaga surinkti PF dėl jo nedidelės adhezijos su žinduolių ląstelėmis (Grinnell F., Milam M., Srere P. A., Studies on cell adhesion, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972; 153:193-198). Heparinas buvo naudojamas kaip antikoaguliantas, kad apsaugotų leukocitus nuo agregacijos (Makarand *et al.*, 1985). Prieš tai buvo panaudotas citratas (Edelstam *et al.*, 1994), kuris spermos inkubacijoje turi žalingą poveikį į spermos gyvybingumą. Pacientėms leidus, visi pavyzdžiai ir visa pavyzdžių surinkimo procedūra buvo aprobuoti Etikos komiteto, Medicinos fakultete, Uppsalos universitete, Švedijoje.

Spermijų ir peritoninio skysčio inkubacijos

Teflono tūbos buvo naudojamos per visas inkubacijas, kurios buvo atliekamos drėgname ląstelės inkubatoriuje taip:

- a) ląstelės terpė (1 ml), spermijai (10^6 1-me ml ląstelės terpės) ir 0,1 ml NaCl.
- b) ląstelės terpė (1 ml), spermijai (10^6 1-me ml ląstelės terpės) ir 0,1 ml lidokaino 10 mg/ml (Xylocain[®], ASTRA).
- c) spermijai (10^6 1-me ml ląstelės terpės), peritoninis skystis (1 ml) ir 0,1 ml NaCl.
- d) spermijai (10^6 1-me ml ląstelės terpės), 0,1 ml lidokaino (10 mg/ml) ir peritoninis skystis (1 ml).

Iš anksto sumaišo ląstelės terpę (Sigma) su 0,35 % BSA (jaučių serumo albuminas).

Likęs kiekis peritoninio skysčio buvo nucentrifuguotas, o supernatantas atšaldytas (- 20 °C) tolimesnei hialuronano analizei (Edelstam *et al.*, 1994). Tūbos buvo kasdien analizuojamos penkių dienų laikotarpyje ir sekantys duomenys buvo suskaičiuoti visose A-D inkubacijose iki 100 spermijų:

- 5 laisvų spermijų, nesulipusių su leukocitais, skaičius;
- spermijų su progresyviu judrumu skaičius;
- spermijų su neprogresyviu judrumu skaičius;
- spermijų, kurie yra stacionarūs ir gyvi, skaičius;
- negyvų spermijų skaičius.

- 10 Taip pat kasdien buvo nustatomas gyvybingų peritoninių leukocitų procentas, naudojant tripano mėlį.

Rezultatai

- 15 Pagrindinis atradimas buvo tas, kad tūbose statistiškai patikimai ($p < 0,02$) buvo žymiai mažiau fagocituotų spermijų, kai buvo inkubuota su peritoniniu skysčiu ir lidokainu. Spermijai buvo stebėti įtraukti į didelius leukocitų agregatus ir kažkiek apimti fagocitozės, kas sumažina laisvai funkcionuojančių spermijų skaičių.

- 20 Spermijų išlikimas esant ir nesant endometriozei. Po dviejų dienų inkubacijos buvo statistiškai patikimai mažiau laisvų spermijų, kai buvo inkubuojama su peritoniniu skysčiu iš normalios grupės, palyginus su endometrioze grupė (Kruskal Wallis, $p < 0,014$). Spermijų išlikimas su ir be lidokaino. Jokių žalingų efektų į spermijų išlikimą ir statistiškai patikimai jokių žymių skirtumų tarp spermijų inkubacijų su ar be lidokaino po 24 arba 48 valandų nebuvo pastebėta. P-reikšmės, naudojant Wilcoxon'o metodiką, yra parodytos 1 ir 2 lentelėse, atitinkamai.

- 25 Spermijų išlikimas su arba be PF (peritoninio skysčio) ir lidokainu, be nerimo dėl diagnozės. Progresyvus judrumas yra sumažinamas daug greičiau be peritoninio skysčio (Fig. 2), palyginus su vienu spermijų inkubacija.

- 30 Spermijų išlikimas su ir be PF ir lidokainu, endometrioze grupėje. Esant peritoniniam skysčiui ir lidokainui, žymiai daugiau yra laisvų spermijų, ypatingai po dviejų dienų inkubacijos endometrioze grupėje (Fig. 1 ir 2 lentelė).

Čia per laiką buvo daugiau negyvų spermijų inkubacijose su lidokainu abiejose diagnozės grupėse (Fig. 5, 2 lentelė).

Hialuronano koncentracijos peritoniniame skystyje neparodė jokių besivystančio uždegiminio proceso indikacijų, t. y. patvirtino, kad visos pacientės yra sveikos.

- 5 **1 LENTELĖ:** Įvairių parametų, užregistruotų inkubacijose, P-reikšmės, kai lyginamos inkubacijos su arba be lidokaino. Duomenys - po inkubacijos 24 val. laikotarpio.

	Spermijai ± lidokainas	Spermijai+PF, normali, ± lidokainas	Spermijai+PF, endometrioze, ± lidokainas	Visos pacientės be nerimo dėl diagnozės ± lidokainas
laisvi, nesulipę su leukocitais	-----	visi laisvi, su ar be lidokaino	0,59	0,27
progresyviai judantys	0,88	0,046 (a)	0,67	0,11
neprogresyviai judantys	0,59	0,59	0,79	0,58
stacionarūs	0,76	0,40	0,31	0,18
nejudantys (negyvi)	0,28	0,14	0,09	0,024 (b)
leukocitų gyvybingumas	-----	0,26	0,29	0,92
spermijai, sulipę su leukocitais	-----	nesulipę su leukocitais bet kurioje grupėje	0,68	0,80

a) progresyviai labiau judantys spermijai inkubacijose su lidokainu

10 b) daugiau negyvų lidokaino grupėje

15

20

2 LENTELĖ: Įvairių parametų, užregistruotų inkubacijose, P-reikšmės, kai lyginamos inkubacijos su arba be lidokaino. Duomenys - po inkubacijos 48 val. laikotarpio.

	Spermijai ± lidokainas	Spermijai+PF, normali, ± lidokainas	Spermijai+PF, endometrioze, ± lidokainas	Visos pacientės be nerimo dėl diagnozės ± lidokainas
laisvi, nesulipę su leukocitais	-----	1,0	0,018 (d)	0,0021 (d)
progresyviai judantys	neprogresyviai judantys, su arba be lidokaino	1,00	0,89	0,95
neprogresyviai judantys	0,18	0,025 (c)	0,21	0,021
stacionarūs	0,78	0,26	0,58	0,22
nejudantys (negyvi)	0,50	0,038 (c)	0,003 (c)	0,00025 (c)
leukocitų gyvybingumas	-----	0,78	0,51	0,57
spermijai, sulipę su leukocitais	-----	1,00	0,53	0,63

5

c) daugiau lidokaine

b) daugiau laisvų lidokaino grupėje

10

15

Šis tyrimas įtikinamai parodo lidokaino poveikį spermos išlikimui ir efektą į spermijų peritoninių leukocitų fagocitozę *in vitro* inkubacijos metu per 5 dienų laikotarpį. Šis tyrimas apima tik vieną spermijų donorą tam, kad būtų išvengta skirtingų imunologinių derinių, kurie eksperimente gali tapti nekontroliuojamais faktoriais. Taip pat šis tyrimas laikėsi spermos išlikimo virš 5 dienų, kai ankstesni tyrimai tetrė spermos išlikimą 24 valandų periode. Toliau, buvo suskaičiuotas ne tik laisvų nepaveiktų fagocitoze spermijų skaičius, bet taip pat ir kiekis spermijų, rodančių progresyvių ar stacionarių judesius, o taip pat gyvų, negyvų arba laisvų (t. y., nesulipusių su leukocitais) spermijų skaičius.

Šiame tyrime buvo patvirtinti ankstesni atradimai ir kas buvo aprašyta Muscatto *et al.*, 1982, liečiančių sumažintą vaisingumą pas endometrioze sergančias pacientes dėl spermos fagocitozės. Padidėjusi peritoninių makrofagų fagocitozės apimtis pas pacientes su endometrioze taip pat buvo pademonstruota su fluorescuojančia granule (Samejima T., Masuzaki H., Ishimaru T., Yamabe T., Activity of peritoneal Macrophages in Endometriosis. Asia Oceania J. Obstet. Gynecol, 1989; 15:175-181).

Kitos spermos fagocitozės studijos nesvarsto problemos, susijusios su leukocitų praradimu, kurie sulimpa su vienomis medžiagomis labiau, negu su kitomis (Grinnell *et al.*, 1972). Makarand *et al.*, 1985 metais naudojo stiklo konteinerius peritoninio skysčio laikymui. Stiklas turi didžiausią leukocitų adheziją (Grinnell *et al.*, 1972) ir naudojamas makrofagų atskyrimui (Smedsroed B., Pertoft H., Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence, J. Leukocyte Biol., 1985, 38). Muscato *et al.* 1989 metais pasirinko polipropilena, kuris yra geresnė alternatyva, negu stiklas dėl ląstelių adhezijos problemos, bet mažiau optimalus už tefloną.

Mažiau negyvų spermijų inkubacijose su lidokainu suradimas per laiko tarpą turi būti traktuojamas kaip sumažintos spermos fagocitozės efektas dėl lidokaino, tuo tarpu, kai vienu spermijų inkubacijose su ar be lidokaino, nerasta jokio žalingo efekto į spermijas. Tai taip pat turi būti paaiškinimu dėl padidėjusio neprogresyviai judančių spermijų suradimo lidokaino inkubacijose (Fig. 3). Progresyvaus judrumo sumažėjimas nesant peritoninio skysčio gali būti indikacija to, kad PF (peritoninis skystis) turi medžiagų, būtinų spermijams palaikyti savo funkciją.

Kaip minėta įžangoje, kiaušintakių fimbrijos yra pastoviai drėkinamos peritoninio skysčio, kuris endometriozę turinčių pacienčių atžvilgiu sumažina kiaušinėlio galimybę pasirinkti (Suginami *et al.*, 1986). Kaip parodyta šiame ir ankstesniuose darbuose, pacienčių su endometrioze leukocitai peritoniniame skystyje yra labiau pajėgūs fagocitoziniuose spermijuose (Muscatto *et al.*, 1982). Taigi, moterys su endometrioze gali turėti du faktorius, prisidedančius prie jų sumažinto vaisingumo. Šis darbas taip pat nustatė lidokaino panaudojimo efekto galimybę tam, kad sumažintų spermijų fagocitozę.

Sumoje, šis darbas pademonstravo spermijų fagocitozės sumažinimą vartojant lidokainą. Šis fenomenas privalo būti ištirtas atsitiktiniais klinikiniais pertubavimo bandymais su fiziologiniu tirpalu arba lidokaino/fiziologinio tirpalo tirpalais prieš ovuliaciją (LH-pakilimo metu).

Kadangi šis išradimas aprašytas sutinkamai su pageidaujama kompozicija ir įgyvendinimais, tai jis turi būti suprantamas, kad tam tikri pakeitimai ir pakitimai gali būti padaryti nepakeičiant išradimo dvasios ir išradimo apibrėžties apimties.

20

25

30

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

5 1. Vietinio anestetiko panaudojimas gamyboje vaistų prieš nevaisingumą arba
vaisingumui skatinti.

2. Panaudojimas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vietinį
anestetiką parenka iš grupės, susidedančios iš bupivakaino, lidokaino, mepivakaino,
10 prilokaino ir ropivakaino.

3. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji susideda iš
farmaciškai efektyvios vietinio anestetiko koncentracijos drauge su farmaciškai
priimtinu užpildu.

15 4. Farmacinė kompozicija pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad
farmaciškai efektyvi koncentracija sudaro mažiausiai 5 µg/ml.

5. Farmacinė kompozicija pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad
20 vietinis anestetikas parinktas iš grupės, susidedančios iš bupivakaino, lidokaino,
mepivakaino, prilokaino ir ropivakaino.

6. Farmacinė kompozicija pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad
farmaciškai priimtinas užpildas parinktas iš fiziologinio NaCl arba Ringerio tirpalo.

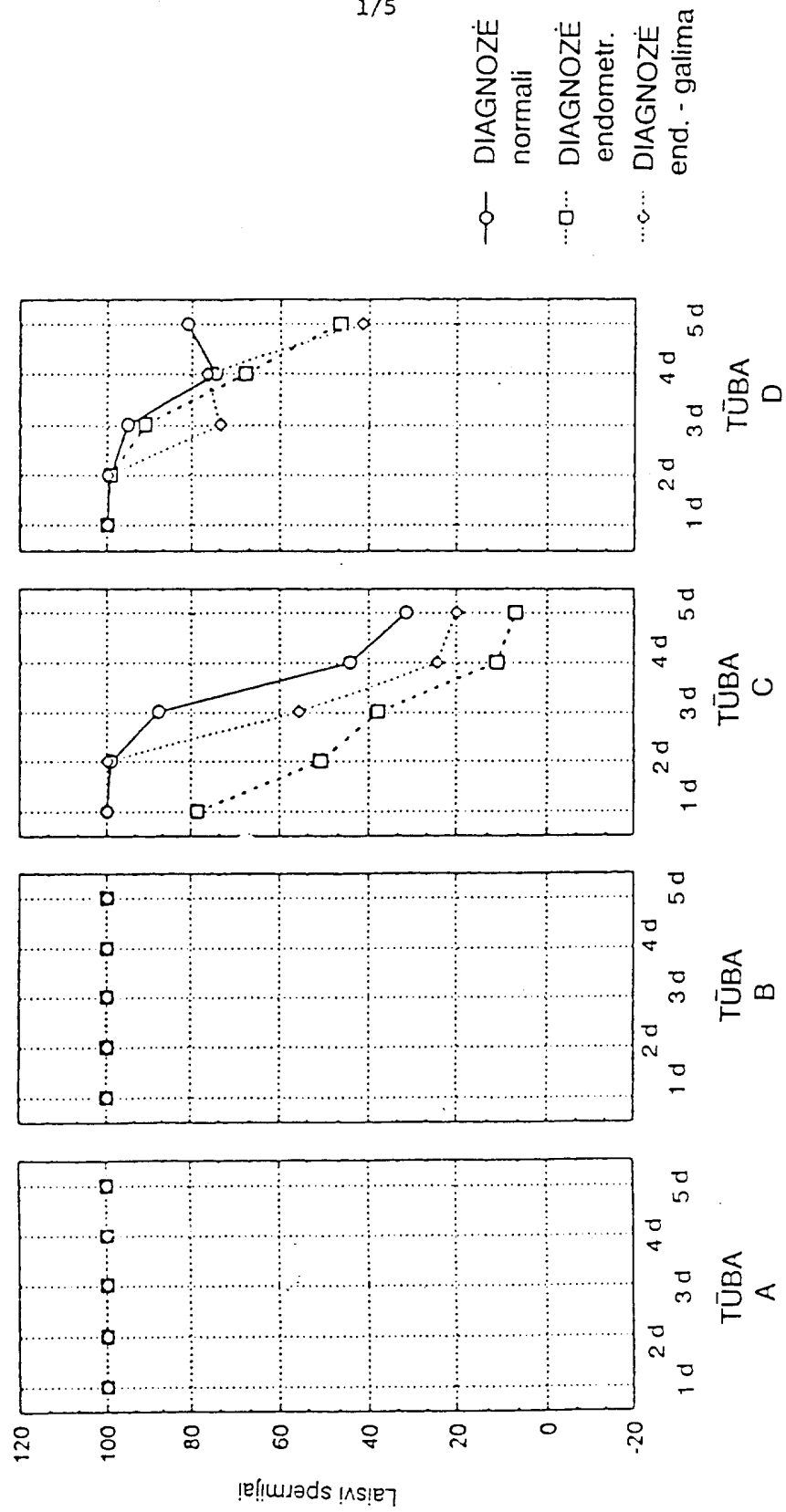
25 7. Farmacinė kompozicija pagal bet kurį iš 3-6 punktų, b e s i s k i r i a n t i
tuo, kad ji turi hialuronano.

8. Farmacinė kompozicija, skirta moters vaisingumo skatinimui, b e s i s k i r i
30 a n t i tuo, kad ji turi sudėtį pagal 3 punktą ir yra įterpiama į pilvo ertmę pertubavimo
būdu.

1/5

Reikšmių grafikas
3-būdų sąveika

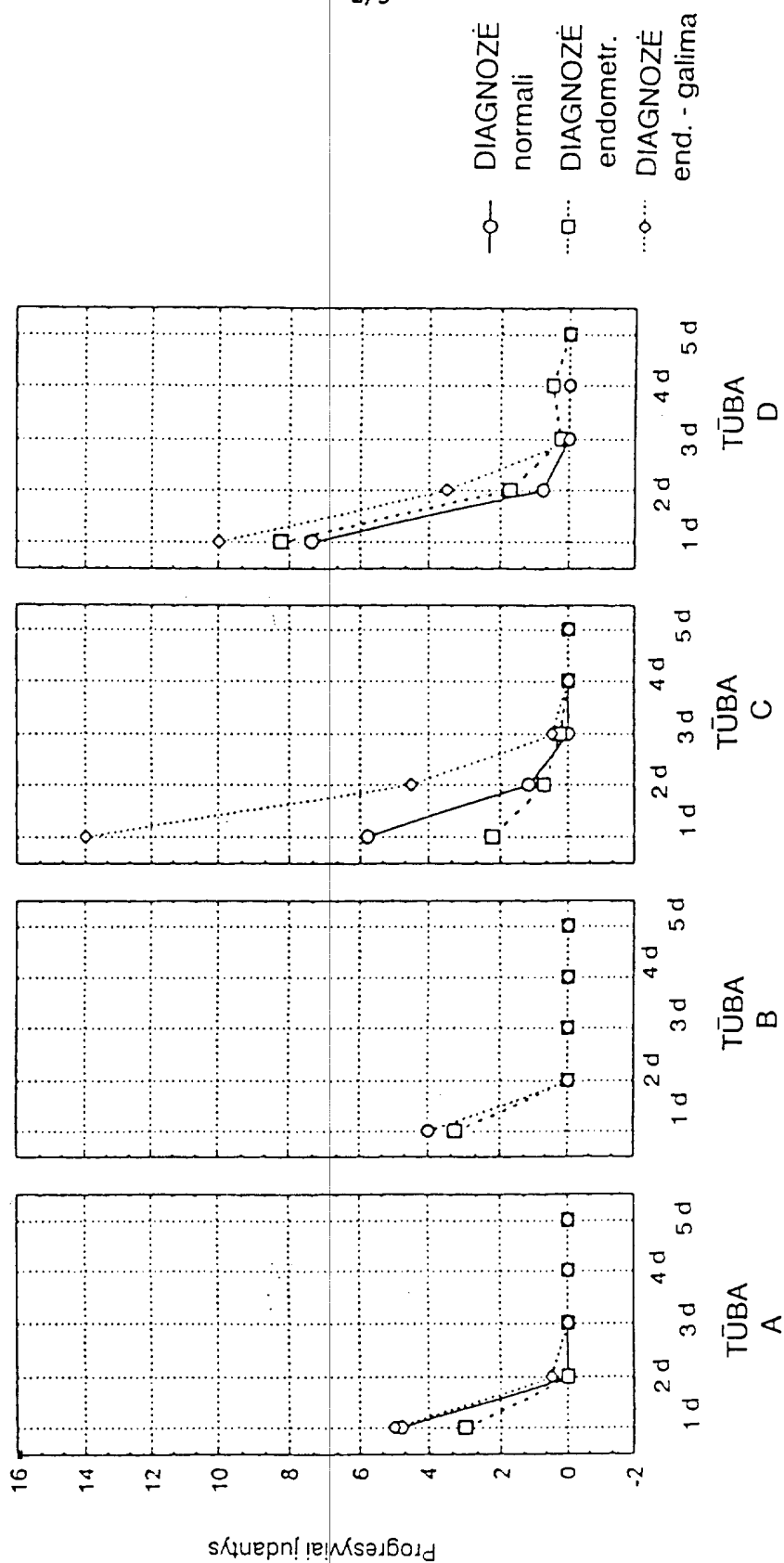
Fig.1



2/5

Reikšmių grafikas
3-būdų sąveika

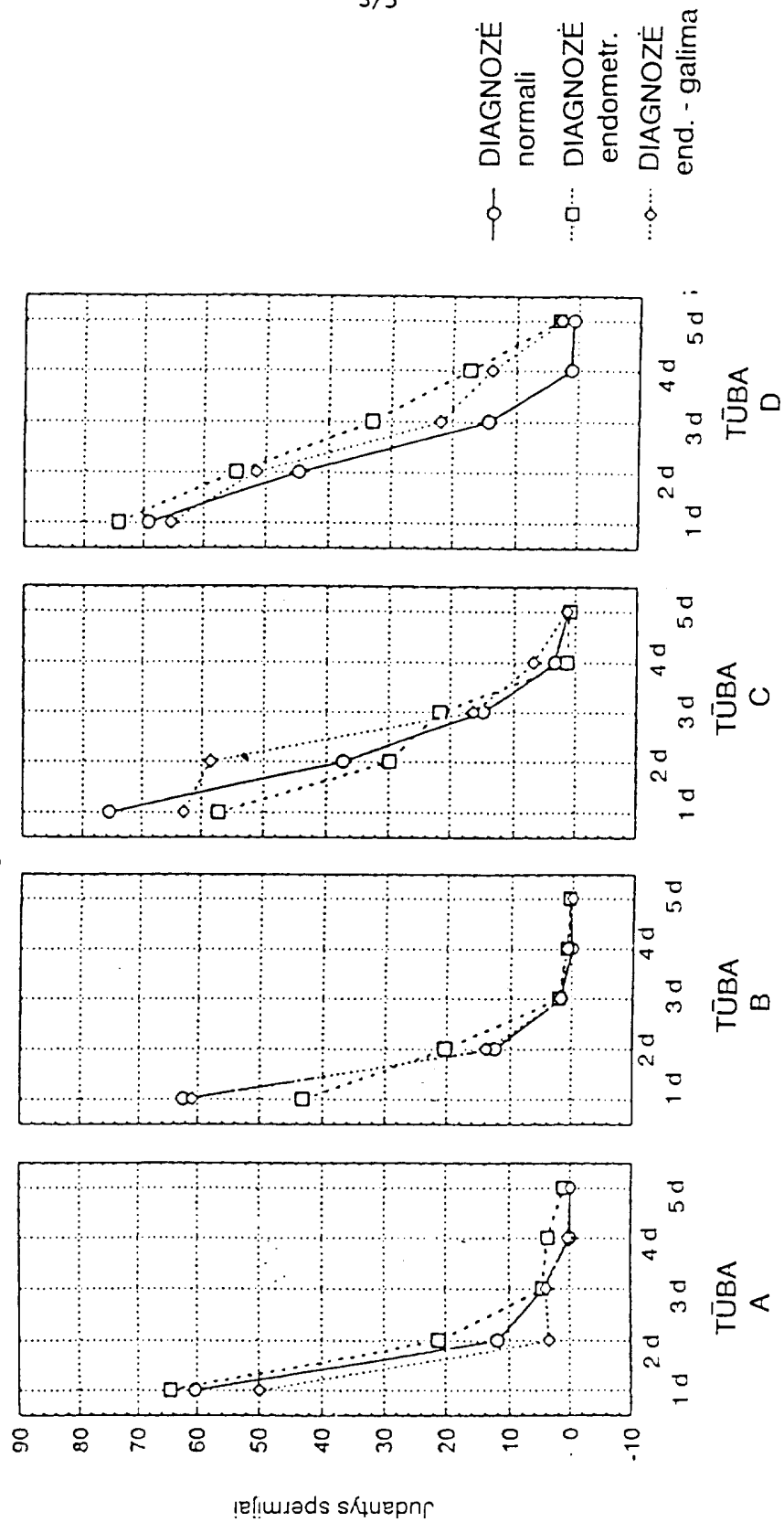
Fig. 2



3/5

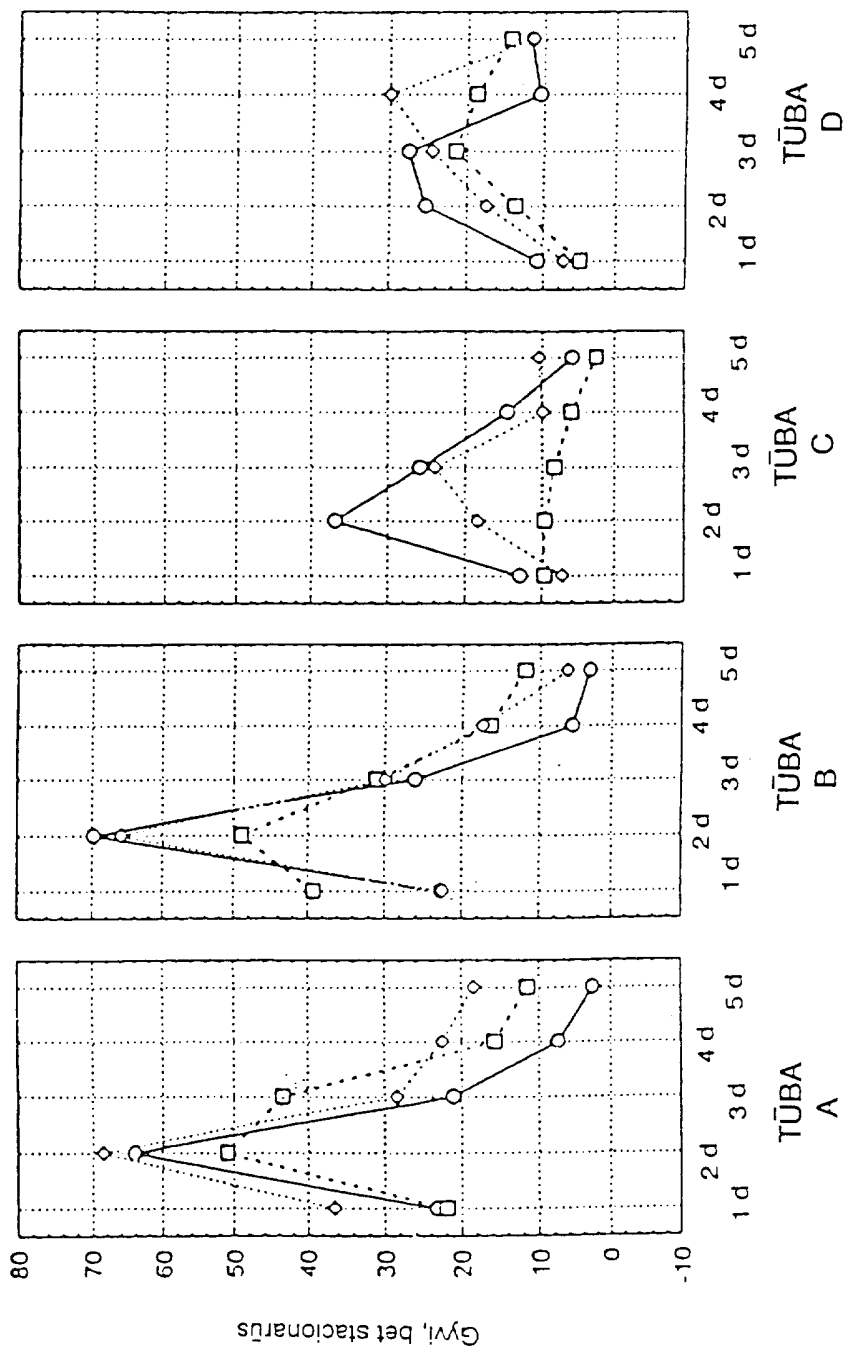
Reikšmių grafikas
3-būdų sąveika

Fig. 3



4/5

DIAGNOZĖ
normali
DIAGNOZĖ
endometr.
DIAGNOZĖ
end. - galima



5/5

Reikšmių grafikas
3-būdų sąveika

Fig. 5

