



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/08 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017128760, 11.08.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.08.2017Дата регистрации:
26.12.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.08.2017

(45) Опубликовано: 26.12.2017 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

123100, Москва, Шмитовский пр., 2, стр. 2 (д.2А),
Агентство "Ермакова, Столярова и партнеры"

(72) Автор(ы):

Андреева Людмила Александровна (RU),
Немерский Евгений Алимович (RU),
Петровский Алексей Константинович (RU),
Петровская Анастасия Юрьевна (RU),
Смирнов Николай Алексеевич (RU),
Федоров Владимир Николаевич (RU),
Федорова Татьяна Борисовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Меданика" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2485970 C1, 27.06.2013. RU
2342132 C2, 27.12.2008. RU 2582963 C1,
27.04.2016. US 7794753 B2, 14.09.2010.
KOZLOVSKAYA M.M. et al. Selank and short
peptides of the tuftsin family in the regulation
of adaptive behavior in stress. Neurosci Behav.
Physiol. 2003: Nov; 33(9): 853-60.(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПЕПТИДА THR-LYS-PRO-ARG-PRO-GLY-PRO (СЕЛАНК) ДЛЯ
ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к токсикологии, и может быть использована для гепатопротективного воздействия при токсическом гепатите. Предложено применение пептида формулы Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк) в качестве гепатопротекторного средства. Способ по изобретению включает введение лекарственного препарата на основе гептапептида общей

формулы Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк) путем нанесения его на слизистую оболочку. Использование изобретений позволяет достоверно снизить летальность, уровень цитолиза, обменных нарушений, обеспечивает повышение активности процесса дезинтоксикации, предупреждает развитие существенных изменений в морфологии и цитоархитектонике печени. 2 н. п. ф-лы, 9 табл., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 38/08 (2006.01)(21)(22) Application: **2017128760, 11.08.2017**(24) Effective date for property rights:
11.08.2017Registration date:
26.12.2017

Priority:

(22) Date of filing: **11.08.2017**(45) Date of publication: **26.12.2017 Bull. № 36**

Mail address:

**123100, Moskva, Shmitovskij pr., 2, str. 2 (d.2A),
Agentstvo "Ermakova, Stolyarova i partnery"**

(72) Inventor(s):

**Andreeva Lyudmila Aleksandrovna (RU),
Nemerskij Evgenij Alimovich (RU),
Petrovskij Aleksej Konstantinovich (RU),
Petrovskaya Anastasiya Yurevna (RU),
Smirnov Nikolaj Alekseevich (RU),
Fedorov Vladimir Nikolaevich (RU),
Fedorova Tatyana Borisovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Medanika" (RU)****(54) APPLICATION OF Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro PEPTIDE (SELANK) FOR TOXIC HEPATITIS PREVENTION AND TREATMENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: application of a peptide of the formula Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (selank) as a hepatoprotective agent is proposed. The method of the invention comprises administration of a drug based on the heptapeptide of the general formula Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (selank) by application to the mucosa.

EFFECT: application of the inventions allows to reliably reduce lethality, cytolysis level, metabolic disturbances, increase the activity of the detoxification process, prevent the development of significant changes in liver morphology and cytoarchitectonics.

2 cl, 9 tbl, 2 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к гепатологии, физиологии, патофизиологии, и может быть использовано для гепатопротекторного воздействия при токсическом поражении печени химическими агентами.

Многие авторы указывают, что печень является одним из главных органов мишеней при токсическом действии многих химических соединений, включая и лекарственные средства [Ковтун А.В и др. Лекарственно-индуцированные поражения печени. Диагностика и лечение // Лечащий врач. Гастроэнтерология. - 2011. - №2. - С. 2-7]. В связи с высокими темпами развития химической и фармацевтической промышленности, широким внедрением их продукции во все сферы жизни человека, злоупотреблением 10 алкоголем и его суррогатами в настоящее время все большую актуальность приобретает проблема токсических гепатитов. Согласно статистическим данным, только от побочных эффектов применения медикаментозных средств в мире ежегодно страдают 1 млн человек, причем в 180 тыс. случаев именно негативное побочное действие лекарств является непосредственной причиной летального исхода [Бабак О.Я. Медикаментозные токсические поражения печени: пути фармакологической коррекции // Здоровье 15 Украины. - 2009. - №19/1. - С. 26; Assis D.N., Navarro V.J. Human drug hepatotoxicity: a contemporary clinical perspective // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 2009, vol. 5, n 5, p. 463-473]. Повреждения печени химическими веществами в дальнейшем могут привести к развитию токсического гепатита, а учитывая важнейшую роль печени 20 в поддержании гомеостаза, это будет отрицательно сказываться на функциональном состоянии организма вплоть до летального исхода.

В структуре острых и хронических заболеваний печени лекарственно-индуцируемые поражения печени (ЛИПП) составляют от 0,7% до 20%, причем каждый седьмой больной погибает [Топчий Н.В., Топорков А.С. Гепатотоксичность - наиболее вероятные 25 причины и возможности оптимальной коррекции Гептралом // РМЖ, 2013, №5, 249-254; Chalasani N., Fontana R.J., Bonkovsky H.L. et al. For the DILIN Study Group. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United + States // Gastroenterology. 2008. Vol. 135. P. 1924-1934]. Лекарственная гепатотоксичность является лидирующей причиной развития печеночной недостаточности, требующей 30 пересадки печени [Ковтун А.В и др. Лекарственно-индуцированные поражения печени. Диагностика и лечение // Лечащий врач. Гастроэнтерология. - 2011. - №2. - С. 2-7; Russo M.W., Galanko J.A., Shrestha R. et al. Liver transplantation for acute liver failure from drug-induced liver injury in the United States // Liver Transplantation. 2004. Vol. 10. P. 1018-1233].

В странах Европы и в США побочные эффекты лекарственных средств выступают 35 в роли причинного фактора желтухи у 2-5% госпитализированных больных; 40% острых гепатитов у пациентов старше 40 лет и 13-25% случаев фульминантной печеночной недостаточности - это токсическое действие лекарств на печень [Бурков С.Г., Егорова Н.В., Аронова О.В., Годунова С.А., Кикта С.В., Леонова В.И., Чугунникова Л.И. Применение препарата Прогепар® в клинической практике // РМЖ, 2011, №31, с. 1969- 40 1975].

Повреждение печени описано у нескольких тысяч химических веществ, из которых можно выделить не менее 1000 лекарственных препаратов. С препаратами, провоцирующими ЛИПП, сталкивается врач практически любого профиля. Это 45 противомикробные средства, препараты, воздействующие на ЦНС, опорно-двигательный аппарат (в частности, нестероидные противовоспалительные средства), желудочно-кишечный тракт и другие [Полунина Т.Е., Маев И.В. Клиника, диагностика и коррекция острого лекарственного гепатита // Лечащий врач; Суханов Д.С, Иванов А.К., Романцов М.Г., Коваленко А.Л. Лечение гепатотоксических осложнений

противотуберкулезной терапии сукцинатсодержащими препаратами // ПМЖ, 2009, №6, с. 1-4; Chalasani N., Fontana R.J., Bonkovsky H.L. et al. For the DILIN Study Group. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States // Gastroenterology. 2008; 135: 1924-1934].

5 Развитие и течение токсического гепатита связано с формированием многозвеньевых патогенеза. Независимо от причин заболевания обязательными этапами патологического процесса являются активация свободнорадикального пути окисления субстратов, нарушение функций клеточных и митохондриальных мембран, дезорганизация обменных процессов и гибель гепатоцитов. На фоне патологии процессы нормальной регенерации
10 заторможены (или вообще невозможны), что провоцирует развитие в печени соединительнотканых элементов с последующим формированием фиброза и цирроза. И все это происходит на фоне выраженного медиаторно-гормонального дисбаланса, усугубляющего поражение органа [Радченко В.Г., Шабров А.В., Зиновьева Е.Н. Основы клинической гепатологии. - СПб., 2005, 234 с.; Махов В.М. Алкогольная болезнь печени и неалкогольная жировая болезнь печени - общность и различия // Лечащий доктор, 2012, №7, с. 34-37; Чиркин А.А. Молекулярные механизмы повреждения печени // Иммунология, аллергология, инфектология. - 2000. - №3. - С. 12-16].

Метаболические процессы в печени регулируются многочисленными физиологически активными веществами, ведущая роль из которых принадлежит моноаминам, в
20 частности катехоламинам и их метаболитам [Крыжановский Г.Н. Дисрегуляторная патология // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2002. - №3. - С. 2-19]. Так, катехоламины вызывают изменение тонуса гладкой мускулатуры сосудов, стимулируют окислительные процессы (особенно адреналин), влияют на жировой и белковый обмены, гликогенолиз и глюконеогенез. При ряде заболеваний, в том числе
25 и токсического (лекарственного) генеза, происходит нарушение числа или соотношения адренорецепторов, сопряжения рецепторов с внутриклеточными структурами, что оказывает неблагоприятное влияние на функциональные возможности печени и приводит, в итоге, к структурным нарушениям органа [Ситников И.Г. Биохимические маркеры хронизации парентеральных гепатитов // «Инфекционные болезни». - 2005. -
30 №3 (т. 3). - С. 23-27; Ситников И.Г., Федоров В.Н., Шошин А.А. Препараты гепатопротективного действия. Ярославль, 2004, 58 с.]. При длительном повышении содержания вазоспастических катехоламинов возможно развитие так называемых «катехоламиновых» повреждения тканей. Высвобождающиеся катехоламины накапливаются во внеклеточном пространстве, нарушая коллатеральную циркуляцию,
35 способствуя возникновению отека и прогрессированию гипоксии и ишемии ткани, что приводит к энергетическому дефициту, оксидативному стрессу и провоцирует печеночный апоптоз [Ситников И.Г. Биохимические маркеры хронизации парентеральных гепатитов // «Инфекционные болезни». - 2005. - №3 (т. 3). - с. 23-27].

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что фармакологические
40 вещества, препятствующие цитолизу (гибели гепатоцитов) и предупреждающие нарушение печеночных функций, могут оказывать гепатопротекторный эффект.

Гепатопротекторы - группа лекарственных средств, предотвращающих повреждение гепатоцита и восстанавливающих нарушения структуры и функции печени. Их действие направлено на восстановление гомеостаза в печени, повышение устойчивости органа
45 к действию патогенных факторов, нормализацию функциональной активности и стимуляцию репаративно-регенерационных процессов [Рациональная фармакотерапия в гепатологии / ред. В.Т. Ивашкина. М.: Литтерра, 2009. - 296 с.; Абдурахманов Д.Т., Моисеев С.В. Лекарственные поражения печени // Фарматека. - 2011. - №17 - С. 67-73;

Кучерявый Ю.А., Морозов С.В. Гепатопротекторы: рациональные аспекты применения. М., 2012; Вялов С.С. Поражение печени и сопутствующая патология: рациональная комбинация гепатопротекторов. // Российский медицинский журнал, 1621].

Многообразным защитным действием обладают соединения, созданные на основе регуляторных пептидов. Регуляторные пептиды (РП) - группа биологически активных веществ олигопептидной природы. Их основными признаками являются полифункциональность, каскадный механизм действия и способ образования из полипептида-предшественника. Регуляторные пептиды выполняют важные нейромедиаторные, модулирующие и интегративные задачи, формируют единый функциональный континуум и являются связующим звеном между основными информационными системами (нервная, эндокринная, иммунная). Их значимость возрастает при воздействии на организм негативных факторов (стрессы, повреждения и пр.) [Мясоедов Н.Ф. Инновационные лекарства: от фундаментальных исследований к производству // Вестник Российской академии наук, 2016, т. 86, №6, 488-494; Ашмарин И.П., Незавибадьков Н.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А. и др. Ноотропный аналог адренотропного гормона 4-10 - Семакс (15-летний опыт разработки и изучения) // Журнал высшей нервной деятельности. - 1997. - Т. 47. - С. 419-425; Ашмарин И.П., Каменский А.А., Ляпина Л.А., Самонина Г.Е., Мясников Н.Ф. Глипролины как самостоятельные регуляторы и стабилизаторы других пептидов // Вопр. биологии, медицины и фармацевтической химии. 2002, №1, с. 24-27].

При различных заболеваниях регуляторные пептиды активируют процессы саморегуляции и самовосстановления нарушенных функций пораженных органов и систем. Важным моментом применения регуляторных олигопептидов является их способность к нормализации уровня тканевых трофических факторов (например, в мозговой ткани), которые, с одной стороны, угнетают различные механизмы патологического каскада, а с другой - стимулируют репаративные процессы [Алтунбаев Р.А. Нейропептиды (регуляторные пептиды головного мозга) в лечении цереброваскулярных заболеваний // Медицинский советник, 2013, 7, 63-64].

Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк) - гептапептид, являющийся комбинацией гликопролина и молекулы тафцина. Глипролин (Pro-Gly-Pro) - фрагмент коллагена, который при присоединении к другим олигопептидам с С-конца способен повышать устойчивость конечной молекулы к действию протеаз. Тафцин (Thr-Lys-Pro-Arg) - синтетический аналог короткого фрагмента тяжелой цепи иммуноглобулина G - является неспецифическим иммуномодулятором, обладающим защитным действием на ЦНС [Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С. и др. Эффективность и возможные механизмы действия нового пептидного анксиолитика Селанка при терапии генерализованного тревожного расстройства и неврастении // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2008. - Т. 108, №4. - С. 38-49].

В медицинской практике Селанк используется как анксиолитик с антидепрессивной активностью, антиастеническим действием и положительным влиянием на мнестические функции. Селанк также обладает стресспротективной и вегетостабилизирующей активностью [Козловская М.М., Козловский И.И., Вальдман Е.А., Середенин С.Б. Селанк и короткие пептиды семейства тафтсина в регуляции адаптивного поведения при стрессе. Рос. физиол. Журн. 2002. 88 (6): 751-761; Козловская М.М. Влияние гептапептида селанка на депрессию поведения высоко- и низкотренируемых мышей BALB/c и C25BL/6 и крыс с наследуемой депрессивностью поведения WAG/RIJ. / М.М. Козловская, К.Ю. Саркисова, И.И. Козловский // Психофармакология и биологическая наркология. - 2005. - Т. 5. - №3. - С. 989-996; Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С.

и др. Эффективность и возможные механизмы действия нового пептидного анксиолитика Селанк при терапии генерализованного тревожного расстройства и неврастении // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2008. - Т. 108, №4. - С. 38-49].

- Селанк обладает протекторными противоязвенными свойствами, проявляющимися
- 5 повышением устойчивости слизистой оболочки желудка к действию различных
 10 язв. Помимо протекторного эффекта селанк обладает
 терапевтическим действием, ускоряя заживление язв. Этот эффект обусловлен
 как непосредственным действием на слизистую оболочку желудка, так и на структуры
 нервной системы, участвующие в поддержании гомеостаза слизистой [Павлов Т.С.
- 10 Селанк и его метаболиты поддерживают гомеостаз слизистой оболочки желудка / Т.С.
 Павлов, Т.Е. Самонина, З.В. Бакаева, Ю.А. Золотарев, А.А. Гусева // Бюллетень
 экспериментальной биологии и медицины. - 2007. - Т. 143. - №1. - С 57-59. Самонина
 Г.Е. Трипептид Pro-Gly-Pro и гомеостаз слизистой оболочки желудка / Г.Е. Самонина,
 Г.Н. Копылова, Б.А. Умарова // Нейрохимия. - 2008. - Т. 25. - №1. - С. 128-131].
- 15 Селанк обладает цитокинрегулирующими свойствами, реализуемыми путем
 подавления экспрессии гена ИЛ-6 лейкоцитов периферической крови, что позволяет
 рассматривать его в качестве иммуномодулятора для коррекции иммунодефицитных
 состояний, лечения и профилактики вирусных инфекций [Учакина О.Н.
- 20 Иммуномодулирующие свойства Селанка у людей с тревожно-астеническими
 расстройствами / О.Н. Учакина, П.Н. Учакин, Н.Ф. Мясоедов и др. // Журн. неврологии
 и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2008. - №5. - С. 71-75. Мезенцева М.В. Нейротропный
 пептид, обладающий антивирусной активностью в отношении гриппа человека и птиц
 и герпесвирусной инфекции / М.В. Мезенцева, Л.А. Андреева, Р.Я. Подчерняева и др.
 // Инфекция и иммунитет. - 2011. - Т. 1. - №1. - С. 81-84].
- 25 В ЦНС и на периферии селанк нормализует кругооборот катехоламинов и
 серотонина, что обусловлено его влиянием на активность ключевых ферментов,
 контролирующих биосинтез моноаминов de novo (тирозин- и триптофангидроксилазу).
 Селанк также является ингибитором энкефалиназ, что препятствует ускоренному
 распаду энкефалинов [Козловская М.М., Незнамов Г.Г., Кошелев В.В., Телешова Е.С.,
- 30 Бочкарев В.К. Результаты клинко-фармакологического исследования пептидного
 препарата Селанк в качестве анксиолитического средства // Социальная и клиническая
 психиатрия, 2003. - N 4. - С. 28-36; Сюняков Т.С. Клинко-фармакологическая
 характеристика анксиолитического действия нового пептидного препарата селанк.
 Автореферат канд. диссертации, М., 2010, 24 с.; Клодт П.М., Кудрин В.С., Наркевич
- 35 В.Б., Козловская М.М., Майский А.И., Раевский К.С. Содержание моноаминов и их
 метаболитов в структурах мозга крыс. Психофарм. биол. наркологию. 2005. 5 (3): 1012-
 1015]. Повышая на периферии уровень лей- и метэнкефалинов, селанк влияет на
 симпатическую и парасимпатическую регуляцию внутренних органов и кровеносных
 сосудов (эндотелий-независимый сосудорасширяющий эффект), предотвращая
- 40 гиперактивацию симпатической нервной системы, например, при хроническом стрессе
 [Кост Н.В. Опиоидергические механизмы тревожных расстройств и эффектов
 анксиолитических препаратов. Автореферат докт. диссертации. М., 2007, 49 с.].
- Введение селанка способствует активизации пептидергической системы организма
 и синтезу широкого спектра регуляторных пептидов [Соловьев В.Б. Роль
- 45 пептидергической системы в адаптационных процессах и регуляции метаболизма при
 физической работе / Автореф. докт. дисс. М., 2011, 39 с.; Соловьев В.Б., Генгин М.Т.,
 Соллертинская Т.Н., Латынова И.В., Живаева Л.В. Влияние семакса на активность
 карбоксипептидазы Н в отделах мозга и надпочечниках крыс // Нейрохимия. - 2011. -

Т. 28. - №2. - С. 169-172] и, в частности, соединений, обладающих трофическими свойствами. Сложное биологическое действие селанка на организм, по крайней мере частично, обусловлено его действием на экспрессию генома в различных органах [Т.А. Коломин, М.И. Шадрина, Я.В. Агниулин, С.И. Шрам, П.А. Сломинский, С.А. Лимборская, академик РАН Н.Ф. Мясоедов. Транскриптомный ответ клеток гиппокампа и селезенки крысы на однократное и курсовое введение пептида селанка // ДАН, 2010, 1, 127-129].

Тем не менее, использование пептида Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк) для гепатопротекторного воздействия в условиях применения гепатотоксичных агентов не изучено.

Задача, решаемая при создании настоящего изобретения, состоит в расширении арсенала средств для гепатопротекторного воздействия при лечении и профилактике токсического гепатита. Техническим результатом, достигаемым при решении такой задачи, является повышение эффективности лечения и профилактики токсического гепатита.

Для достижения поставленного результата предлагается в качестве гепатопротекторного средства при лечении и профилактике токсического гепатита применять пептид общей формулы Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк).

Предметом изобретения может также являться способ профилактики или лечения токсического гепатита, заключающийся в ведении пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества лекарственного препарата, содержащего пептид формулы Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк), наносимого на слизистую оболочку.

Химическая формула данного пептида Селанк известна. Был использован препарат, синтезированный в ЗАО «Инновационный научно-производственный центр «Пептоген». Растворенный в изотоническом растворе хлорида натрия пептид вводили экспериментальным животным (крысы) интраназально в дозе 200 мкг/кг.

Экспериментальные животные содержались в помещении при температуре воздуха 22-24°C, световом режиме: 12 часов - свет, 12 часов - темнота и получали стандартный гранулированный корм и воду в свободном доступе с соблюдением всех правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), в соответствии с действующими "Правилами лабораторной практики" [Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»] и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [Москва, 2005]. На момент выполнения эксперимента все животные были здоровыми, изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования не выявлено.

Пример конкретного выполнения №1

Для воспроизведения острого токсического гепатита применялась модель с введением четыреххлористого углерода (CCl_4) [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М.: Ремедиум, 2000. - 598 с.]. Перед моделированием гепатита у белых крыс была определена острая токсичность CCl_4 [Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. - Л., 1963. - 153 с.] при внутрижелудочном введении. Дозы минимальной токсичности (ДМТ) 16%, 50%, 84% и 100% летальности (DL_{16} , DL_{50} , DL_{84} и DL_{100}), которые, соответственно, были равны 5,8; 7,1; 9,6; 12,1 и 15,1 мл/кг. Подопытным крысам вводилась доза DL_{50} - 9,6 мл/кг.

Опыты были поставлены на 45 белых крысах-самцах, массой 240-260 г, разделенных на 3 группы. Над животными первой группы никаких манипуляций не производилось (интактная группа). Вторая (контрольная) группа животных однократно внутрижелудочно получила 9,6 мл/кг CCl_4 . Третья группа дополнительно к CCl_4

получала селанк - пептид растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия и вводили экспериментальным животным интраназально в дозе 200 мкг/кг ежедневно в течение 14 дней, пока шло наблюдение за животными. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора. На 15-й день животных выводили из эксперимента путем обескровливания под эфирным наркозом. Анализируемыми критериями являлись процент выживаемости, продолжительность жизни погибших животных, весовой коэффициент печени у выживших крыс.

Исследование показало (табл. 1), что селанк обладает выраженной гепатопротекторной активностью: выживаемость животных повысилась с 53 до 80%, в два раза увеличилась продолжительность жизни погибших белых крыс, повышение весового коэффициента печени у выживших животных существенно снизилось.

Таблица 1. Гепатопротективная активность исследуемых препаратов: итоги I этапа скрининга

Группа	n	Выживаемость крыс (%)	Длительность жизни погибших крыс (дни)	Весовой коэффициент печени
Интактные	15	100	-	26,34±1,08
Контроль	15	53	2,6±0,4	32,80±1,20*
Селанк	15	80	5,3±0,8**	28,10±1,38**

*) достоверная разница с интактными животными

**) достоверная разница с контрольными животными

Пример конкретного выполнения №2. Для создания подострого токсического гепатита применялась модификация методики, предложенная в 1989 году Сливкой Ю.И., основанная на применении комбинации: изониазид + пиперазин + рифампицин [патент RU 2197984 от 02.10. 2003, патент RU 2189817 от 27. 09. 2002]. Основными особенностями примененной модели являлось повышение дозировок изониазида (100 мг/кг, внутрижелудочно) и рифампицина (125 мг/кг, внутрижелудочно), удлинение срока воздействия с двух до трех недель, а также добавление в качестве потенцирующего фактора этанола в виде 25% раствора (3 г/кг, внутривентрально).

Опыты были поставлены на 30 белых крысах-самцах, массой 230-250 г, разделенных на 3 группы. Над животными первой группы никаких манипуляций не производилось (интактная группа). Вторая (контрольная) группа животных ежедневно внутрижелудочно получала комбинацию изониазида (100 мг/кг) с рифампицином (125 мг/кг), а также ежедневные внутривентральные инъекции 25% раствора этанола в дозировке 3 г/кг. Третья группа дополнительно к данным препаратам получала селанк - пептид растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия и вводили экспериментальным животным интраназально в дозе 200 мкг/кг ежедневно в течение 21 дня, пока вводились гепатотоксические средства. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора. Наблюдение за животными проводилось в течение трех недель. На 22-й день эксперимента животных выводили из эксперимента путем обескровливания под эфирным наркозом.

Функциональное состояние печени оценивали по ряду стандартизированных биохимических показателей крови, которые объединялись по функциональным группам: маркеры цитолиза гепатоцитов (активность аспартаттрансаминазы-АСТ, аланин-трансаминазы-АЛТ и лактатдегидрогеназы-ЛДГ), показатели синтетической активности и белкового обмена (общий белок, альбумины, глобулины), углеводного обмена (активность альфа-амилазы общей и панкреатической, содержание глюкозы), липидного обмена (активность липазы, содержание триглицеридов, общего холестерина, в также холестерина липопротеидов низкой плотности - ХС ЛПНП и холестерина липопротеидов высокой плотности - ХС ЛПВП), дезинтоксикационной функции печени (прямой билирубин). Уровень катехоламинов (КА) крови [адреналина (АД), норадреналина (НА), дофамина (ДА)] определяли дифференциально-флюориметрическим методом В.О. Осинской [Осинская В.О. Исследования обмена адреналина и норадреналина в тканях животного организма // Биохимия. - 1977. - №3. - С. 537-539; Камышников, В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник: В 2 т. Т. 2 / В.С. Камышников - Минск: Интерпрессервис, 2003 - 463 с.]. Об активности перекисного окисления липидов и функции клеточных мембран судили по уровню осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ), которая изучалась стандартизированным методом [Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. - 1998. - №8. - С. 43-51]. Для гистоморфологического исследования печени использовали окраску препаратов гематоксилином и эозином, коллагеновые волокна выявляли, прибегая к окраске по Массону; эластические волокна окрашивали фукселином по Харту, а ретикулиновые - путем импрегнации серебром по Футу. Стереометрическое исследование печени проводили для определения соотношений различных тканевых компонентов. Статистическую обработку результатов производили с использованием t-критерия Стьюдента.

Анализ динамики активностей цитолитических ферментов в крови показал (табл. 2), что на фоне токсического гепатита имело место достоверное повышение активности у АСТ и АЛТ на 46% и 21% и тенденция к повышению на 15% общей активности ЛДГ. Селанк препятствовал повышению активностей цитолитических ферментов в крови.

Таблица 2. Влияние селанка на активность цитолиза гепатоцитов

Группа	АЛТ Ед/л	АСТ Ед/л	ЛДГ Ед/г
интактные	103,3±11,5	136,5±6,7	628±58
контроль	150,6±14,5*	164,5±11,1*	722±74
селанк	132,7±15,6	149,7±6,5	647±81

*) - достоверная разница с интактными животными (при $p < 0,05$)

При поражениях печени нарушение белкового обмена типичное явление. У контрольных крыс 21-дневное введение гепатотоксических препаратов (табл. 3) вызывало в крови достоверное снижение уровня общего белка на 16% за счет падения концентрации альбуминов (-23%, $p < 0,05$); концентрация глобулинов крови достоверно не изменялась. Селанк нормализовал все нарушенные показатели.

Таблица 3. Влияние селанка на синтез белка в печени на фоне моделируемого гепатита

Группа	Общий белок г/л	Альбумины г/л	Глобулины г/л
интактные	64,3±1,2	33,7±0,6	30,6±0,5
контроль	54,2±2,7*	26,0±1,1*	28,2±1,2
селанк	59,6±2,1	31,6±1,1**	28,0±1,2

*) - достоверная разница с интактными животными (при $p < 0,05$)

**) достоверная разница с контрольными животными (при $p < 0,05$)

При моделировании гепатита имело место достоверное падение амилазной активности на 17% при нормальном содержании глюкозы в крови (табл. 4). Введение селанка вызвало нормализацию амилазной активности.

Таблица 4. Влияние селанка на показатели углеводного обмена при моделируемом гепатите.

Группа	Альфа-амилаза крови Е/л	Альфа-амилаза панкреатическая Ед/л	Глюкоза ммоль/л
интактные	2173±94	1218±53	8,6±0,4
контроль	1796±60*	1012±41*	8,7±0,4
селанк	2024±104**	1135±61	8,1±0,3

*) - достоверная разница с интактными животными (при $p < 0,05$)

**) достоверная разница с контрольными животными (при $p < 0,05$)

При моделировании токсического гепатита (табл. 5) у крыс имело место снижение липазной активности крови (-57% при $p < 0,05$) на фоне достоверного повышения в ней концентрации триглицеридов (+43%) и тенденции к увеличению уровня общего холестерина (+20% при $p > 0,05$). Селанк препятствовал развитию отрицательной динамики показателей липидного обмена.

Таблица 5. Влияние селанка на показатели липидного обмена при моделируемом гепатите.

Группа	Липаза, Ед/л	Триглицериды, ммоль/л	Общий ХС, ммоль/л	ХС ЛПНП, ммоль/л	ХС ЛПВП, ммоль/л	ЛПВП/ЛПНП
интактные	220,0±50,6	0,54±0,03	1,60±0,13	0,87±0,07	0,43±0,05	0,50
контроль	94,8±7,6*	0,77±0,10*	1,93±0,11	0,90±0,07	0,46±0,03	0,51
селанк	378,0±106,2**	0,56±0,06**	1,71±0,14	1,09±0,06**	0,40±0,04	0,37

*) - достоверная разница с интактными животными (при $p < 0,05$)

**) достоверная разница с контрольными животными (при $p < 0,05$)

На фоне формирования гепатита уровень прямого билирубина в крови достоверно возрастал на 27% (табл. 6), что является свидетельством нарушения пигментного обмена и развития холестаза. Введение селанка нивелирует эти нарушения.

Таблица 6. Влияние селанка на показатели дезинтоксикационной функции печени при моделируемом гепатите.

Группа	Билирубин прямой, мкмоль/л
интактные	0,52±0,02
контроль	0,66±0,05*
селанк	0,56±0,09

*) - достоверная разница с интактными животными (при $p < 0,05$)

Осмотическая резистентность эритроцитов (ОРЭ) является интегральным показателем устойчивости организма к ПОЛ [Крылов В.И., Жмуров В.А., Иванова Е.Е. и др. Метаболизм перекисных соединений липидов при заболеваниях почек у детей // Механизмы регуляции обмена веществ в норме и патологии. - Свердловск, 1982. - С. 14-18]. Нарастание свободно-радикальных процессов приводит к снижению резистентности клеточных мембран, показателем чего является падение осмотической резистентности эритроцитов. Поскольку имеет место тесная связь между изменением проницаемости эритроцитарных мембран и мембран клеток, пораженных патологическим процессом органов [Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты [Текст] / Ю.А. Владимиров // Вестник РАМН. - 1998. - №8. - С. 43-51], исследовалась осмотическая резистентность эритроцитов при их инкубации в 0,5% растворе NaCl.

При моделировании токсического гепатита у животных имело место достоверное снижение ОРЭ на 30% (табл. 7). Селанк препятствовал повышению уровня гемолиза эритроцитов в гипоосмотических условиях, что можно связывать с его антирадикальной активностью.

Таблица 7. Влияние исследуемых препаратов на осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) при моделируемом гепатите.

Группа	ОРЭ (% гемолиза)
интактные	55,1 ± 3,2
контроль	78,1 ± 4,6*
селанк	62,3±4,2**

*) - достоверная разница с интактными животными (при $p < 0,05$)

**) достоверная разница с контрольными животными (при $p < 0,05$)

Моделирование лекарственного гепатита выявило выраженные гистоморфологические изменения структуры печени. В органе развивалось резкое полнокровие артериальной и венозной сети, отмечалось расширение синусоидов и лимфатического русла. Одновременно происходила инфильтрация внедольковой стромы исследуемого органа мононуклеарами, нейтрофилами и эозинофилами, а также наблюдалось разрастание грубоволокнистой соединительной ткани, в том числе в сосудах (артерии и ветви воротной вены) и желчных протоках. Это указывало на наличие склероза портальных трактов, отмеченного увеличением их удельной площади, что продемонстрировано с помощью стереометрии. Гепатоциты подвергались гидропической белковой дистрофии, иногда переходящей в фокальные некрозы, что приводило к снижению удельной площади паренхимы. Нередко полиморфноклеточный инфильтрат из стромы выходил через пограничную пластинку в дольку, формируя

характерные «ступенчатые» некрозы. Удельная площадь гепатоцитов, по сравнению с контрольной серией, уменьшалась в 1,3 ($p<0,001$) раза. И, наоборот, удельная площадь синусоидов увеличивалась в 1,3 ($p<0,001$) раза, а площадь стромы возрастала в 1,2 ($p<0,05$) раза. В целом, морфологическую картину можно охарактеризовать как хронический активный гепатит с фиброзом стромы, а воспроизводимый в эксперименте гепатит по своим структурным проявлениям вполне соответствовал таковому, наблюдаемому в клинической практике.

На фоне введения селанка у крыс с моделированным гепатитом резко уменьшалась воспалительная гиперемия сосудов притока и оттока крови от печени, а также синусоидов; хорошо подвергались снижению склеротические изменения стенок артерий, ветвей воротной вены, а тонус данных сосудов возвращался к норме. Кроме того, полностью сохранялась привычная дольковая архитектура печени, а также отсутствовали признаки повреждения печеночных клеток в виде дистрофии и некроза. Также отмечалось усиление регенеративных процессов паренхимы печени, что выражалось в увеличении, гиперхроматозе ядер клеток и появлении двуядерных форм. Следовательно, на фоне лечения крыс селанком наблюдался не только явный регресс патологических изменений печеночной ткани, но и создавались условия для ее восстановления.

Стереометрическое исследование показало (табл. 8), что селанк препятствовал достоверному снижению удельной площади гепатоцитов (повышая ее по отношению к контролю на 22% при $p<0,01$) и замещению их соединительнотканью элементами, т.к. он препятствовал увеличению площади стромы (снижал на 14% по отношению к контролю при $p<0,01$).

Табл. 8. Стереометрическое исследование ткани печени у интактных и контрольных крыс.

группа	гепатоциты	синусоиды	строма
интактные	58,2±2,3	29,6±1,2	8,5±0,3
контрольные	46,7±2,1*	38,8±2,0*	10,3±0,4*
селанк	56,9±2,2**	35,7±1,7*	8,9±0,3**

*) - достоверная разница с интактными животными (при $p<0,05$)

**) - достоверная разница с контрольными животными (при $p<0,05$)

Летальность животных - наиболее важный интегральный показатель действия токсических агентов на организм. На фоне моделирования токсического гепатита имела место 20%-я летальность животных. Введение селанка ее предупреждало.

Развитие лекарственного гепатита приводило у животных к значимому дисбалансу симпатoadренальной системы (табл. 9), который, прежде всего, характеризовался повышением в крови концентрации норадреналина на 88% и уменьшением содержания дофамина на 45%; уровень АД практически не менялся. Снижение значений коэффициента АД/НА в крови почти в 2 раза ($p<0,05$) свидетельствовало том, что при лекарственном гепатите происходит преимущественная активация нейрональной компоненты симпатoadренальной системы, а не эндокринной. Падение значения «дофаминового» коэффициента [ДА/(АД+НА)] в 2,6 раза указывало о превалировании активности вазоконстрикторных катехоламинов над вазодилатирующими и, в итоге, о снижении кровотока в паренхиматозных органах.

Применение селанка положительно влияло на динамику уровня катехоламинов в крови больных животных. Он препятствовал нарастанию концентрации норадреналина и падению содержания дофамина крови, способствовал нормализации значений адреналинового и дофаминавого коэффициентов.

Таблица 9. Динамика содержания катехоламинов в крови крыс с экспериментальным лекарственным гепатитом

Группы	АД	НА	ДА	АД/НА	ДА/(АД+НА)
Интактные	0,075±0,005	0,065±0,004	0,082±0,010	1,15	0,59
Гепатит	0,072±0,006	0,122±0,008*	0,044±0,009*	0,59*	0,23*
Селанк	0,087±0,007	0,080±0,007**	0,103±0,014**	1,09**	0,62**

* - достоверная разница ($p < 0,05$) с интактной группой

** - достоверная разница ($p < 0,05$) с группой острого гепатита

Таким образом, результаты выполненных исследований показали, что пептид Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк) оказывает выраженный гепатопротекторный эффект при токсическом гепатите.

(57) Формула изобретения

1. Применение пептида формулы Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк) в качестве гепатопротекторного средства при профилактике и лечении токсического гепатита.
2. Способ лечения токсического гепатита, включающий введение лекарственного препарата на основе гептапептида общей формулы Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк) через слизистую оболочку, где способ включает нанесение указанного препарата на слизистую оболочку.