РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 681 310**(13) **C1**

(51) МПК
A61K 38/07 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 38/07 (2018.08); A61P 17/02 (2018.08)

(21)(22) Заявка: **2018131971, 05.09.2018**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.09.2018

Дата регистрации:
06.03.2019

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **05.09.2018**

(45) Опубликовано: **06.03.2019** Бюл. № **7**

Адрес для переписки:
305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3, КГМУ, отдел менеджмента научных разработок и интеллектуальной собственности, Куприяновой З.Н.

(72) Автор(ы):
Рахметова Камила Камильджановна (RU),
Бобынцев Игорь Иванович (RU),
Бежин Александр Иванович (RU),
Смахтин Михаил Юрьевич (RU),
Мишина Екатерина Сергеевна (RU),
Хорьяков Максим Юрьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 20140309173 A1, 16.10.2014. US 6096864 A, 01.08.2000. RU 2596393 C2, 10.09.2016. BAYRAMOV D., et al., A Novel Peptide-Based Antimicrobial Wound Treatment is Effective Against Biofilms of Multi-Drug Resistant Wound Pathogens.Mil Med. 2018 Mar 1;183(suppl_1):481-486. doi: 10.1093/milmed/usx135.**

(54) Способ первичной хирургической обработки инфицированных ран кожи и мягких тканей с использованием пептида Gly-His-Lys-D-Ala

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и касается способа первичной хирургической обработки инфицированных ран кожи и мягких тканей, включающего моделирование инфицированной раны кожи и мягких тканей у экспериментального животного, обработку полученной раны раствором перекиси водорода, иссечение нежизнеспособных, инфицированных краев и дна раны, остановку кровотечения и наложение первичных узловых швов, парентеральное внутрикожное введение пептида Gly-His-Lys-D-Ala один раз в сутки в течение 10 дней. Изобретение обеспечивает лечение инфицированных ран кожи и мягких тканей. 3 табл., 1 пр.

RU 2681310 C1

RU 2681310 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 681 310**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 38/07 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 38/07 (2018.08); A61P 17/02 (2018.08)

(21)(22) Application: **2018131971, 05.09.2018**

(24) Effective date for property rights:
05.09.2018

Registration date:
06.03.2019

Priority:
(22) Date of filing: **05.09.2018**

(45) Date of publication: **06.03.2019** Bull. № **7**

Mail address:
305041, g. Kursk, ul. K. Marksa, 3, KGMU, otdel menedzhmenta nauchnykh razrabotok i intellektualnoj sobstvennosti, Kupriyanovoj Z.N.

(72) Inventor(s):
Rakhmetova Kamila Kamildzhanovna (RU),
Bobyntsev Igor Ivanovich (RU),
Bezhin Aleksandr Ivanovich (RU),
Smakhtin Mikhail Yurevich (RU),
Mishina Ekaterina Sergeevna (RU),
Khoryakov Maksim Yurevich (RU)

(73) Proprietor(s):
federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Kurskij gosudarstvennyj meditsinskij universitet" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)

(54) SKIN AND SOFT TISSUES INFECTED WOUNDS PRIMARY SURGICAL TREATMENT METHOD USING THE Gly-His-Lys-D-Ala PEPTIDE

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the medicine and relates to the skin and soft tissues infected wounds primary surgical treatment method, including the skin and soft tissues infected wound modeling in the experimental animal, received wound treatment with the hydrogen peroxide solution, excision of the wound non-viable, infected edges and bottom, arresting of the bleeding and the primary nodal stitches imposition, the Gly-His-Lys-D-Ala peptide parenteral intradermal administration once a day for 10 days.

EFFECT: invention enables the skin and soft tissues infected wounds treatment.

1 cl, 3 tbl, 1 ex

RU 2681310 C1

RU 2681310 C1

Изобретение относится к медицине (хирургии, травматологии, патофизиологии, фармакологии) и ветеринарии и может быть использовано при лечении инфицированных ран кожи и мягких тканей.

Лечение ран на сегодняшний день является актуальной проблемой ввиду роста травматизма в быту, увеличения количества техногенных катастроф, военных конфликтов, дорожно-транспортных происшествий. Нагноение ран зависит от реактивности организма, количества микробных агентов в поврежденной ткани и их видопринадлежности, особенностей раны и повреждающего агента, сроков повреждения и т.д. В настоящее время лечение больных с инфицированными ранами заключается в хирургической обработке ран (вторичная хирургическая обработка, активное или пассивное дренирование раны, закрытие раневой поверхности с помощью первичных, первично-отсроченных, ранних или поздних вторичных швов, кожной пластики и т.д.), местном и общем медикаментозном лечении и других мерах (Раны и раневая инфекция // Под ред. М.И. Кузина, Б.М. Костюченко - М., «Книга по требованию», 2012, 592 с.).

При этом главными этапами хирургического лечения являются щадящее удаление девитализированных тканей, являющихся питательной средой для патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, сохранение влажной среды в самой ране наряду с условиями для достаточного оттока раневого экссудата, эвакуации токсинов, продуктов тканевого распада, удаление инородных частиц в ране и уменьшение количества патогенных и условно-патогенных микроорганизмов с помощью растворов антисептиков и антибиотиков.

Известен способ лечения инфицированных ран, базирующийся на использовании адаптационно-репозиционных устройств, предназначенных для снижения времени заживления ран посредством уменьшения натяжения в краях раны (Измайлов С.Г. и др. Применение адаптационно-репозиционных аппаратов для закрытия гранулирующих ран мягких тканей // Вестник хирургии имени И.И. Грекова, 2000, т. 159, №2, стр. 66-70).

Известен способ лечения инфицированных ран, заключающийся в наложении первичных швов после хирургической обработки гнойного очага с местным применением нейропептидов мозга (Гавриленко В.Г. и др. Применение окситоцина в комплексном лечении при гнойно-некротических поражениях стоп у больных с сахарным диабетом // Вестник хирургии, 2000, №3, стр. 59-63).

Однако, согласно Измайлову С.Г. и др. (2000 г.) и Гавриленко В.Г. и др. (2000 г.), данные методы относительно малоэффективны в лечении ран. А большая продолжительность лечения, обусловленная недостаточной эффективностью воздействия применяемых средств, приводит к большим материальным затратам как пациента, так больницы и государства в целом.

Наиболее близким к заявляемому способу является стимуляция заживления кожных ран при парентеральном применении регуляторного пептида Gly-His-Lys, имеющего формулу H_2N-Gly-L-His-L-Lys-COOH (Курцева А.А., Влияние регуляторного пептида глицил-гистидил-лизина и составляющих его аминокислот на регенерацию кожи и функцию нейтрофилов. Автореферат дисс. канд. мед. наук, Курск, 2008, стр. 15-18). Наибольшая ранозаживляющая активность проявлялась при десятикратном (с интервалом в 24 часа между инъекциями) внутрибрюшинном или внутрикожном введении пептида Gly-His-Lys в разовой дозе 0,5 мкг/кг массы тела.

В литературе описано модулирующее влияние пептида Gly-His-Lys на регуляцию процессов роста и дифференцировки клеток (Kato K., Kasai S., Onodera K. et al. Effect of hepatocyte growth factor on the proliferation of transplanted hepatocytes in the spleen // Transplant.

Proc., 1997, vol. 29, №4, p. 2029-2031; Sporn M.B., Roberts A.B. Transforming growth factor-в: recent progress and new challenges // J. Cell Biol, 1992, vol. 119, №5, p. 1017-1021). Некоторыми исследователями доказано влияние данного пептида как стимулятора ранозаживления, так как известен его стимулирующий эффект на синтез коллагена фибробластами (Maquart F.X., Bellon G., Chaqour B. et al. In vivo stimulation of connective tissue accumulation by the tripeptidecopper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu2+ in rat experimental wounds // J. Clin. Invest, 1993, vol. 92, №5, p. 2368-2376). Подтверждено стимулирующее влияние пептида на рост волос (Trackhy R.E., Fors T.D., Pickart L., Uno H. The hair follicle-stimulating properties of peptide copper complexes. Results in C3H mice // Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1991, vol. 642, №10, p. 468-469) и противовоспалительное действие, связанное с уменьшением выделения железа из ферритина в поврежденных тканях (Miller D.M., DeSilva D., Pickart L., Aust S.D. Effects of glycyl-histidyl-lysyl chelated Cu(II) on ferritin dependent lipid peroxidation // Adv. Exp. Med. Biol, 1990, vol. 264, p. 79-84). Однако в литературе нет данных об использовании аналогов данного пептида, в частности, для лечения инфицированных ран кожи и мягких тканей.

Техническим результатом изобретения является способ первичной хирургической обработки инфицированных ран кожи и мягких тканей с использованием пептида Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг массы тела один раз в сутки в эквимолярных дозах в течение 10 дней для стимуляции регенерации инфицированных ран кожи и мягких тканей.

Технический результат достигается тем, что через 24 часа после моделирования инфицированной раны кожи и мягких тканей у экспериментального животного (крысы) производят обработку полученной раны 3% раствором перекиси водорода, иссекают нежизнеспособные, инфицированные края и дно раны, производят остановку кровотечения и накладывают первичные узловые швы, после чего парентерально внутрикожно вводят параллельно шву на расстоянии 0,1 см от него с каждой стороны растворенный в физиологическом растворе хлорида натрия пептид Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг массы тела один раз в сутки в эквимолярных дозах в течение 10 дней.

Способ осуществляется следующим образом.

Пептид Gly-His-Lys-D-Ala, имеющий формулу H_2N-Gly-His-Lys-D-Ala-COOH, можно синтезировать в лаборатории синтеза пептидов. Нами был исследован препарат, синтезированный в НИИ химии Санкт-Петербургского государственного университета.

Экспериментальному животному (крысе, мыши) на холке моделируют инфицированную рану кожи и мягких тканей. Через 24 часа производят обработку инфицированной раны 3% раствором перекиси водорода, иссечение нежизнеспособных, инфицированных краев и дна раны, остановку кровотечения и наложение первичных узловых швов. Заранее подготовленные навески пептида Gly-His-Lys-D-Ala растворяют в изотоническом растворе хлорида натрия и разводят до получения необходимой дозы 0,5 мкг/кг массы тела. Экспериментальному животному после наложения швов пептид вводят парентерально внутрикожно в дозе 0,5 мкг/кг массы тела в объеме 0,1 мл один раз в сутки, с интервалом в 24 часа между инъекциями в течение 10 дней.

Пример конкретного использования

Эксперимент in vivo проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 180-220 г. Для исследования отбирались животные без внешних признаков заболевания, прошедшие карантин в виварии КГМУ. Все животные содержались на стандартном пищевом рационе в свободном доступе, при температуре воздуха в помещении 22-24С°, световом режиме: 12 часов - свет, 12 часов - темнота. Исследования проводили с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и в соответствии с решением регионального этического комитета.

Объектами исследования являлись кровь и раневые биоптаты. Раневой процесс моделировали в условиях внутрибрюшинного этанолового наркоза согласно методике Хотинян В.Ф. (1984 г.) нанесением на холке послойной раны стандартного размера (1,5×1,5 см). Спустя 24 часа после моделирования инфицированной раны проводили обработку раны 3% раствором перекиси водорода, иссекали нежизнеспособные, инфицированные края и дно раны, удаляли инородные частицы, осуществляли остановку кровотечения и накладывали первичные узловые швы. Далее животным однократно в сутки в течение 10 дней вводили внутрикожно параллельно шву на расстоянии 0,1 мм от него с каждой стороны предварительно растворенный в физиологическом растворе пептид Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг массы тела в суммарном объеме 0,1 мл. Ежедневно места введения препаратов меняли. В контрольной группе животным после аналогичной предварительной обработки раны вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме (0,1 мл) также в течение 10 суток.

Сразу после моделирования раневого процесса, а также на 1-е, 3-и, 7-е, 10-е, 20-е и 30-е сутки раны фотографировали цифровой камерой Sony DSC-W210 с применением сантиметровой линейки. Животных выводили из эксперимента на 3-и, 7-е, 10-е и 30-е сутки. При этом осуществляли забор крови из полости сердца для исследования биохимических показателей, показателей систем перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты организма, фагоцитарной активности нейтрофилов и кислородзависимых механизмов антиинфекционной защиты.

Достоверность полученных результатов определяли с использованием t-критерия Стьюдента.

Таблица 1.

Динамика изменения биохимических показателей крови животных при введении пептида Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг (M±m, n=10) после первичной хирургической обработки инфицированной раны (через 24 ч с наложением швов)

Группа/сутки	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	30-е сутки
АСТ, ЕД/л				
Контроль	308,4±7,8	248,7±7,8	241,3±7,7	166,4±5,0
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	186,9±5,0***	172,8±6,6***	151,2±3,5***	177,0±5,0
АЛТ, ЕД/л				
Контроль	39,2±0,9	102,8±3,2	69,1±1,7	97,8±5,4
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	52,3±1,5***	78,3±2,6***	45,2±3,6***	73,0±1,9***
МДА, мкмоль/л				
Контроль	3,46±0,15	4,26±0,18	2,71±0,08	2,85±0,09
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	1,68±0,07***	1,53±0,06***	1,31±0,03***	1,35±0,05***
АГП, усл. ед.				
Контроль	0,80±0,06	0,88±0,09	0,46±0,02	1,01±0,05
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	0,45±0,04***	0,43±0,03***	0,29±0,02***	0,34±0,03***

Примечание: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 в сравнении с контрольной группой.

Таблица 2.

Динамика изменения показателей фагоцитоза в крови животных при введении пептида Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг (M±m, n=10) после первичной хирургической обработки инфицированной раны (через 24 ч с наложением швов)

Группа/сутки	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	30-е сутки
Фагоцитоз (ФИ), %				
Контроль	53,2±1,4	63,6±1,5	62,8±0,6	67,7±1,5
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	59,8±1,0**	62,4±1,2	67,3±1,1**	65,1±1,4
ФЧ, в 1 фаг.				
Контроль	4,23±0,32	4,86±0,17	5,10±0,22	6,23±0,19
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	6,37±0,24***	5,37±0,25	5,83±0,16*	5,87±0,22
Завершенность фагоцитоза, %				
Контроль	67,6±1,5	67,3±2,1	67,9±1,0	65,5±1,8
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	72,2±1,7	69,7±1,0	70,5±1,0	68,7±0,8
Индекс активности фагоцитов				
Контроль	2,254±0,187	3,097±0,142	3,203±0,141	4,223±0,160
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	3,795±0,115***	3,336±0,145	3,934±0,149**	3,821±0,169
НСТ спонтанный				
Контроль	0,169±0,009	0,188±0,006	0,214±0,004	0,206±0,004
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	0,260±0,008***	0,251±0,005***	0,241±0,008**	0,260±0,010***
НСТ стимулированный				
Контроль	0,181±0,008	0,218±0,005	0,232±0,004	0,263±0,011
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	0,284±0,006***	0,297±0,004***	0,281±0,009***	0,281±0,013
Функциональный резерв нейтрофилов				

Контроль	0,012±0,003	0,030±0,005	0,018±0,002	0,057±0,012
Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	0,024±0,006	0,046±0,006	0,039±0,008*	0,021±0,007*

Примечание: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 в сравнении с контрольной группой.

Таблица № 3.

Динамика изменения морфометрических показателей при гистологическом изучении при введении пептида Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг (M±m, n=10) после первичной хирургической обработки инфицированной раны (через 24 ч с наложением швов)

Показатель	Группа/сутки	3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки	30-е сутки
Клетки фибробластического ряда, %	Контроль	14,41±0,31	17,72±0,79	21,08±0,53	26,5±1,2
	Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	15,22±0,47	20,04±0,75 *	27,54±1,03 ***	36,46±1,18 ***
Макрофаги, %	Контроль	24,77±2,43	35,52±1,0	35,23±3,86	41,19±1,41
	Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	29,18±2,47	34,57±2,87	31,06±1,69	32,55±1,11 ***
Гранулоциты, %	Контроль	34,15±2,21	22,86±2,31	17,89±1,04	14,59±0,24
	Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	25,21±2,45 *	21,74±2,69	16,62±1,63	9,99±1,07** **
Лимфоциты, %	Контроль	26,75±1,72	23,97±1,69	25,8±2,75	18,21±1,17
	Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	30,78±3,09	23,65±1,62	25,25±1,8	21,0±1,56
Клеточный индекс, %	Контроль	66,7±6,73	115,39±5,93	141,4±16,95	210,74±12,02
	Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг	84,2±10,46	129,37±15,0	145,93±12,5	228,43±15,38

Примечание: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, результаты выполненных экспериментальных исследований говорят о том, что при первичной хирургической обработке инфицированной раны с наложением первичных швов парентеральное (внутрикожное) введение пептида Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг стимулирует заживление инфицированных ран кожи и мягких тканей. Данный способ основан на использовании аналога регуляторного пептида Gly-His-Lys, а именно Gly-His-Lys-D-Ala, принадлежащего к классу биологически активных веществ, известных выраженным модуляторным действием и полифункциональностью, не является трудоемким и не требует применения сложного оборудования.

(57) Формула изобретения

Способ первичной хирургической обработки инфицированных ран кожи и мягких тканей, включающий моделирование инфицированной раны кожи и мягких тканей у экспериментального животного, обработку полученной раны через 24 часа 3% раствором перекиси водорода, иссечение нежизнеспособных инфицированных краев и дна раны, остановку кровотечения и наложение первичных узловых швов, отличающийся тем, что после их наложения парентерально внутрикожно вводят параллельно шву на расстоянии 0,1 см от него с каждой стороны растворенный в физиологическом растворе хлорида натрия пептид Gly-His-Lys-D-Ala в дозе 0,5 мкг/кг массы тела один раз в сутки в эквимолярных дозах в течение 10 дней.