



(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013106330/14, 13.02.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 13.02.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.02.2013

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2444569 C1, 10.03.2012. RU 2392000 C1, 20.06.2010. RU 2347583 C1, 27.02.2009. US 20120294830 A1, 22.11.2012. CN 101785793 A, 28.07.2010. ДЫГАЙ А.М. и др. Регуляция функций прогениторных клеток с помощью гиалуронидазы. // Вестник РАМН. - 2009. - N11. - С.6-9. ЭПШТЕЙН О.И. и др. Механизмы гепатопротекторного эффекта препарата сверхмалых доз антител (см. прод.)

Адрес для переписки:

634028, г.Томск, пр. Ленина, 3, ФГБУ "НИИ фармакологии" СО РАМН, Патентовед Н.Л. Малюгина

(72) Автор(ы):

ДЫГАЙ АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ (RU),
ЗЮЗЬКОВ ГЛЕБ НИКОЛАЕВИЧ (RU),
ЧУРИН АЛЕКСЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ (RU),
ЖДАНОВ ВАДИМ ВАДИМОВИЧ (RU),
УДУТ ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА (RU),
МИРОШНИЧЕНКО ЛАРИСА АРКАДЬЕВНА (RU),
СИМАНИНА ЕЛЕНА ВЛАДИСЛАВНА (RU),
ЧАЙКОВСКИЙ АЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЕВИЧ (RU),
АРТАМОНОВ АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ (RU),
БЕКАРЕВ АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ (RU),
МАДОНОВ ПАВЕЛ ГЕННАДЬЕВИЧ (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт фармакологии" Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (ФГБУ "НИИ фармакологии" СО РАМН) (RU)

(54) СПОСОБ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ГЕПАТИТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к фармакологии и гепатологии, и касается терапии гепатитов, изучаемой в эксперименте. Для этого у лабораторных животных (крыс) моделируют вирусный гепатит с помощью D-галактозамина. Лечение гепатита проводят путем однократного перорального введения иммобилизированной гиалуронидазы в дозе 25 ЕД/кг. Введение осуществляют перед

моделированием, либо одновременно с началом моделирования. Способ позволяет эффективно снижать тяжесть метаболических и морфологических нарушений печени при моделировании гепатита, идентичного вирусному гепатиту у человека, на фоне снижения ксенобиотической нагрузки на организм. 1 пр., 3 табл.

(56) (продолжение):

к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору. // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2005. - N4. - С.194-198. GEORGE J. et al. Serum hyaluronan and hyaluronidase: very early markers of toxic liver injury. Clin. Chim. Acta. 2004 Oct; 348 (1-2): 189-97. ISMAN FK et al., Evaluation

RU 2 522 942 C1

RU 2 522 942 C1

R U 2 5 2 2 9 4 2 C 1

1 C 2 4 6 2 2 5 2 R U



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G09B 23/28 (2006.01)*A61K* 38/47 (2006.01)*A61P* 1/16 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013106330/14, 13.02.2013

(24) Effective date for property rights:
13.02.2013

Priority:

(22) Date of filing: 13.02.2013

(45) Date of publication: 20.07.2014 Bull. № 20

Mail address:

634028, g.Tomsk, pr. Lenina, 3, FGBU "NII
farmakologii" SO RAMN, Patentoved N.L.
Maljugina

(72) Inventor(s):

**DYGAJ ALEKSANDR MIKHAILOVICH (RU),
ZJuZ'KOV GLEB NIKOLAEVICH (RU),
ChURIN ALEKSEJ ALEKSANDROVICH
(RU),
ZhdANOV VADIM VADIMOVICH (RU),
UDUT ELENA VLADIMIROVNA (RU),
MIROShNICHENKO LARISA ARKADE'VN
(RU),
SIMANINA ELENA VLADISLAVNA (RU),
ChAJKOVSKIJ ALEKSANDR VASIL'EVICH
(RU),
ARTAMONOV ANDREJ VLADIMIROVICH
(RU),
BEKAREV ANDREJ ALEKSANDROVICH
(RU),
MADONOV PAVEL GENNAD'EVICH (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie "Nauchno-issledovatel'skij institut
farmakologii" Sibirskogo otdelenija Rossijskoj
akademii meditsinskikh nauk (FGBU "NII
farmakologii" SO RAMN) (RU)**

(54) **METHOD FOR EXPERIMENTAL THERAPY OF HEPATITIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: viral hepatitis in simulated in laboratory animals (rats) with D-galactosamine. Hepatitis is treated by single oral administration of immobilised hyaluronidase 25 unit/kg. Administration either precedes simulation, or is combined with the beginning of stimulation.

EFFECT: method enables reducing a severity of metabolic and morphological hepatic disorders effectively in stimulating hepatitis identical to viral hepatitis in a human with underlying reduced xenobiotic load on the body.

1 ex, 3 tbl

C 1
2 5 2 2 9 4 2
R U

R U
2 5 2 2 9 4 2
C 1

Изобретение относится к области медицины, конкретно к фармакологии и гепатологии, и касается способа терапии гепатитов.

Для лечения заболеваний печени используется большое количество медикаментозных и немедикаментозных способов [1, 2].

5 Известен способ экспериментальной терапии хронического гепатита, вызванного введением тетрахлоруглерода с помощью двукратного или курсового введения иммобилизированной гиалуронидазы [3]. Данный способ является наиболее близким к заявляемому и выбран в качестве прототипа.

10 Недостатком способа прототипа является его недостаточная эффективность, относительно высокая ксенобиотическая нагрузка на организм и ограниченная хроническим течением патологического процесса и его токсической этиологией область применения.

Задачей, решаемой данным изобретением, является повышение эффективности и безопасности способа, а также расширение показаний к его применению.

15 Поставленная задача достигается техническим решением, заключающимся в однократном пероральном введении лабораторным животным (крысы) иммобилизированной гиалуронидазы в дозе 25 ЕД/кг при моделировании вирусного гепатита с помощью D-галактозамина.

20 Новым в предлагаемом изобретении является однократное использование иммобилизированной гиалуронидазы в дозе 25 ЕД/кг при моделировании гепатита.

Заболевания печени и желчевыводящих путей являются весьма распространенными во всем мире и занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости и смертности населения нашей страны. Опасность для здоровья и социальная значимость данной патологии печени определяют необходимость постоянной разработки новых
25 эффективных патогенетически обоснованных методов фармакологической терапии и профилактики данных заболеваний [1, 2]. При этом в последнее время активно ведутся исследования, направленные на разработку средств для лечения различных заболеваний, в том числе заболеваний печени, путем фармакологической стимуляции эндогенных стволовых клеток (СК) организма [4, 5]. На модели хронического гепатита, вызванного
30 курсовым введением тетрахлоруглерода, показано наличие гепатопротекторных свойств у иммобилизированной гиалуронидазы [3], определяемых ее стимулирующим действием на стволовые клетки печени и ткани-депо. При этом оптимальный технический результат достигается лишь при курсовом введении данного средства в дозах 25-50 ЕД/кг, безусловно, сопровождающемся значительной ксенобиотической нагрузкой на организм
35 [6], и исключительно после моделирования патологии печени. Кроме того, до настоящего времени не существует данных о наличии гепатопротекторных эффектов у иммобилизированной гиалуронидазы на других моделях патологии печени, в том числе заболеваниях вирусной этиологии.

Факт однократного применения иммобилизированной гиалуронидазы перед
40 моделированием или одновременно с началом моделирования вирусного гепатита с помощью D-галактозамина для достижения выраженных терапевтических эффектов для специалиста является неочевидным. Эксперимент показал непредсказуемые результаты.

45 Заявляемые существенные признаки проявили в совокупности новые свойства, не вытекающие явным образом из уровня техники в данной области. Новые признаки позволяют осуществлять эффективную терапию острого экспериментального поражения печени, моделирующего заболевание вирусной этиологии, и предлагаемое изобретение может быть использовано в медицине. Идентичной совокупности признаков не

обнаружено при исследовании уровня техники по патентной и научно-медицинской литературе.

Исходя из вышеизложенного, следует считать заявляемое техническое решение соответствующим критериям: «Новизна», «Изобретательский уровень», «Промышленная применимость».

Способ осуществляют следующим образом:

Лабораторному животному (крысе) перед моделированием либо одновременно с началом моделирования вирусного гепатита с помощью D-галактозамина однократно перорально вводят иммобилизованную гиалуронидазу в дозе 25 ЕД/кг.

Предлагаемый способ был изучен в экспериментах на беспородных крысах в количестве 46 штук, массой 250-300 г. Животные получены из питомника отдела экспериментального биомедицинского моделирования ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН (сертификат имеется). Для моделирования острого гепатита использовали D-галактозамин в водном растворе (Галактозамин гидрохлорид, Applichem, кат.№А6859), который вызывает острый гепатит, идентичный по морфологическим и биохимическим изменениям в печени вирусному гепатиту человека. Для этого крысам вводили D-галактозамин в дозе 300 мг/кг внутривенно в течение 3 дней [7].

У крыс: рассчитывали весовой коэффициент печени (отношение массы органа к массе животного), показатель, определяемый для интегральной оценки наличия гепатотропного влияния ксенобиотиков; проводили биохимические исследования содержания в сыворотки крови аспартат-, аланин-аминотрансфераз (АсАТ, АлАТ), билирубина, активность щелочной фосфатазы (ЩФ); и морфологическое исследование печени [7]. Активность ферментов сыворотки крови определяли по общепринятым методам, используя полуавтоматический биохимический анализатор фирмы Cormay и стандартные наборы фирм Cormay и «Витал Диагностик» (г.Санкт-Петербург). Кровь для исследования получали через катетер, имплантированный в бедренную артерию с последующей перевязкой сосудов. На гистологических препаратах печени, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали количество гепатоцитов в состоянии некроза и фигур митозов на 1000 печеночных клеток. С помощью окулярной сетки Г.Г.

Автандилова определяли относительную площадь инфильтрации печеночной паренхимы макрофагами и лейкоцитами и относительную площадь коллагеновых волокон. Для выявления РНК препараты печени окрашивали галлоцианином по Эйнарсону. Гликоген выявляли с помощью Шифф-йодной реакции по J. Mc.Manus. Количественное определение содержания в клетке указанных веществ проводили на сканирующем цитофотометре UNIVAR ("REICHERT-JUNG", Австрия) при длине волны 500 нм, фильтре №42, зондах диаметром 2 (РНК) и 3 (гликоген) мкм. У каждого животного измеряли содержание РНК и гликогена в 50 гепатоцитах. Для выявления липидов готовили криостатные срезы печени толщиной 10 мкм. Срезы фиксировали 4% кальций-формолом и окрашивали Суданом черным В. Степень жировой дистрофии оценивали в баллах [7]. Обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Использовалась программа Statistica 6.0.

Пример 1.

В первый день эксперимента, обозначенный как «день 1», начинали вводить D-галактозамин, общий период наблюдения составлял 4 сут. Иммобилизованную гиалуронидазу (имГД) (ООО «Саентифик фьючер менеджмент», г.Новосибирск), представляющую собой высокоочищенную тестикулярную бычью гиалуронат-эндо-P-N-ацетилгексозаминидазу, вводили перорально по трем схемам. Первая схема

предполагала введение лекарственного средства по способу прототипу: в виде курсового двукратного введения на 1 и 2 дни после введения D-галактозамина в дозе 35 ЕД/кг (доза и режим введения были определены в предварительных экспериментах как максимально эффективные). Вторая схема предполагала однократное введение

5 иммобилизированной гиалуронидазы после первого введения D-галактозамина в дозе 25 ЕД/кг. Третья схема предполагала введение имГД на нулевой день перед началом моделирования острого гепатита. Контрольным животным по той же схеме в эквивалентном объеме вводили дистиллированную воду.

Группы животных:

10 1) Интактные животные. Группа 1.

2) Контрольные животные, введение D-галактозамина. Группа 2.

3) Группа с курсовым двукратным введением лекарственного средства на 1 и 2 дни после введения D-галактозамина. Группа 3.

4) Группа с однократным введением лекарственного средства в 1 день введения D-

15 галактозамина. Группа 4.

5) Группа с предварительным введением лекарственного средства на 0 день перед введением D-галактозамина. Группа 5.

При морфологическом исследовании печени крыс с острым поражением печени D-галактозамином, получавших дистиллированную воду, было обнаружено нарушение

20 балочного строения. Преобладала гидропическая (белковая) дистрофия гепатоцитов. Встречалось большое количество гепатоцитов в состоянии апоптоза различной степени выраженности от деградации ДНК до образования «классических» телец Каунсильмена, которые у человека считаются непрямыми маркерами вирусного гепатита [Серов В.В., Лапиш К., 1989]. Портальная и внутридольковая строма была диффузно

25 инфильтрирована лимфоцитами и макрофагами с примесью нейтрофильных лейкоцитов.

Со стороны морфометрических параметров в группе 3 не выявлялось значимых отличий с группой острого гепатита, вызванного введением D-галактозамина (табл.1). В то же время в группах 4 и 5 отмечалось снижение количества апоптозных гепатоцитов, что сопровождалось снижением степени жировой инфильтрации печени в виде

30 статистически не значимой тенденции.

Вместе с тем у крыс через 3 дня после начала введения D-галактозамином отмечалось повышение коэффициента массы печени. В сыворотке крови статистически значимо возрастала активность АлТ и АсТ, содержание билирубина, а также имела тенденция к увеличению активности щелочной фосфатазы (табл.2). Необходимо отметить также

35 у крыс этой группы увеличение времени тиопенталового сна, вероятно, в связи с ингибированием ферментных систем гепатоцитов, ответственных за антиоксическую функцию печени (табл.3).

При введении иммобилизированной гиалуронидазы на фоне острого D-галактозаминового гепатита весовой коэффициент печени в третьей группе животных

40 превосходил соответствующий показатель первой группы ($52,1 \pm 2,4$ против $44,9 \pm 1,9$), что было близко к соответствующему значению группы животных с гепатитом без фармакологической коррекции ($57,9 \pm 1,8$). В группах 4 и 5 изученный параметр не отличался от соответствующего значения группы «интактные животные» (группа 1). Наблюдалась также нормализация активности АлТ в группах 3, 4 и 5, АсТ - в группах

45 4 и 5. Время тиопенталового сна уменьшалось по сравнению с контролем (гепатит) в группе 4 и 5. В группах 3 данный показатель хоть и снижался по сравнению с контролем, но не достигал статистической значимости (табл.3).

Таким образом, иммобилизованная гиалуронидаза в условиях интоксикации D-

галактозамином обладала максимально выраженным гепатопротекторным действием при ее однократном введении в самой низкой используемой дозе (25 ЕД/кг) после моделирования патологического процесса либо одновременно с началом моделирования гепатита.

5 Предлагаемый способ позволяет эффективно снижать тяжесть метаболических и морфологических нарушений печени при ее остром поражении, моделирующем вирусный гепатит, на фоне снижения ксенобиотической нагрузки на организм.

Цитируемая литература

1. Венгеровский А.И. Эффективность и механизм действия гепатопротекторов при экспериментальном токсическом повреждении печени: Дисс... доктора мед. наук. - Томск, 1991. - С.4-57.

2. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2-х томах. Т. 1. - М.: Медицина, 1996. - 624 с.

3. Патент (RU) на изобретение №2444569 «Гепатопротекторное средство» (опубл. 10.03.2012, Бюл. №7). Авторы: Артамонов А.В., Бекарев А.А., Дыгай А.М., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н., Удут В.В.

4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Гипоксия и система крови. - Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. - 142 с.

5. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Клеточная терапия: новые подходы // Наука в России - Москва: Изд-во «Наука», 2009. - Том. 169. - №1. С.4-8.

6. Зборовский А.Б., Тюренков И.Н. Осложнения фармакотерапии. - М.: Медицина, 2003.-543 с.

7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева - 2-изд., перераб. и доп.- М., ОАО «Издательство «Медицина», 2005. - 832 с.

Таблица 1

Влияние иммобилизированной гиалуронидазы на морфометрические показатели печени крыс с острым поражением печени D-галактозамином, ($\bar{X} \pm m$)

Группа животных	Степень жировой инфильтрации, баллы	Количество апоптозных гепа-тоцитов, %	Относительная площадь инфильтрации, %	Митотический индекс, %	РНК усл. ед. опт.плотн.	Гликоген усл. ед. опт.плотн.
2	3,00±0,45	10,14±0,8*	9,00±0,71	0,20±0,04	0,16±0,01	0,21±0,01
3	2,44±0,17	10,06±0,75*	8,60±1,08	0,24±0,07	0,16±0,01	0,22±0,01
4	2,16±0,12	2,04±0,10#	8,60±0,51	0,38±0,08	0,16±0,01	0,22±0,01
5	2,08±0,10	3,76±0,10#	8,40±0,75	0,28±0,04	0,16±0,01	0,22±0,01

* - достоверность различий при сравнении с группой «интактные животные» (группа 1) при $p < 0,05$.

- достоверность различий при сравнении с группой 2 при $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние иммобилизированной гиалуронидазы на биохимические показатели сыворотки крови крыс с острым поражением печени D-галактозамином, ($\bar{X} \pm m$)

Группа животных	Весовой коэффициент печени	АсТ (мккат/л)	АлТ (мккат/л)	Коэффициент Де Ритиса	Щелочная фосфатаза (Е/л)	Общий билирубин (мкмоль/л)
1	44,9±1,9	0,51±0,02	0,52±0,02	0,99±0,04	136,8±16,0	4,50±1,06
2	57,9±1,8*	0,61±0,03*	0,72±0,04*	0,88±0,09	170,5±23,7	9,86±1,34*
3	52,1±2,4*	0,54±0,03	0,60±0,03 *	0,90±0,04	146,5±20,2	7,62±1,32
4	48,3±2,7	0,48±0,02#	0,51±0,04#	0,95±0,08	162,4±11,4	4,50±0,70

5	49,5±3,1	0,53±0,03#	0,57±0,03#	0,99±0,06	165,6±12,5	5,97±0,84
---	----------	------------	------------	-----------	------------	-----------

* - достоверность различий при сравнении с группой «интактные животные» (группа 1) при $p < 0,05$.

- достоверность различий при сравнении с группой 2 при $p \leq 0,05$.

5

Таблица 3 Влияние иммобилизированной гиалуронидазы на время тиопенталового сна крыс с острым поражением печени D-галактозамином (мин, X±ш)				
Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
44,50±1,34	57,90±3,68*	51,70±2,50*	49,00±1,46*#	51,60±1,93*#

10

* - достоверность различий при сравнении с группой «интактные животные» (группа 1) при $p \leq 0,05$.

- достоверность различий при сравнении с группой 2 при $p \leq 0,05$.

Формула изобретения

15

Способ терапии острого гепатита, индуцированного в эксперименте введением D-галактозамина, путем однократного перорального введения животному иммобилизированной гиалуронидазы в дозе 25 ЕД/кг перед моделированием, либо одновременно с началом моделирования.

20

25

30

35

40

45