



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/722 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008119155/15, 21.07.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.07.2008

(45) Опубликовано: 10.09.2009 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2080872 C1, 10.06.1997. RU 2247555 C1,
10.03.2005. WO 2004037180 A2, 06.05.2004.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100-летия
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Стоник Валентин Аронович (RU),
Попов Александр Михайлович (RU),
Гафуров Юрий Михайлович (RU),
Московкина Таисия Васильевна (RU),
Каминский Владимир Абрамович (RU),
Качанов Андрей Викторович (RU),
Кривошапка Ольга Николаевна (RU),
Петровичева Светлана Евгеньевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения
Российской академии наук (ТИБОХ ДВО
РАН) (RU),
Федеральное агентство по образованию
Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "Дальневосточный
Государственный Университет" (ДВГУ) (RU)

(54) ГЕЛЕВАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ОБЛАДАЮЩАЯ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИМ,
ПРОТИВООЖГОВЫМ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ, ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫМ,
ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИМ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ДЕЙСТВИЕМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и ветеринарии. Гелевая композиция содержит трипантрин, хитозан и дистиллированную воду при следующем соотношении ингредиентов, г/л геля: трипантрин 1,5-2,5; хитозан 15,0-25,0; дистиллированная вода - остальное. Технический результат заключается в расширении спектра биологического действия композиции. Заявляемая композиция

обладает ранозаживляющим, противовоспалительным, гепатопротекторным, противодиабетическим и противоопухолевым действием, нетоксична, обеспечивает повышение биодоступности трипантрина, а следовательно, усиление физиологического действия трипантрина за счет перевода его в биоусвояемую водно-гелевую форму. 6 табл., 4 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 9/00 (2006.01)*A61K 31/519* (2006.01)*A61K 31/722* (2006.01)*A61P 1/16* (2006.01)*A61P 3/10* (2006.01)*A61P 17/02* (2006.01)*A61P 29/00* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2008119155/15, 21.07.2008**(24) Effective date for property rights:
21.07.2008(45) Date of publication: **10.09.2009 Bull. 25**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Stonik Valentin Aronovich (RU),
Popov Aleksandr Mikhajlovich (RU),
Gafurov Jurij Mikhajlovich (RU),
Moskovkina Taisija Vasil'evna (RU),
Kaminskij Vladimir Abramovich (RU),
Kachanov Andrej Viktorovich (RU),
Krivoshapko Ol'ga Nikolaevna (RU),
Petrovicheva Svetlana Evgen'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU),
Federal'noe agentstvo po obrazovaniju
Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovanija
"Dal'nevostochnyj Gosudarstvennyj Universitet"
(DVGU) (RU)**

(54) GEL COMPOSITION OF WOUND HEALING, BURN-TREATING, ANTI-INFLAMMATORY, HEPATOPROTECTIVE, ANTIDIABETIC AND ANTINEOPLASTIC ACTION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns medicine and veterinary science. Said gel composition contains triptantrin, chitosan and distilled water in the ration as follows, g/l of gel: triptantrin 1.5-2.5; chitosan 15.0-25.0; distilled water - the rest.

EFFECT: extended biological action spectrum of

the composition, declared composition possesses wound healing, burn-treating, anti-inflammatory, hepatoprotective, antidiabetic and antineoplastic action; it is not toxic, provides higher bioavailability of triptantrin and hence, intensified physiological action thereof when transformed into bioavailable water-gel formulation.

6 tbl, 7 ex, 4 dwg

Изобретение относится к медицине и ветеринарии и касается создания лекарственных средств на основе алкалоида триптантрина (коуропитина), обладающих широким спектром действия, которые могут найти применение для лечения и профилактики различных заболеваний человека и животных.

5 Организации и фирмы многих развитых стран мира, включая крупные фармацевтические фирмы Европы, университеты Германии, медицинские подразделения армии США, проявляют интерес к проблемам использования триптантрина в медицине в качестве перспективного противовоспалительного, антимикробного, антипаразитарного и противотуберкулезного препарата.

10 Триптантрин был выделен в качестве природного антибиотика из дрожжевидных грибов *Candida lyrolitica*, затем как новый хиназолиновый алкалоид - из целого ряда высших растений, а сравнительно недавно был найден в морских бактериях. Кроме того, был разработан целый ряд синтезов этого природного физиологически
15 активного соединения, включая одностадийный синтез из изатина (Московкина Т.В. Новый синтез 6,12-дигидро-6,12-диоксоиндола[2.1-b]хиназолина (триптантрина, коуропитина) // Журнал органической химии, 1997. Т.33 С.138-139).

20 Триптантрин является специфическим ингибитором циклоксигеназы COX-2 (в дозе 1.5 мкМ подавляет ее активность на 50%) и 5-липоксигеназы (5-LOX)-ферментов, экспрессия которых резко возрастает в период развития воспалительных процессов. В зависимости от используемой концентрации он ингибирует продукцию макрофагами как NO, так и простагландина E₂ (Ishihara T., Kohno K., Ushio S., Iwaki k., Ikeda M., Kurimoto M. Tryptanthrin inhibits nitric oxide and prostaglandin E(2) synthesis by murine
25 macrophages // Eur. J. Pharmacol., 2000; 407, 197-204). Он подавляет также продукцию фактора роста гепатоцитов (HGF), ростового фактора, который принимает участие в злокачественной трансформации клеток, а также в росте, инвазии и метастазировании опухолевых клеток (Motoki T, Tukumi Y, Yagi Y, Ten A, Yumumoto I, Gohda E. Inhibition of
30 hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by tryptanthrin // Biol Pharm Bull. 2005; 28(2); 260-266). Триптантрин (коуропитин) обладает высокой специфичностью при действии на возбудители различных грибковых, микробных, включая *Helicobacter pylori*, и протозойных инфекций (Hondo G., Tabata M., Tsuda M., The antimicrobial specificity of tryptanthrin // Planta Med. 1979; 37, 172-174; Scovill J, Blank E, Konnick M, Nenortas E, Shupiro T. Antimicrob Agents Chemother. 2002. V.46 (3). P.882-883).
35 Он действует также на человеческие лейкемические клетки *in vitro*, в высоких концентрациях вызывая их гибель по пути апоптоза в течение 48 ч после обработки (Kimoto T., Hino K., et. al. Cell differentiation and apoptosis of monocytic and promyelocytic leukemia cells (U-937 and HL-60) by tryptanthrin, an active ingredient of
40 *Polygonum tinctorium* Lour // Pathol. Int. 2001. V.51. P.315-25). Это вещество обладает антиканцерогенной активностью: при его пероральном введении в дозе 50 мг/кг уменьшается количество случаев рака кишечника, индуцированного азоксиметаном у крыс (Koya-Miyata S., Kimoto T., et. al. Prevention of azoxymethane-induced intestinal tumors
45 by a crude ethyl acetate-extract and tryptanthrin extracted from *Polygonum tinctorium* Lour // Anticancer Res., 2001; 21, 3295-300).

Известно о проявлении триптантрином противоаллергических свойств (JP 2006241080, 2006.09.14).

50 Недостатком триптантрина является его плохая биодоступность, связанная с низкой растворимостью в воде. Делаются попытки улучшить его растворимость в воде и биодоступность, как за счет химических модификаций, так и при использовании в составе композиций, включающих, например, тритерпены и липиды. Последнее

направление представляется особенно важным, что и подтверждает патентование некоторых созданных новых композиций.

Известна иммуностимулирующая композиция, которая включает, триптантрин или его производные, а также вещества или экстракты из шишек хмеля и розмарина, в том числе разнообразные тритерпены, дитерпеновые лактоны и их конъюгированные производные (WO 2004037180, 2004.05.06).

В патенте (US 2007184133, 2007.08.09) указывается на механизм иммуностимулирующего эффекта такой синергетической композиции, связанной с ингибированием COX-2 и синтеза простагландинов, в частности простагландина E₂.

Активность растительных экстрактов, содержащих триптантрин, часто выше, чем индивидуального соединения, вероятно, из-за большей растворимости последнего в присутствии посторонних веществ и синергетических эффектов. Однако такие экстракты трудно стандартизировать, а достигнутое повышение биологической активности триптантрина в их составе, часто является статистически недостоверным (Heinemann C, et. al. Prevention of experimentally induced irritant contact dermatitis by extracts of *Isatis tinctoria* compared to pure tryptanthrin and its impact on UVB-induced erythema // *Planta Med.* 2004. V.70 (5). P.385-390).

Задача изобретения - создание биодоступной композиции на основе триптантрина, обладающей широким спектром биологического действия.

Задача решена созданием гелевой композиции, обладающей ранозаживляющим, противоожоговым, противовоспалительным, гепатопротекторным, противодиабетическим и противоопухолевым действием, характеризующейся тем, что она содержит триптантрин, хитозан и дистиллированную воду при следующем соотношении ингредиентов, г/л геля:

| | |
|-----------------------|-----------|
| Триптантрин | 1,5-2,5 |
| Хитозан | 15,0-25,0 |
| Дистиллированная вода | остальное |

Новая композиция получила название «коурохитин».

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в расширении спектра биологического действия композиции по сравнению с известной композицией, обладающей иммуностимулирующей активностью. Заявляемая композиция обладает ранозаживляющим, противоожоговым, противовоспалительным, гепатопротекторным, противодиабетическим и противоопухолевым действием.

Технический результат заключается также в повышении биодоступности триптантрина, а следовательно, в усилении физиологического действия триптантрина за счет перевода его в биоусвояемую водно-гелевую форму. Изобретение расширяет арсенал средств на основе триптантрина.

Для приготовления заявляемой композиции используют коммерческий препарат хитозана с 80%-ной степенью дезацетилирования и молекулярной массой 100000 Да и триптантрин, полученный органическим синтезом.

Способ получения заявляемой композиции состоит в следующем.

Хитозан растворяют при перемешивании и при температуре 20°C в 3,0%-ном водном растворе уксусной кислоты в соотношении 1:20. В полученный раствор хитозана добавляют триптантрин в диметилсульфоксиде (ДМСО) из расчета на 1 г триптантрина в 100-160 мл ДМСО, а затем тщательно перемешивают. К полученной триптантрин-хитозановой смеси добавляют 0,3-нормальный раствор NaOH в объемном соотношении 1:(1,0-1,5); смесь перемешивают, гель хитозана с

триптантрином промывают дистиллированной водой до pH 5,5-6,0, а избыток жидкости отжимают. В полученный гель добавляют дистиллированную воду при объемном соотношении гель: дистиллированная вода 1:(1-3) и гомогенизируют его с использованием блендера при 20 тыс.об/мин в течение 1-3 мин. Избыток жидкости удаляют декантацией. В результате этой проведенной процедуры получают желтого цвета, содержащий хитозан, триптантрин и дистиллированную воду.

Электронно-микроскопическое исследование геля показало, что он состоит из частиц правильной формы размером 10-300 нм. В геле отсутствуют включения неправильной формы, что свидетельствует об отсутствии нерастворенного в воде триптантрина.

Содержание триптантрина из высушенной навески геля определяют методом ВЭЖХ путем его экстракции хлороформом.

Содержание ингредиентов гелевой композиции следующее, г/л геля: триптантрин 1,5-2,5; хитозан 15,0-25,0; дистиллированная вода - остальное.

Известно, что хитозан является продуктом щелочного омыления природного полисахарида хитина. Это вещество биосовместимо с тканями многих организмов, оно используется при производстве шовного материала для хирургии и при изготовлении контактных линз для офтальмологии, а также в качестве компоненты парфюмерно-косметических изделий и пищевых добавок (Хитин и хитозан.

Получение, свойства и применение. Наука, 2002). Водорастворимые формы хитина (соли с соляной, уксусной, янтарной и другими кислотами) легко образуют пленки, в особенности при нейтрализации их растворов. Такие пленки обеспечивают окклюзию раневой поверхности (закрытие раны), что уменьшает воспалительную реакцию и ускоряет биосинтез коллагена, необходимый для заживления ран и ожогов. (Levine R., Agren M., Mertz P. J. Cut. Med. Surg. 1998, V.2 P.193-198). Кроме того, хитозан обладает противомикробной активностью, стимулирует активацию макрофагов, усиливает пролиферацию клеток в ране и проявляет противовирусные свойства (Ueno H., Mori T., Fujinaga T. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2001, V.52. P.105-115). Хитозан проявляет в экспериментах на животных лечебное действие при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта (перитонитах, уремическом синдроме, воспалении поджелудочной железы) (Большаков И.Н. и другие в кн.: Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение, стр.280-301). В то же время многие типы лечебных эффектов хитозана являются сравнительно слабыми.

В результате создания гелевой формы триптантрина с хитозаном этот алкалоид становится биодоступным, усиливаются его основные фармакологические эффекты, возникает пролонгирующее действие.

На фиг.1 представлены результаты дозозависимой противовоспалительной активности коурохитина.

На фиг.2. показано влияние коурохитина на уровень трансаминаз плазмы крови экспериментальных животных при токсическом гепатите, вызванном введением CCl_4 .

На фиг.3. приведены данные по гипогликемической активности коурохитина отдельно и совместно с противодиабетическим средством «метформин» (МЕТ) на экспериментальной модели аллоксанового диабета.

На фиг.4 представлены результаты влияния коурохитина и метформина на уровень триглицеридов в плазме крови животных с аллоксановым диабетом.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Гелевая композиция, обладающая ранозаживляющим, противоожоговым, противовоспалительным, гепатопротекторным,

противодиабетическим и противоопухолевым действием, содержит триптантрин, хитозан и дистиллированную воду при следующем соотношении ингредиентов, г/л геля:

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| 5 | Триптантрин | 1,5 |
| | Хитозан | 15,0 |
| | Дистиллированная вода | остальное |

Пример 2. Гелевая композиция, обладающая ранозаживляющим, противовоспалительным, гепатопротекторным, противодиабетическим и противоопухолевым действием, содержит триптантрин, хитозан и дистиллированную воду при следующем соотношении ингредиентов, г/л геля:

| | | |
|----|-----------------------|-----------|
| 15 | Триптантрин | 12,5 |
| | Хитозан | 25,0 |
| | Дистиллированная вода | остальное |

Пример 3. Исследование токсичности

Определение острой токсичности заявляемой композиции проводили на мышах линии СВА. Число животных в каждой группе составляло не менее 6. Анализ действия препарата оценивали в течение 24 ч. При определении острой токсичности заявляемого препарата его вводили однократно и многократно при пероральном маршруте введения. Максимальная доза препарата при пероральном введении составила 200 мг/кг. Таким образом, коурохитин в дозах до 200 мг/кг при пероральном введении не обладает острой токсичностью.

Хроническую токсичность коурохитина определяли на мышах линии CD-1 путем его ежедневного перорального введения в течение 15 дней. Контрольная группа получала такой же объем физиологического раствора. Общая продолжительность наблюдения за животными составляла не менее 1 мес. В конце эксперимента животных подвергали эвтаназии путем усыпления углекислым газом и брали пробы для биохимических и морфологических анализов.

Результаты биохимических исследований хронической токсичности коурохитина при пероральном введении представлены в таблице 1.

| Таблица 1 | | | | | | | |
|--|---------------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| Определение хронической токсичности коурохитина по клинко-диагностическим показателям ткани печени и плазмы крови экспериментальных животных | | | | | | | |
| N | Группы животных (количество животных) | ТБК-реактивные продукты, мкмоль/г ткани* | Диеновые конъюгаты мкмоль/г ткани | Билирубин, мкмоль/л | Белок, мг/100 мг ткани | АлАТ, мкмоль/л. час | АсАТ, мкмоль/л. час |
| 1 | Интактная группа (6) | 1,08±0,12 | 0,20±0,02 | 60,7±5,2 | 13,4±1,2 | 3,3±0,3 | 6,7±0,6 |
| 2 | Коурохитин (6) | 1,02±0,10 | 0,15±0,03 | 65,2±5,5 | 13,2±1,0 | 2,8±0,2 | 5,6±0,4 |

45 Примечание: концентрацию ТБК-реактивных продуктов рассчитывали исходя из молекулярного веса малонового диальдегида. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение (p<0,05).

Как можно видеть из данных, приведенных в таблице 1, длительное применение коурохитина per os в дозе 20 мг/кг в течение 15 дней не оказывает токсического эффекта на функциональную активность организма экспериментальных животных. Более того, зарегистрированные нами параметры перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность трансаминаз аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспартатаминотрансферазы (АсТ) в плазме крови говорят о том, что в опытной

группе указанные показатели имеют значения ниже, чем в контроле. Можно предположить, что наблюдаемый эффект связан с противовоспалительными свойствами коурохитина. Следует отметить также, что у животных, получавших этот гелевый препарат per os в течение 15 дней ежедневно, на протяжении всего эксперимента не было отмечено внешних проявлений токсичности. Индексы селезенки и тимуса остались в норме.

Пример 4. Противоожоговое и ранозаживляющее действие

Оценка ранозаживляющей активности коурохитина была проведена на мышах линии С₅₇BL/6, которым наносили термические и лоскутные раны согласно (Билич Г.Л., Колла И.Э. В кн.: Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в эксперименте и клинике. Горький (1978). С.10-20).

Коурохитин наносили на раны с помощью металлического шпателя в достаточном для полного покрытия раны. Краткий курс лечения заканчивался на пятый день после нанесения раневых поверхностей. В качестве препарата сравнения использовали 10%-ную метилурациловую мазь (Раны и раневая инфекция. Руководство для врачей (под редакцией Кузина М.И., Костюченко Б.М.). М.: «Медицина». 1990. - 592 с.).

При оценке течения раневого процесса большое значение имеет объективная классификация как стадии заживления, так и характера самой раны. При анализе раневого процесса мы придерживались классификации, предложенной Кузиным (Раны и раневая инфекция. Руководство для врачей /Под редакцией Кузина М.И., Костюченко Б.М. М.: Медицина. 1990. - 592 с.), согласно которой этот процесс можно разделить на три фазы: I - фаза воспаления, которая делится на период сосудистых изменений и период очищения раны от некротических (погибших) тканей; II фаза - регенерации, образования и созревания грануляционной ткани; III фаза - реорганизация рубца и эпителизация.

Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

| Сравнительная оценка действия исследуемых мазей на процесс заживления | | | | | |
|---|-----------------------------------|--------------------------|------------------|---------------|---------------|
| № п/п | Экспериментальные группы животных | Кол-во животных в группе | Режим применения | 7 день | 11 день |
| | | | | Заживление, % | Заживление, % |
| 1 | Контроль | 5 | - | 11,25±9,2 | 70,6±6,5 |
| 2 | Метилурациловая мазь | 5 | 4 дня | 47,5±7,9 | 85,5±6,2 |
| 3 | Коурохитин | 5 | 4 дня | 67,1±2,2 | 97,3±2,2 |

| Сравнительная оценка действия исследуемых мазей на заживление лоскутных ран | | | | | |
|---|-----------------------------------|--------------------------|------------------|---------------|---------------|
| № п/п | Экспериментальные группы животных | Кол-во животных в группе | Режим применения | 7 день | 9 день |
| | | | | Заживление, % | Заживление, % |
| 1 | Контроль | 5 | - | 77,8±1,4 | 84,8±0,7 |
| 2 | Метилурациловая мазь | 5 | 4 дня | 77,7±2,0 | 88,5±1,7 |
| 3 | Коурохитин | 5 | 4 дня | 94,2±1,0 | 100±0 |

Как показал эксперимент, эффективность ранозаживляющего действия коурохитина значительно выше, чем метилурациловой мази. При этом наиболее выраженная ранозаживляющая активность наблюдалась при лечебном применении заявляемого препарата, как на модели ожоговых, так и послойных лоскутных ран во II-ой фазе течения раневого процесса. После нанесения раны образование струпа в ранах у животных, которым накладывали аппликации коурохитин-геля, происходило заметно быстрее (уже на 4-ый день) по сравнению с метилурациловой мазью. В

дальнейшем, в группе животных, проходивших лечение коурохитин-гелем, мы также регистрировали четкое ускорение эпителизации раневой поверхности и восстановления кожного покрова.

Таким образом, заявляемая гелевая композиция характеризуется гораздо более выраженным ранозаживляющим эффектом, чем метилурациловая мазь. В результате проведенного исследования можно говорить о перспективности дальнейших исследований этого препарата в качестве потенциального ранозаживляющего средства.

Пример 5. Противовоспалительное действие

Неспецифическое локальное воспаление индуцировали введением 1 мг 8-каррагинана (тип IV, Sigma) в физрастворе (100 мкл) в подушечку задней лапы мышей линии CD-1 массой 20-22 г. Коурохитин вводили с помощью внутрижелудочного зонда перорально в дозах 20, 10 и 5 мг/кг веса за 1 ч до индукции воспаления каррагинаном. Контрольной группе животных вводили физраствор. Через 5 ч мышей подвергали эвтаназии, лапки отрезали по выступу кости ниже сочленения мало- и большеберцовой кости и выше пяточного сустава и взвешивали на аналитических весах. Процент прироста массы лапки, который носит название индекс реакции (ИР), определяли по формуле:

$$\text{ИР} = \left(\frac{\text{прирост веса лапы в контроле} - \text{прирост веса лапы в опыте}}{\text{прирост веса лапы в контроле}} \right) \times 100$$

Процент прироста массы лапки характеризует интенсивность воспалительной реакции. Как видно на фиг.1, введение препарата значительно уменьшает ($P < 0.05$) каррагинан-индуцируемый отек лапы в зависимости от дозы. Через 5 ч после инъекции каррагинана отек лапы в контроле составлял 72%. При применении коурохитина в дозе 20 мг/кг отек лапы уменьшался до 46%.

Таким образом, противовоспалительная активность изучаемого препарата в дозе 20 мг/кг сравнима с действием индометацина, который мы использовали в качестве положительного контроля в дозе 10 мг/кг.

Пример 6. Гепатопротекторное действие

Определение гепатопротекторных свойств коурохитина проведено на модели токсического гепатита, индуцированного четыреххлористым углеродом (беспатогенные мыши линии CD-1 весом 20 ± 2 г).

Профилактическое действие коурохитина изучено на 4 группах животных (по 6 особей в каждой группе). Опытной группе мышей вводили препарат в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней, а группе сравнения - препарат карсил в дозе 10 мг/кг в том же временном режиме. Две контрольные группы животных (интактные животные и отрицательный контроль) получали дистиллированную воду. Через 16 часов после последнего приема препаратов одной группе животных (отрицательный контроль), и группам животных, леченных заявляемым препаратом и леченных карсилом, вводили внутривенно смесь CCl_4 -растительное масло (1:1, по объему) в дозе 300 мкл на 100 г массы тела животного. Через 2 ч после интоксикации CCl_4 животных подвергали эвтаназии. Гепаринизированную кровь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15-20 мин.

Полученную плазму крови использовали для биохимических исследований. У всех животных извлекали печень, отмывали ее физиологическим раствором, помещали в ледяную среду, а затем использовали для оценки содержания ТБК-реактивных продуктов и диеновых конъюгатов (Тутельян В.А., Суханов Б.П., Австриевских А.Н., Позняковский В.М. Биологически активные добавки в питании человека (оценка

качества и безопасности, эффективность, характеристика, применение в профилактике и клинической медицине). Томск, Изд. НТЛ, 1999. - 296 с.). Уровень билирубина, ферментативные активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) определяли с применением

5 клинико-диагностических наборов (ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск). Содержание белка определяли по методу Лоури.

Исследования показали, что изменения в печени при токсическом гепатите сопровождались нарушением биохимических показателей, в частности возрастанием

10 содержания ТБК-реактивных продуктов, диеновых конъюгатов и снижением биосинтеза белка.

У животных с токсическим гепатитом количество ТБК-реактивных продуктов в печени увеличилось на 40,0%, содержание диеновых конъюгатов возросло на 80%, а концентрация белка снизилась на 26%, что свидетельствовало об усилении

15 интенсивности процессов перекисного окисления липидов и угнетении биосинтеза белка в печени. О развитии токсического гепатита и нарушении у подопытных нелеченых животных функций печени говорили значительное увеличение в плазме крови содержания билирубина (примерно в 3,2 раза) и возрастание ферментативной

20 активности аминотрансфераз (фиг.2). Протективное применение как заявляемой композиции коурохитин, так и гепатозащитного препарата карсил приближало эти показатели к нормальным, что можно рассматривать как значительный защитный эффект данных препаратов.

Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4

Влияние коурохитина на клинико-диагностические показатели ткани печени и плазмы крови экспериментальных животных при токсическом гепатите, вызванном введением CCl_4 .

| № | Группы животных | Интоксикация CCl_4 | ТБК-реактивные продукты, мкмоль/г ткани* | Диеновые конъюгаты, мкмоль/г ткани | Билирубин, мкмоль/л плазмы крови | Белок, мг/100 мг ткани |
|---|----------------------|----------------------|--|------------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| 1 | Интактные | - | 1,08±0,12 | 0,20±0,02 | 60,7±5,4 | 13,4±1,2 |
| 2 | CCl_4 (-) контроль | + | 1,80±0,19 | 0,36±0,05 | 193,3±17,9 | 9,9±0,8 |
| 3 | Коурохитин, 20 мг/кг | + | 1,26±0,10 | 0,26±0,04 | 129,2±9,4 | 11,2±1,5 |
| 4 | Карсил, 10 мг/кг | + | 1,28±0,18 | 0,28±0,03 | 109,2±8,8 | 11,5±1,2 |

Примечание: *концентрация ТБК-реактивных продуктов рассчитывали исходя из молекулярного веса малонового диальдегида. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение ($p < 0,05$).

Таким образом, использование коурохитина в качестве профилактического средства приводит к частичной защите печени от разрушающего воздействия CCl_4 .

Следует отметить, что важный вклад в гепатозащитный эффект коурохитина может вносить его хитозановая компонента. Так, ранее было показано (Yan Y, Wanshun L, Baoqin H, Bing L, Chenwei F. Protective effects of chitosan oligosaccharide and its derivatives against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice // *Hepato Res.* 2006; 35(3): 178-84), что профилактическое лечение хитозаном в течение 12 дней перед введением CCl_4 вызывает значительную экспрессию металлотioneина, усиление антиоксидантной защитной системы организма и уменьшение активности трансаминаз АлТ и АсТ в

40 плазме крови. В другой работе было отмечено (Jeon T.J., Hwang S.G., Park N.G. et al. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rat // *Toxicology.* 2003. Vol.187, N1. P.67.73), что лечение хитозаном из токсического гепатита, вызванного тетрахлорметаном, значительно уменьшает содержание в печени

45 ТБК-реактивных продуктов и увеличивает активность ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и супероксиддисмутазы), но не восстанавливает активность Δ^5 -десатуразы.

Таким образом, можно утверждать, что важную роль в гепатопротекторной

активности заявляемой композиции коурохитин играют как противовоспалительные свойства ароматического алкалоида триптантрина, так и антиоксидантные свойства хитозана.

Пример 7. Противодиабетическое действие

5 Фармакологические исследования выполнены на экспериментальной модели аллоксанового диабета мышей (самки) линии CD-1 массой 20-22 г. Животных предварительно оставляли без пищи в течение 15 ч. Аллоксановый диабет вызывали однократным внутривентральным введением аллоксана в дозе 120 мг/кг, который
10 селективно разрушает панкреатические β -клетки. Коурохитин в дозе 20 мг/кг вводили перорально в течение 4-х дней до и 4-х дней после индукции диабета. Лечебно-профилактический эффект определяли на 10 день после начала эксперимента, используя глюкозо-толерантный тест. С этой целью животным натошак перорально вводили 4 г/кг водного раствора глюкозы и через 60 мин осуществляли забор крови.
15 Для анализа концентрации глюкозы в крови использовали глюкометр OneTouch Ultra (Германия), а для определения концентрации триглицеридов и ферментативной активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ) в плазме крови - диагностический набор Новоглюк-К,М («Вектор-Бест», Россия).
20 Кроме опытных групп леченых животных, в эксперимент включали группу интактных животных и группу отрицательного контроля с индуцированным по общей схеме аллоксановым диабетом (нелеченые животные). Состояние антиоксидантной системы защиты у животных определяли по уровню продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). В полученном биологическом материале определяли содержание
25 триглицеридов (Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. - СПб.: Интер-Медика, 1999).

Как видно из результатов проведенных нами экспериментов (фиг.3), аллоксановый диабет сопровождался гипергликемией - $10,5 \pm 0,8$ ммоль/л (в интактном контроле - $3,8 \pm 0,3$ ммоль/л; $P < 0,05$), что можно рассматривать как проявление дефицита инсулина
30 и активации глюконеогенеза.

Проведение на фоне аллоксанового диабета лечебно-профилактического курса заявляемой композицией коурохитин и известным противодиабетическим препаратом метформин, избранным в качестве препарата-сравнения, в дозе 20 мг/кг и 10 мг/кг
35 соответственно приводило в обоих случаях к уменьшению содержания глюкозы. На этой модели коурохитин проявляет умеренную корректирующую активность, а метформин демонстрирует более выраженное нормализующее действие ($5,7 \pm 0,6$ ммоль/л; $P < 0,05$). Комбинированное применение этих препаратов приводит к
40 аддитивному эффекту ($6,1 \pm 0,5$ ммоль/л; $P < 0,05$).

Наряду с этим отмечается достоверное снижение концентрации триглицеридов (фиг.4) в плазме крови животных, прошедших курс лечения коурохитином и метформин, по сравнению с отрицательным контролем. Их совместное применение,
45 если судить по полученным экспериментальным данным, приводит к аддитивному эффекту.

Результаты представлены в таблице 5.

| Таблица 5 | | | | | | | |
|--|-----------------|---|------------------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Влияние коурохитина и метформина на клинико-диагностические показатели поджелудочной железы и плазмы крови экспериментальных животных при аллоксановом диабете | | | | | | | |
| № п/п | Группа животных | ТБК-реактивные продукты, мкмоль/г ткани | Диеновые конъюгаты, мкмоль/г ткани | Белок, мг/100 мг ткани | АлАТ, мкмоль/л час | АсАТ, мкмоль/л час | Билирубин, мкмоль/л |
| 50 | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|--|---------|----------|----------|---------|---------|----------|
| 1 | Интактные | 1,1±0,1 | 5,5±0,5 | 17,5±1,5 | 2,9±0,2 | 3,5±0,3 | 59,7±4,7 |
| 2 | Аллоксан, (-) контроль | 2,9±0,2 | 15,4±1,4 | 11,6±1,1 | 4,9±0,3 | 5,3±0,5 | 86,6±6,8 |
| 3 | Коурохитин, 20 мг/кг | 1,3±0,1 | 10,8 | 14,1±1,1 | 3,7±0,3 | 4,9±0,4 | 74,8±7,3 |
| 4 | Метформин, 10 мг/кг | 1,5±0,1 | 13,6 | 13,5±1,2 | 3,4±0,3 | 4,1±0,4 | 64,8±6,4 |
| | Метформин, 10 мг/кг + Коурохитин, 20 мг/кг | 1,4±0,1 | 11,4 | 12,1±1,2 | 3,1±0,3 | 4,3±0,4 | 62,8±5,5 |

Примечание: Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение (P<0,05).

Как видно из данных, приведенных в таблице 5, «окислительный стресс», вызванный аллоксаном, приводит к заметному увеличению в плазме крови аминотрансфераз и билирубина, а также к выраженному росту уровня ТБК-реактивных продуктов и диеновых конъюгатов в поджелудочной железе и уменьшению содержания белка в ее ткани.

Проведение лечебно-профилактического курса коурохитином и метформином на модели аллоксанового диабета приводит к частичному восстановлению функции поджелудочной железы и окислительно-восстановительных процессов в ее тканях, а также к значимой нормализации биохимических параметров крови и к позитивным системным эффектам на организме в целом. Совместное применение коурохитина и метформина характеризуется аддитивным характером их корригирующего действия.

Таким образом, коурохитин обладает умеренным защитным эффектом при аллоксановом диабете. Его совместное применение с известным противодиабетическим средством метформином приводит к аддитивному лечебному эффекту.

Пример 8. Противоопухолевые свойства

Для определения противоопухолевой активности коурохитина использовали экспериментальную модель аденокарциномы Эрлиха. Перевивку, поддержание штаммов и оценку полученных результатов осуществляли по методике, принятой в РОНЦ АМН РФ (г.Москва) (Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А. Экспериментальные оценки противоопухолевых препаратов в СССР и США. М.: Медицина, 1980. - 296 с). Лечение животных с асцитной опухолью начинали через сутки после трансплантации 3×10^6 опухолевых клеток. Препарат вводили перорально в течение 5 дней в расчетной дозе 20 мг/кг.

Противоопухолевый эффект оценивали по средней продолжительности жизни (СПЖ, в %) по сравнению с контролем по формуле:

$$\text{СПЖ}(\%) = (T/C) \times 100,$$

где T и C - средние значения (в днях) гибели животных в опытной и контрольной группах соответственно. При изучении противоопухолевой активности препарата мы оценивали его эффективность как при применении отдельно, так и в сочетании с циклофосфаном.

Как показал эксперимент, циклофосфан в дозе 120 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении увеличил среднюю продолжительность жизни на 88,3% по сравнению с контролем. Коурохитин при пероральном введении в дозе 20 мг/кг и пятикратном лечении проявил слабую противоопухолевую активность (УПЖ=22,3%). При применении коурохитина в сочетании с циклофосфаном был зарегистрирован синергический противоопухолевый эффект данных препаратов, при котором увеличение средней продолжительности жизни составило 100,1%.

Результаты представлены в таблице 6.

| Таблица 6 | | | | | |
|--|--|--------------------------|---|-------------------------|--------|
| Противоопухолевая активность коурохитина и в сочетании коурохитина с циклофосфаном | | | | | |
| 5 | Вещество (маршрут введения) | Кол-во животных в группе | Доза (мг/кг) / интервал (ч) × количество введений | Продолжительность жизни | |
| | | | | СПЖ, дни | СПЖ, % |
| | Контроль | 7 | | 14,8 | 100 |
| | Циклофосфан (в/б), 120 мг/кг | 6 | 120/24×1 | 28,0 | 188,3 |
| | Коурохитин (per os), 20 мг/кг | 6 | 20/24×5 | 18,1 | 122,3 |
| 10 | Коурохитин, 20 мг/кг + Циклофосфан, 120 мг/кг | 6 | 20/24×5 120/24×1 | 29,8 | 200,1 |
| Обозначения: СПЖ - средняя продолжительность жизни мышей; (в/б) - внутривенное введение; (per os) - пероральное введение | | | | | |

Таким образом, коурохитин в сочетании с циклофосфаном обладает выраженным
15 противоопухолевым эффектом и, следовательно, может усиливать действие
противоопухолевых цитостатиков.

Формула изобретения

Гелевая композиция, обладающая ранозаживляющим, противоожоговым,
20 противовоспалительным, гепатопротекторным, противодиабетическим и
противоопухолевым действием, характеризующаяся тем, что она содержит
триптантрин, хитозан и дистиллированную воду при следующем соотношении
ингредиентов, г/л геля:

| | | |
|----|-----------------------|-----------|
| 25 | Триптантрин | 1,5-2,5 |
| | Хитозан | 15,0-25,0 |
| | Дистиллированная вода | остальное |

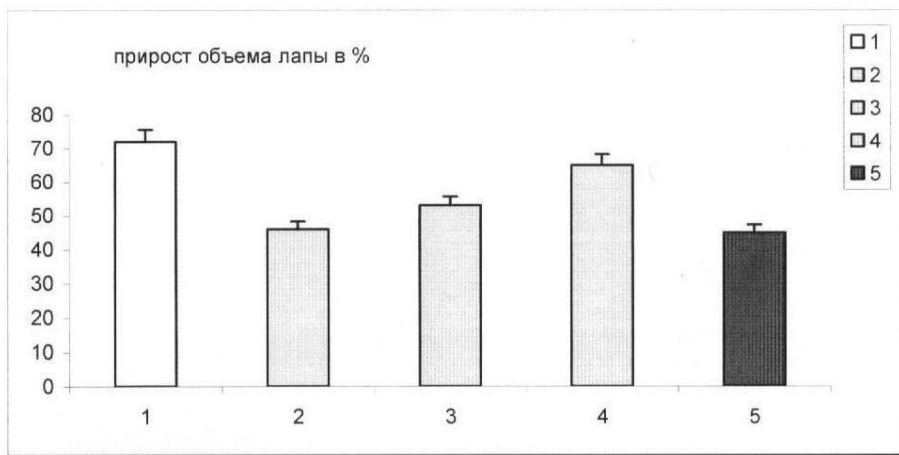
30

35

40

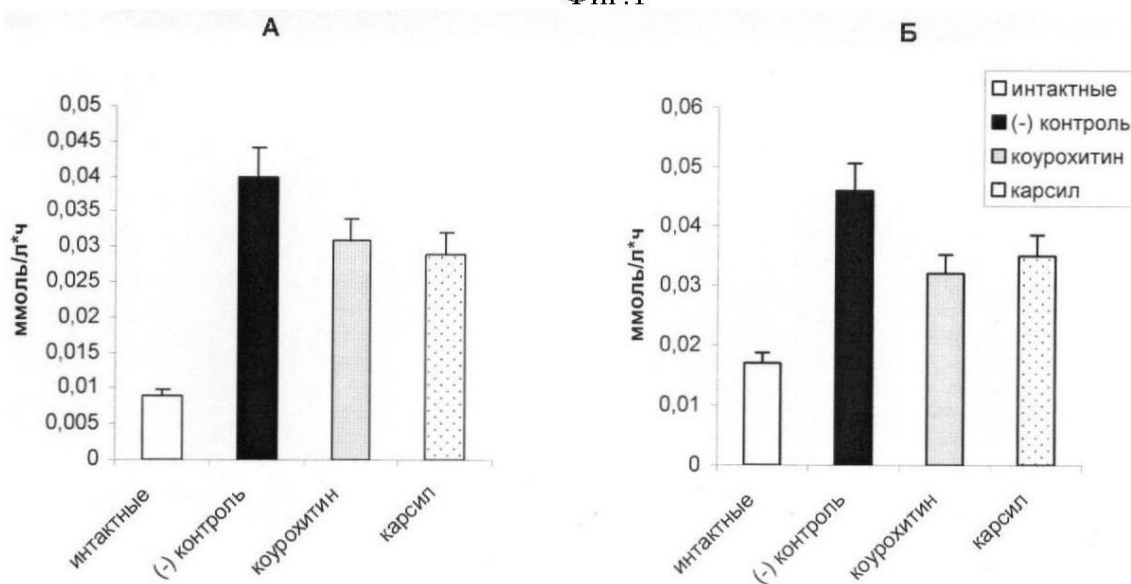
45

50



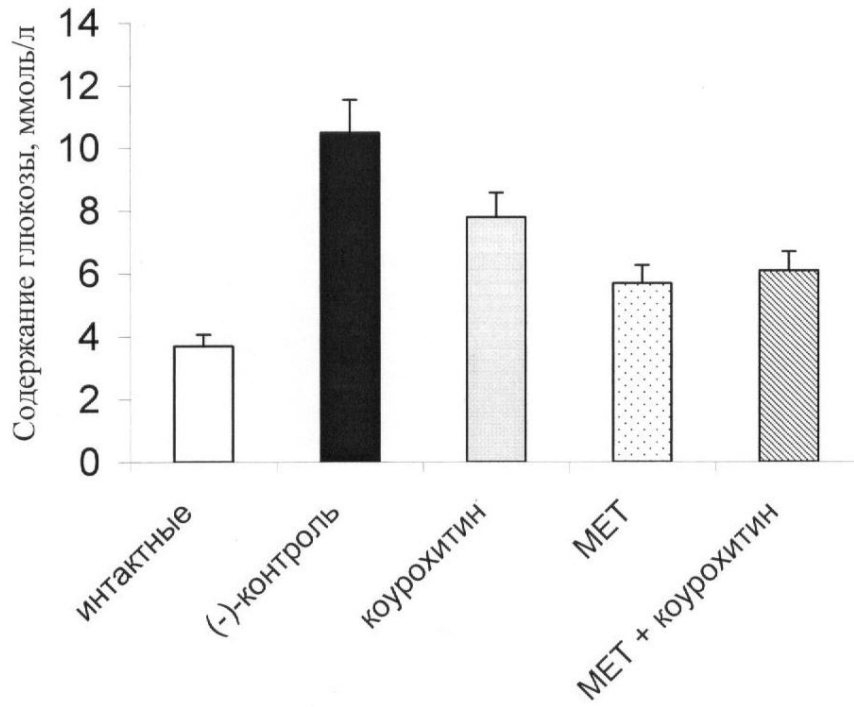
Группы животных: 1- контроль; 2- коурохитин, 20 мг/кг; 3 – коурохитин, 10 мг/кг; 4 – коурохитин, 5 мг/кг; 5 – индометацин, 10 мг/кг.

Фиг.1

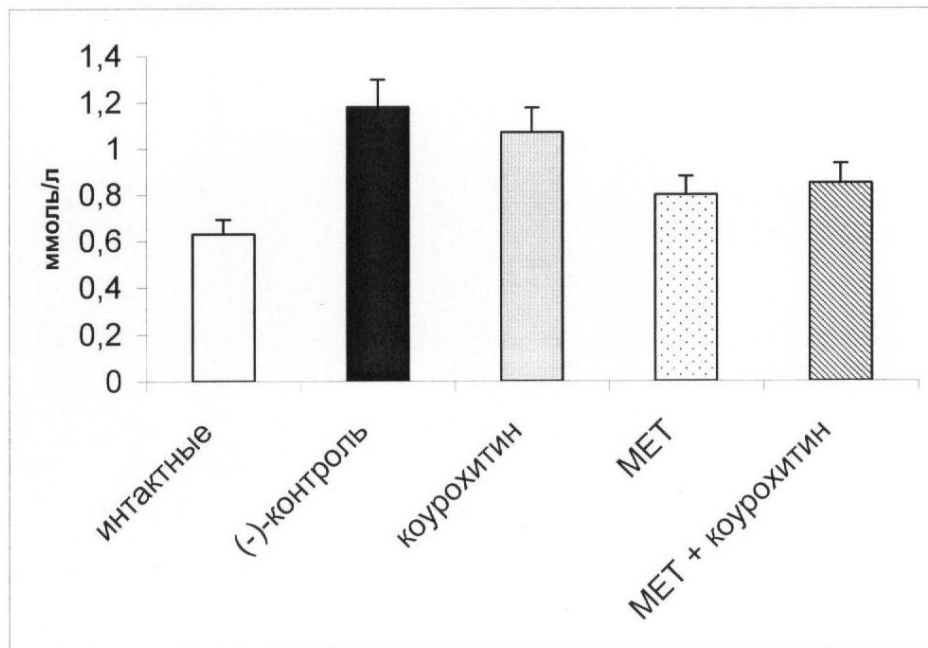


(А) –аланинаминотрансферазы; (Б) – аспаратаминотрансферазы

Фиг.2



Фиг. 3



Фиг. 4