

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **11542**

(13) **С1**

(46) **2009.02.28**

(51) МПК (2006)
A 61K 31/185
A 61K 33/30

(54) **КОМПОЗИЦИЯ, ОБЛАДАЮЩАЯ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

(21) Номер заявки: а 20050524

(22) 2005.05.27

(43) 2007.02.28

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Гродненский государственный ме-
дицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Шейбак Владимир Михай-
лович; Горецкая Марианна Викто-
ровна; Смирнов Виталий Юрьевич;
Лис Руслан Евгеньевич (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение образо-
вания "Гродненский государственный
медицинский университет" (ВУ)

(56) РАЗВОДОВСКИЙ Ю.Е. и др. Биомеди-
цинская химия, 2004. - Т. 50. - № 1. -
С. 64-72.
ВУ 1344 С1, 1996.
RU 2131247 С1, 1999.

(57)

Композиция, обладающая гепатопротекторными свойствами, содержащая лейцин и сульфат цинка, взятые в соотношении 4 : 1.

Изобретение относится к области медицины, а именно к парафармацевтической про-
мышленности, производящей препараты лечебного и профилактического назначения, и
может быть использовано в качестве вспомогательного средства, способствующего кор-
рекции нарушений функции печени.

Известен препарат гепатил (L-орнитина-L-аспартат; Гепат-Мерц; Орнитетил), исполь-
зуемый для лечения печеночной недостаточности, который на экспериментальной модели
печеночной недостаточности в дозе 330 мг/кг в час снижал уровень аммиака в плазме кро-
ви и уменьшал вероятность отека мозга [Подымова С.Д., Надинская Н.Ю., Буеверов А.С.
Печеночная энцефалопатия: применение Гепат-Мерца и методы контроля его эффективности //
Клин. фарм. и терапия. - 1996. - № 1. - С. 16-18.; Leweling H. Effects of ornitine aspartate on
plasma ammonia and plasma amino acids in patients with liver cirrhosis. A double-blind, random-
ized study using a four-fold crossover design - J.Hepatol. - 1990. - V. 10, suppl.1]. Введение
препарата повышало в плазме крови содержание глутамата, таурина, ГАМК, аланина,
лейцина, валина и изолейцина.

Недостатком этого препарата является необходимость введения больших его доз, что
негативно влияет на усвоение питательных веществ организмом.

Известен препарат аминостерил N-Непа (Fresenius AG) для лечения поражений печени
(разветвленные аминокислоты, ароматические аминокислоты, метионин), который позво-
ляет осуществлять достаточное поступление аминокислот в рамках полного парентераль-
ного питания. Аминостерил не содержит углеводов и электролитов [Инфузионная терапия
и клиническое питание / Под ред. А.Г.Хлябича-Фрезениус, 1992. - С. 795; Тулбаев Э.Л.,
Нартайлаков М.А., Галимов Ш.Н. Современные аспекты метаболической терапии пече-
ночной недостаточности // Здравоохранение Башкортостана. - 1999. - № 5. - С. 52-57].

Недостатком препарата является большой список противопоказаний (гипергидратация, гипонатриемия, гипокалиемия, сердечная недостаточность). Внутривенное введение аминостерила может провоцировать повышенную продукцию соляной кислоты и возникновение стресс-язвы.

Наиболее близким к предлагаемому является препарат тавамин, используемый для нормализации нарушенной функции печени, состоящий из аминокислот лейцина, изолейцина, валина и таурина. [Разводовский Ю.Е., Дорошенко Е.М., Прокопчик Н.И. и др. Гепатопротективные эффекты аминокислот с разветвленной цепью и таурина при экспериментальной субхронической алкогольной интоксикации и отмене этанола // Биомед. химия. - 2004. - № 1. - С. 64-72].

Недостатком известного препарата является то, что он содержит высокие дозы аминокислот, что чревато развитием гипераммониемии, снижает аппетит и не приводит к полноценной нормализации аминокислотного баланса в плазме крови.

Задачей изобретения является разработка нового доступного лекарственного препарата - биологически активной добавки, способствующей коррекции нарушенной функции печени.

Изобретение направлено на расширение ассортимента лекарственных средств, используемых для лечения острых и хронических заболеваний печени.

Поставленная задача решается путем создания композиции, содержащей лейцин и сульфат цинка в количественном соотношении 4 : 1 в дозах, не превышающих 100 мг/кг в отношении лейцина и 25 мг/кг в отношении сульфата цинка.

Известно, что у пациентов с недостаточностью функции печени возникает дисбаланс аминокислотного состава плазмы крови, что приводит к увеличению поступления ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин) в ткань мозга и провоцирует развитие печеночной энцефалопатии. Более выраженный дисбаланс характеризует более тяжелую стадию печеночной недостаточности у больного. Поскольку аминокислотный состав плазмы крови является интегральным показателем, в силу взаимосвязи всех метаболических путей отражающим степень нарушения обменных процессов в организме, его анализ может использоваться для определения эффективности проводимой коррекции нарушенной функции печени.

Приводим результаты эксперимента, подтверждающего возможность осуществления изобретения.

Эксперимент проводился на белых крысах-самках породы Вистар массой 170-200 г. Животные были разделены на 3 группы (одна контрольная и 2 опытные), по 8 штук в каждой. В качестве агента, поражающего печень, использовали парацетамол, который вводили в желудок в виде взвеси в 2 % слизи крахмала 1 раз в день ежедневно в течение 5 дней в дозе 750 мг/кг массы тела [Кравчук Р.И. и др. // Журнал ГГМУ. - 2005. - № 1. - С. 56-72].

После декапитации животных в пробирки забирали кровь и выделяли печень. Один кусочек печени фиксировали в жидкости Карнуа, а другой замораживали в жидком азоте. Из фиксированной в жидкости Карнуа печени готовили гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, производилась общая оценка морфологического состояния ткани печени.

Из замороженных в жидком азоте кусочков печени плодов готовили криостатные срезы на микротоме - криостате МК-25. На криостатных срезах проводили тетразолиевые гистохимические реакции по выявлению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) - маркера анаэробного гликолиза, NADH-дегидрогеназы (НАДН-ДГ) - показателя активности митохондриальных процессов и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) - маркера ЦТК. На гистохимических препаратах печени определялся уровень активности вышеуказанных ферментов в цитоплазме гепатоцитов. Уровень активности ферментов учитывался с помощью микроабсорбциометра-флуориметра в комплекте со сканирующим микроскопом МФТХ-2М (ЛОМО) по коэффициенту пропускания окрашенного среза в единицах оптической плотности. Фотометрирование уровня активности дегидрогеназ производилось при длине волны 580 нм.

У всех интактных животных наблюдается нормальная картина печени. Архитектоника печени после введения парацетамола соответствовала норме. Однако наблюдалась картина гепатита: ступенчатый некроз, перипортальный лимфоцитоз, диффузный лимфоцитоз. Кроме того, наблюдается очаговый кариолизис и баллонная дистрофия. У животных этой группы гепатоциты без признаков патологических изменений наблюдаются в основном центрлобулярно. Уровень активности СДГ и НАДН-ДГ соответствует показателям у интактных животных. Уровень активности ферментов в гепатоцитах опытных групп либо соответствует интактным показателям, либо превышает их.

В 1-й опытной группе крысам (8 шт.) одновременно с парацетамолом через 30 мин вводили внутривенно зондом лейцин в дозе 100 мг/кг массы тела. При этом произошла нормализация уровней глутамата, метионина, тирозина и лейцина, сохранялось снижение уровней только двух аминокислот - глицина и таурина. Одновременно увеличилось содержание аминокислоты аланина в плазме крови, что может отражать факт усиления процессов глюконеогенеза в периферических тканях.

Во 2-й опытной группе животным (8 шт.) одновременно с парацетамолом вводили предлагаемую композицию, содержащую лейцин и цинка сульфат в отношении 4 : 1. Доза лейцина составляла 100 мг/кг массы тела, а цинка сульфата, 25 мг/кг массы тела. Композицию вводили ежедневно в течение 5 дней через 30 минут после введения парацетамола. В результате практически нивелировались изменения в печени, вызванные введением парацетамола. Данные, полученные в ходе эксперимента, отражены в табл. 1-2.

Таблица 1

Структура пула свободных аминокислот в плазме крови животных с интоксикацией парацетамолом, получавших лейцин и сульфат цинка

Показатели	Контроль	Опыт (парацетамол)	+ лейцин	+ лейцин + сульфат цинка
Общее содержание аминокислот, мкмоль/л	3912±119	3327±169*	3765±143	3913±113
ЗА/НА	1,74±0,025	1,77±0,07	1,84±0,134	1,87±0,132
АРУЦ/ААК	3,31±0,063	3,63±0,289	3,15±0,149	3,16±0,164
Глу/Глн	0,16±0,017	0,13±0,011*	0,16±0,0088	0,14±0,013
Фен/Тир	0,84±0,064	0,82±0,095	0,94±0,087	0,97±0,112

Примечание: ЗА - заменимые аминокислоты, НА - незаменимые аминокислоты, АРУЦ - аминокислоты с разветвленной углеродной цепью, ААК - ароматические аминокислоты, * достоверно ($p < 0,05$) относительно контрольной группы животных.

Таблица 2

Концентрации свободных аминокислот в плазме крови животных после поражения печени парацетамолом и введения лейцина и сульфата цинка, мкмоль/л

Аминокислоты	Контроль	Парацетамол	Парацетамол + лейцин	Парацетамол + лейцин + цинка сульфат
Таурин	302,5±13,8	230,5±17,5*	229,4±21,8*	225,5±24,0*
Аспаргат	68,9±12,9	89,5±25,3	42,80±2,31	46,64±3,77
Треонин	336,3±25,5	273,9±26,7	319,5±30,9	338,8±37,4
Серин	284,5±13,1	296,8±20,3	317,8±28,2	328,1±18,4
Глутамат	130,2±8,90	93,1±10,1*	128,4±6,02†	117,7±11,6
Глутамин	817,7±35,4	706,2±51,5	816,8±38,3	867,2±26,2†
Пролин	382,9±60,4	272,6±27,8	393,2±28,8†	459,0±64,5†
Глицин	238,6±11,0	178,6±16,1*	173,1±24,6*	194,4± 19,9
Аланин	255,1±6,54	240,9±19,4	292,2±17,7*	250,6±13,8с

Аминокислоты	Контроль	Парацетамол	Парацетамол + лейцин	Парацетамол + лейцин + цинка сульфат
Аминомасляная кислота	24,14±3,16	17,03±1,27	19,78±2,82	31,7±10,5
Валин	177,8±6,96	158,70±7,33	179,8±13,2	169,15±5,62
Метионин	53,12±2,57	41,47±2,12*	55,82±2,04†	46,16±3,35с
Изолейцин	82,79±3,34	71,05±4,67	80,78±6,62	81,97±4,47
Лейцин	136,2±5,69	117,33±6,68	132,0±10,2	143,34±5,86†
Тирозин	65,38±2,28	53,87±3,41*	65,27±5,48	64,54±4,90
Фенилаланин	55,21±4,65	43,37±4,42	59,51±3,58†	61,55±4,98†
Этаноламин	6,87±0,943	9,68±1,60	11,04±4,62	7,652±0,794
Орнитин	49,24±5,83	52,9±12,6	48,29±3,59	69,5±16,4
Лизин	381,2±14,4	319,5±17,8*	341,5±29,3	341,7±12,0
Гистидин	70,09±1,95	69,83±3,96	69,7±11,0	75,40±3,80

$p < 0,05$ по отношению к * - контроль, † - парацетамол, с - парацетамол + лейцин.

Соотношение компонентов оптимизировано нами исходя из проведенных предварительно экспериментов.

Стоит отметить, что достоверная положительная корреляционная связь между лейцином, с одной стороны, и валином и изолейцином - с другой, изменялась только при совместном введении лейцина и сульфата цинка в установленном соотношении и не изменялась при введении одного лейцина.

Для интегральной оценки влияния композиции на фонд свободных аминокислот был проведен дискриминантный анализ. По значению показателя лямбды Вилкса (0,0445) можно судить о достаточно хорошей дискриминации, а на основании классификационной матрицы можно сделать вывод о 100 % корректности выборок для всех групп. Из графика проекции пространства показателей на плоскость двух главных компонент очевидно (ил.1), что положение изучаемых показателей при интоксикации парацетамолом, а также при введении крысам на этом фоне как лейцина, так и предлагаемой композиции лейцина и сульфата цинка в отношении 4 : 1 значительно отличается от положения показателей контрольных животных, причем расстояние между центрами контрольной и "парацетамольной" группы было больше, чем между центрами контрольной группы и группами с введением изучаемых соединений. Относительно первого главного компонента группы с введением препаратов не отличались друг от друга, а относительно второго компонента наблюдалось различие между группой совместного введения лейцина и сульфата цинка с остальными группами. Следует указать на некоторый нормализующий эффект одного лейцина, но его эффект усиливается комбинацией его с сульфатом цинка, при этом появляются дополнительные механизмы корректирующего действия.

Таким образом, предлагаемая композиция, состоящая из лейцина и цинка сульфата в соотношении 4 : 1, назначаемая в виде суспензии или в таблетированной форме, что делает ее удобной для применения, действительно оказывает корректирующее действие при нарушении функции печени.