

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044216**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.31

(51) Int. Cl. **A61K 38/40** (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(21) Номер заявки
202193308

(22) Дата подачи заявки
2021.11.29

(54) ГЕПАТОПРОТЕКТОР ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА

(43) **2023.05.31**

(96) **2021/EA/0069 (BY) 2021.11.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГОСУДАРСТВЕННОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ" (BY)**

(56) ЛУКАШЕВИЧ В.С. и др. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты. ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ, 2016, Том, 60 № 1, с. 72-81, с. 78 последний абзац - с. 80

HIROTSUGU O. et al. Effect of oral administration of bovine lactoferrin on alcohol-induced liver injury model rats. MILK SCIENCE, Vol. 69, No. 1, 2020, p. 3-10 doi: 10.11465/milk.69.3, реферат, с. 7

DEMING L.I. et al. Daily Dose of Bovine Lactoferrin Prevents Ethanol-Induced Liver Injury and Death in Male Mice by Regulating Hepatic Alcohol Metabolism and Modulating Gut Microbiota. MOLECULAR NUTRITION & FOOD RESEARCH, vol. 65, 18 (2021): e2100253. doi: 10.1002/mnfr.202100253, реферат

CN-A-110981952
EA-A1-200900558
JP-A-2021029208

(72) Изобретатель:
**Лукашевич Владимир Сергеевич,
Рудниченко Юлия Анатольевна,
Новаковская Светлана Алексеевна,
Хрусталёва Татьяна Александровна,
Губкин Сергей Владимирович,
Будевич Александр Иванович (BY)**

(74) Представитель:
Самцов В.П. (BY)

(57) Изобретение относится к области медицины и токсикологии для применения в качестве профилактического средства и/или в качестве дополнительного препарата в комплексной лечебной терапии хронической алкогольной интоксикации. Технический результат заключается в восстановлении морфофункционального состояния организма, повышении эффективности препарата и расширении спектра положительного воздействия на клетки печени. Применение в качестве гепатопротектора препарата сывороточного белка лактоферрина человека, выделенного из козьего молока трансгенных по лактоферрину коз, для коррекции морфофункционального состояния организма при хронической алкогольной интоксикации.

B1

044216

**044216
B1**

Изобретение относится к области медицины и токсикологии для применения в качестве профилактического средства и/или в качестве дополнительного препарата в комплексной лечебной терапии хронической алкогольной интоксикации.

Известно, что алкоголь увеличивает риск возникновения большого числа заболеваний, не связанных с ним напрямую и затрагивающих практически все жизненно важные системы и органы человека. Первичными мишенями токсического поражения алкоголя являются желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и печень, в которой происходит основной метаболический распад (более 90%) спирта сначала до ацетальдегида и далее до уксусной кислоты [1].

Алкогольное заболевание печени имеет определенные морфологические особенности. Отмечается жировая дистрофия печени, при которой жировые включения распределяются диффузно и в большинстве случаев имеют крупные размеры (макровезикулярный стеатоз). Характерным признаком алкогольного поражения печени является выявление стеатоза перипортальных гепатоцитов в сочетании с перигепатоцеллюлярным фиброзом, а также лобулярная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами с участками фокального некроза. В различной степени в паренхиме выражен внутриспеченочный холестаз, микронодулярный цирроз. На поздних стадиях цирроз нередко приобретает черты макронодулярного, что ассоциировано с повышением риска развития гепатоцеллюлярной карциномы [2].

При хроническом алкогольном поражении печени возникают в той или иной степени нарушения метаболических процессов, что диагностируется при определении показателей метаболитов сыворотки крови [3].

В настоящее время для комплексного лечения больных с хроническим гепатитом и циррозом печени используются гепатопротекторы. Для больных со стеатозом алкогольного генеза применение этих препаратов является основой лечения [4]. Существуют также и специальные целевые препараты, например "эссенциале", применение которого способствует сохранению фосфолипидного слоя мембран гепатоцитов [5].

К недостаткам известных препаратов следует отнести то, что большинство из них являются средствами общеукрепляющего действия либо они обладают низкой эффективностью.

Известно также экспериментальное применение коровьего лактоферрина для лечения повреждения печени, вызванного алкоголем [6]. На модельных крысах показано, что употребление коровьего молозива помогает при алкогольном гепатите, поскольку лактоферрин (LF) содержится в молозиве в избытке и его переваривания пепсином (LFH) индуцирует выработку гепатопротекторного цитокина (IL11) и ферментов, метаболизирующих этанол (ADH, ALDH). Установлено, что проглатывание LFH может подавить повреждение печени, вызванное постоянным употреблением алкоголя в течение определенного периода.

Недостатком коровьего лактоферрина в качестве препарата для лечения повреждения печени, вызванного алкоголем, является его низкая эффективность вследствие его иной генной природы, вызванной происхождением.

Задачей изобретения является получение гепатопротекторного препарата, свободного от указанных недостатков, с улучшенной эффективностью воздействия на организм при алкогольном поражении печени.

Технический результат изобретения заключается в восстановлении морфофункционального состояния организма, повышении эффективности препарата и расширении спектра положительного воздействия на клетки печени.

Технический результат достигается применением в качестве гепатопротектора препарата сывороточного белка лактоферрина человека, выделенного из козьего молока трансгенных по лактоферрину коз, для коррекции морфофункционального состояния организма при хронической алкогольной интоксикации.

Гепатопротектор содержит сывороточный белок лактоферрин человека в физиологическом растворе, например в изотоническом водном 0,9% растворе хлорида натрия.

Сущность изобретения поясняется электронными микрофотографиями на фиг. 1а-г и 2а-е.

На фиг. 1а-г показан вид ультраструктурной организации клеток печени и синусоидного капилляра при хронической алкогольной интоксикации под увеличением микроскопа: 6000 (г), 8000 (а, в), 10000 (б), где М - митохондрии, Я - ядро, Л - липидная капля, Г - гранулы гликогена, ГЭР - гранулярный эндоплазматический ретикулум, ЗМ - звездчатый макрофаг, ПП - перисинусоидальное пространство (Диссе), К - коллаген, В - вакуоль.

На фиг. 2а-е показан вид ультраструктурной организации клеток паренхимы печени и синусоидного капилляра крыс, получавших сочетанно этанол и лактоферрин человека под увеличением микроскопа: 6000 (а, в, г, е), 8000 (б, д), где Я - ядро, М - митохондрии, ГЭР - гранулярный эндоплазматический ретикулум, ПЛ - перисинусоидальный липоцит, Л - липидные капли.

Известно, что лактоферрин (ЛФ) является мощным антиоксидантом (защищает от окисления липиды мембран), иммуномодулятором (повышает активность клеток макрофагов, уничтожающих инфекционные агенты) и противоопухолевым агентом [7]. Лактоферрин, как "красный" белок в составе коровьего молока, был идентифицирован в 1939 году, а в 1960 году его выделили из человеческого молока. В 2010 году этот уникальный по своим свойствам лекарственный белок стало возможным получать из мо-

лока генно-дифицированных коз после пересадки им гена лактоферрина человека.

Проведенными исследованиями установлено, что в качестве гепатопротекторного препарата для коррекции морфофункционального состояния организма при алкогольной интоксикации возможно использование сывороточного белка лактоферрина человека, полученного из козьего молока трансгенных по лактоферрину коз. Установлено, что такой ЛФ обладает более широким спектром положительного воздействия на клетки печени по сравнению с известными гепатопротекторами, а его применение оказалось более эффективным по сравнению с существующими известными препаратами.

Реализация изобретения

В качестве примера приведены результаты экспериментальных исследований по применению сывороточного белка лактоферрина, полученного из козьего молока трансгенных по лактоферрину коз, в качестве гепатопротекторного препарата для коррекции морфофункционального состояния организма. Гепатопротектор готовили на физиологическом растворе - изотоническом водном 0,9% растворе хлорида натрия, в который вводили сывороточный белок лактоферрина человека, выделенный из молока трансгенных по лактоферрину коз.

Испытания были выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Вистар (n=30) массой 130±20 г, в строгом соответствии с правилами гуманного отношения к лабораторным животным.

Животные были разделены на три группы (n=10 в каждой группе):

1-я группа - половозрелые самцы крыс, содержавшиеся в стандартных условиях с постоянным доступом к чистой воде и корму, контроль;

2-я группа - экспериментальные животные, которым вводили *per os* 0,1 мл изотонического водного 0,9% раствора NaCl на фоне длительной (хронической) алкогольной интоксикации на протяжении 40 суток;

3-я группа - экспериментальные животные, которые на фоне длительной алкогольной интоксикации получали ежедневно *per os* лактоферрин человека в дозе 200 мг/кг массы тела животного в 0,1 мл изотонического водного 0,9% раствора NaCl на протяжении 40 суток.

Для моделирования длительной алкогольной интоксикации использовали методы искусственной полидипсии, при которых животные были вынуждены употреблять 15% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости на протяжении 40 суток.

Для оценки метаболических показателей использовали определение активностей аланин-, аспаратаминотрансфераз (АЛТ, АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) в сыворотке крови крыс в соответствии с рекомендациями ВОЗ при алкогольной интоксикации.

Электронно-микроскопические исследования экспериментального материала обрабатывались по общепринятой методике [7]. Для этого образцы биоптатов в виде кусочков печени размерами 1-2 мм фиксировались в растворе, состоящем из 3% глутарового альдегида и 1% параформа при температуре 4°C в течение 2 ч. Затем исследуемый материал дополнительно фиксировался в 1% растворе четырёхокси осмия в течение 2 ч при температуре 4°C. После завершения альдегид-осмиевой фиксации экспериментальные образцы обезживались в спиртах восходящей крепости и заливались в ара-дит. Для полимеризации материал помещался в термостат при температуре 37°C на 2 суток, а затем при температуре 56°C на 3 суток. Срезы готовились на ультрамикротоме РТРС PowerTome (RMC Boeckeler, США) и просматривались в электронном микроскопе JEM-100B (Jeol, Япония).

Экспериментальные данные были обработаны с помощью MS Excel. Статистическая значимость полученных результатов оценивалась по U-критерию Манна-Уитни для непараметрических выборок с использованием пакета программ Statistica 6.0. Достоверным считали уровень значимости $P \leq 0,05$.

В таблице приведены результаты влияния ЛФ человека, полученного из козьего молока трансгенных по лактоферрину коз, как гепатопротекторного препарата на некоторые биохимические показатели в сыворотке крови крыс при алкогольной интоксикации.

Показатели	1-я группа, контроль	2-я группа, алкоголь	3-я группа, алкоголь+200мг/кг рчЛФ
ГГТ (Е/л)	4,41±0,54	8,93±1,95*	5,07±0,78
АЛТ (Е/л)	23,82±1,22	27,65±2,11	20,40±1,44
АСТ (Е/л)	70,06±6,77	105,29±5,32*	78,48±3,31
ЛДГ (Е/л)	1171,14±111,18	1250,27±91,68	1184,01±73,34

Примечание: *Обозначено достоверное ($P < 0,05$) изменение параметра по сравнению с соответствующим значением в контрольной группе крыс.

Из таблицы видно, что наиболее выраженные изменения под действием алкоголя были характерны для АСТ и ГГТ: статистически достоверное увеличение активности на 47 и 102% соответственно. Потребления ЛФ человека, полученного из козьего молока трансгенных по лактоферрину коз, приближало к контрольным значениям все изучаемые показатели.

Электронно-микроскопические исследования биоптатов печени при хронической алкогольной интоксикации выявили изменения, характерные для токсического поражения клеток органа. Отмечено угнетение синтетической функции гепатоцитов и активизация процессов фиброобразования. Митохондриальный аппарат печеночных клеток представлен полиморфными структурами с уплотненным

умеренно отечным матриксом и нечетко выраженными кристами, между которыми выявлялись расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети с электронноплотными вкраплениями гранул гликогена. Среди митохондрий, окружающих ядра гепатоцитов, определялись светлые гомогенные включения, липидные капли (см. фиг. 1а).

Отмечалось расширение синусоидных капилляров и активация клеток, формирующих их стенку - звездчатых макрофагов, или клеток Купфера. Часть клеток имела вытянутую фибробластоподобную форму, крупное гетерохромное ядро, вокруг которого концентрировались комплекс Гольджи, многочисленные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, единичные митохондрии, лизосомы, вакуоли (фиг. 1б). Другие клетки имели многочисленные цитоплазматические отростки, пересекающие просвет капилляра, крупные лизосомы и липидсодержащие капли, цистерны эндоплазматической сети (фиг. 1в, г). Данные клетки обладают высокой фибротической активностью, в местах их локализации наблюдалось расширение перисинусоидальных пространств и разрастание коллагеновых волокон (фиг. 1г).

Эндотелиальная выстилка синусоидных капилляров на большом протяжении проницаема для клеток крови - активированные клетки лимфо- и моноцитарного ряда мигрируют в пространство Диссе. Отмечается окклюзия капилляров синусоидов клетками крови.

Таким образом, электронно-микроскопические исследования показали, что длительное поступление этанола в организм экспериментальных крыс способствует развитию хронического алкогольного поражения печени.

Электронно-микроскопическое исследование паренхимы печени экспериментальных крыс, получавших перорально 15% раствор этанола в сочетании с лактоферрином человека в дозе 200 мг/кг, показало положительное влияние последнего на восстановление структурно-функциональной организации печеночных клеток и их органелл. Отмечается повышение синтетической активности гепатоцитов - активизируются процессы транскрипции и эухроматизации ядер (фиг. 2а). Митохондриальный аппарат гепатоцитов характеризуется полиморфизмом. Часть органелл имеет электронноплотный отечный матрикс со слабо обозначенными кристами (фиг. 2б). Выявляются мелкие митохондрии с просветленным матриксом, а также гипертрофированные органеллы удлинённой формы. Данная ультраструктурная организация митохондрий свидетельствует о частичном угнетении их функции и развитии в клетках печени функционального напряжения.

Цистерны гранулярной эндоплазматического ретикулума гиперплазированы и расширены, имеют обильное количество рибосом и полисом (фиг. 2г). В них накапливается хлопьевидный электронноплотный материал, что связано с повышенной белково-синтетической функцией гепатоцитов и пониженной экскрецией белка. Отмечается гиперплазия мембран комплекса Гольджи (фиг. 2в). В цитоплазме клеток печени и в перисинусоидальных пространствах выявляются липидные включения.

Синусоидные капилляры полнокровны, отмечается активация клеток, формирующих их стенку - звездчатых макрофагов, перисинусоидальных липоцитов (клеток Ито). Часть клеток Ито имеет фибробластоподобную форму, крупное гетерохромное ядро, вокруг которого концентрируются липидные капли (фиг. 2д). Другие клетки относятся к смешанному типу, в них увеличивается количество белоксинтезирующих органелл (фиг. 2е). Выявляются активированные звездчатые макрофаги с длинными цитоплазматическими отростками, в цитоплазме которых присутствуют темные лизосомы с электронноплотными включениями.

Электронно-микроскопическими исследованиями паренхимы печени экспериментальных крыс установлено положительное влияние лактоферрина человека из молока трансгенных по лактоферрину коз в дозе 200 мг/кг на восстановление структурно-функциональной организации печеночных клеток и их органелл.

Таким образом, заявленный технический результат достигается применением по другому назначению лактоферрина человека из молока трансгенных по лактоферрину коз, а именно - в качестве гепатопротектора для коррекции состояния организма при алкогольной интоксикации, чем обеспечивается восстановление его морфофункциональное состояние, при этом повышается эффективность воздействия препарата, а также расширяется спектр положительного влияния на клетки печени.

Из вышеизложенного следует, что разработанное техническое решение обладает рядом преимуществ по сравнению с используемыми для аналогичных целей гепатопротекторами и соответствует условиям патентоспособности: новизна, изобретательский уровень, промышленная применимость.

Источники информации:

1. Мануйлов Б.М. Возможности фитотерапии при злоупотреблении алкоголя. - М. - 2005. - 101 с.
2. Некрасова Т.П. Морфологические особенности алкогольного поражения печени // Гепатологический форум - 2005. - № 4. - С. 14-18.
3. Рослый И.М. и др. Биохимия и алкоголизм (IV): Типовые клинко-биохимические синдромы при хронической алкогольной интоксикации // Вопросы наркологии. - 2004. - № 5. - С. 46-56.
4. Подымова С.Д. Патогенетическая роль эссенциальных фосфолипидов в терапии алкогольной болезни печени // Consilium medicum: Экстравыпуск. 2001. - С. 3-5.
5. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Методические рекомендации. Микробиологическая диагностика

дисбактериоза кишечника. М. ГУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 2007 - 48 с.

6. Hirotsugu Oda, Miyuki Tanaka, Koji Yamauchi, Fumiaki Abe. "Эффект перорального введения козьего лактоферрина на модели повреждения печени, вызванной алкоголем". Science. Vol. 69, No. 1, 2020.

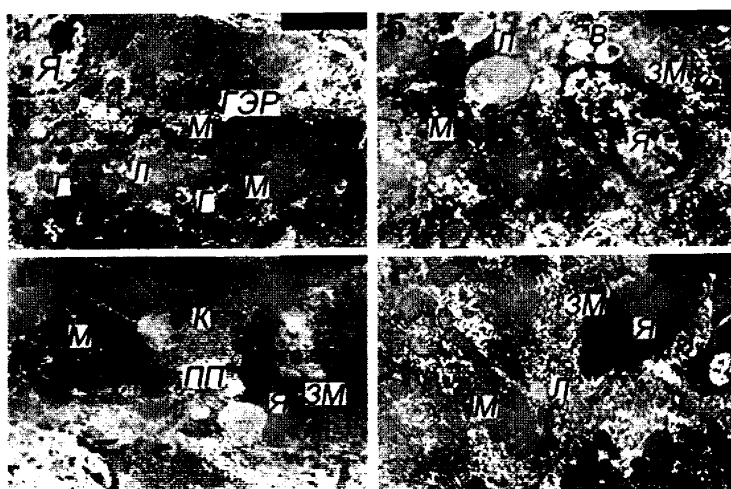
7. Лактоферрин. Справка. <https://ria.ru/20100630/251339555.html>, 30.06.2010, дата доступа 11.11.2021.

8. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. - М., 1976. - 71 с.

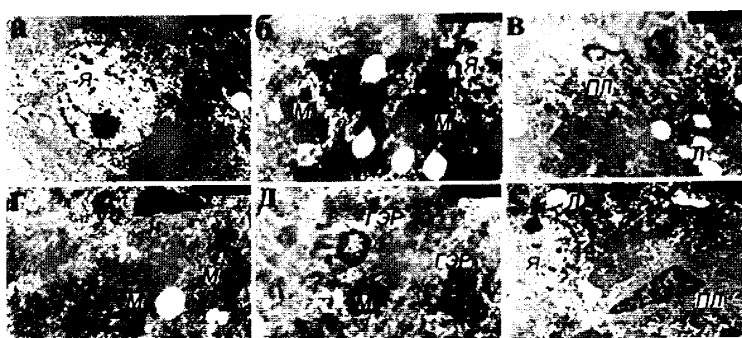
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение в качестве гепатопротектора препарата сывороточного белка лактоферрина человека, выделенного из козьего молока трансгенных по лактоферрину коз, для коррекции морфофункционального состояния организма при хронической алкогольной интоксикации.

2. Применение гепатопротектора по п.1, отличающееся тем, что препарат содержит сывороточный белок лактоферрина человека в физиологическом растворе, например в изотоническом водном 0,9% растворе хлорида натрия.



Фиг. 1а-г



Фиг. 2а-е



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2