

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043342**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.16**

(51) Int. Cl. *A61K 38/08* (2019.01)  
*A61P 17/02* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201900418**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.09.11**

---

(54) **СРЕДСТВО ДЛЯ ТЕРАПИИ РАНЕВЫХ ИЛИ ОЖОГОВЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОЖИ**

---

(31) **2018132558**

(56) RU-C1-2366432  
RU-C1-2221547  
EA-A1-201201296

(32) **2018.09.12**

(33) **RU**

(43) **2020.03.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ПиВиПи ЛАБС ПТЕ. ЛТД (SG)**

(72) Изобретатель:  
**Черторижский Евгений  
Александрович, Овчинников Михаил  
Владимирович, Клейменов Алексей  
Викторович (RU)**

(74) Представитель:  
**Сагитов В.Р. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к медицине и фармакологии и касается использования гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в терапии раневых или ожоговых поражений кожи в качестве лекарственного средства для наружного применения. Средство для уменьшения отечности и гиперемии кожи, нормализации лимфоцитарно-нейтрофильного индекса и стимуляции формирования волокнистых элементов в рубцовой ткани при раневых или ожоговых поражениях кожи предназначено для ежедневного однократного применения до заживления раны, в виде лекарственной формы для наружного применения, и состоит из активного вещества гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина - 0,02-0,5 мас.%, фармацевтически приемлемой добавки/фармацевтически приемлемых добавок - остальное. Средство способствует быстрому заживлению раневых и ожоговых поражений кожи за счет стимуляции процессов регенерации тканей в области поражения и снижения выраженности продуктивного воспаления.

**B1**

**043342**

**043342**

**B1**

### Область техники

Изобретение относится к медицине и фармакологии и касается использования гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в терапии ран или ожоговых поражений кожи в качестве лекарственного средства для наружного применения.

### Уровень техники

По данным ВОЗ, из-за термической травмы в мире ежегодно погибают 180 тыс. человек. При этом ожоги являются одной из основных причин длительной госпитализации и стойкой нетрудоспособности, зачастую сопровождаясь социальной стигматизацией и значительно ухудшая качество жизни [1]. Положенный в основу терапии обожженных принцип единства общего и местного лечения подчеркивает особую роль последнего, направленного на качественное заживление ожоговых ран и раннее восстановление кожного покрова [2]. Таким образом, разработка новых эффективных местных противоожоговых средств несомненно остается актуальной задачей здравоохранения.

С термической травмой ассоциирован целый комплекс патофизиологических механизмов, в частности гипоксия и перекисное окисление липидов (ПОЛ), снижение тканевой перфузии в зоне стаза, агрегация и гиперактивация нейтрофилов, каскад воспалительных реакций и выраженный болевой синдром. Очевидно новые препараты также должны обладать комплексным механизмом действия, соответствующим патогенетической картине травмы. В этой связи значительный интерес представляет клиническая разработка нового противоожогового препарата на основе синтетического регуляторного пептида, обладающего широким спектром биологической активности.

Как компонент стресс-лимитирующей системы гексапептид проявляет антиоксидантные свойства [3], ингибирует ПОЛ [4], улучшает периферическую микроциркуляцию [5].

Являясь медиатором опиоидной антиноцицептивной системы, при этом он практически не проникает через гематоэнцефалический барьер. При этом его анальгезирующий эффект реализуется преимущественно на периферическом/тканевом уровне, что позволяет рассматривать этот препарат как обладающий некоторыми свойствами аппликационного анестетика [6].

При этом гексапептид продемонстрировал серьезный потенциал и в отношении регенерации тканей. Так, рядом исследователей было показано, что он стимулирует клеточную митотическую активность посредством взаимодействия с опиатными рецепторами, а также стимулирует репаративные процессы ран [7-9].

В настоящее время гексапептид в виде препарата Даларгин одобрен для медицинского применения в России для терапии язвенной болезни и панкреатита в качестве средства, снижающего кислотность желудочного сока и внешнюю секреторную активность поджелудочной железы [10]. Однако эффективность этого препарата в терапии язвенной болезни также во многом объясняется его репаративными свойствами в отношении слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки [11-13]. Эффективность Даларгина в составе комплексной терапии при болезни Крона (в/м 1 мг 2 раза в сутки) (патент RU 2363455, заявка № 2007142745/14 от 19.11.2007) также свидетельствует о наличии системного репаративного эффекта. Ранозаживляющий потенциал Даларгина предложен к использованию в терапии травм роговицы в работе Максаковой Е.В. [14].

Известно, что "принятие решения" на клеточном уровне: апоптоз или синтез ДНК и митоз, во многом зависит от оксидативного статуса или редокс-состояния [15], что особенно важно для сокращения зоны стаза ожоговой раны. Очевидно, что антиоксидантные свойства, наличие антирадикальной и нитроксидагической активности, [16] обеспечивают Даларгину дополнительный потенциал в отношении регенерации ожоговой раны.

Опубликовано изобретение в области косметологии, в котором Даларгин применялся в составе противовоспалительного крема, для купирования симптомов угревой сыпи (патент РФ № 2045949, А61К 7/48, 1995). В другом патенте (№ 2221547, заявка № 2002134728/15 от 24.12.2002) было заявлено иммуномодулирующее действие Даларгина в составе косметического средства.

Имеются данные эксперимента, в котором *in vitro* было продемонстрировано, что Даларгин при добавлении к пробам периферической крови пациентов с ожогами (n=15) нормализовал повышенную функционально-метаболическую активность нейтрофилов, снижая повышенную активность НАДФН-оксидазы, щелочной фосфатазы (ЩФ), миелопероксидазы, ядерного хроматина, а также нормализовал повышенное содержание катионных белков в нейтрофилах и общее количество активированных нейтрофилов. Важно отметить, что в крови здоровых людей (n=27) Даларгин, напротив, увеличивал общее количество активированных нейтрофилов, а также активность НАДФН-оксидазы. Вышеуказанные эффекты были опосредованы через опиатные рецепторы, характеризовались дозозависимостью с максимизацией эффекта при молярной концентрации  $5 \times 10^{-8}$  М [17]. При этом данный эффект не изучался для модели ожога *in vivo*.

В целом, любое нарушение целостности тканей вызывает активацию нейтрофилов, которая усиливает выработку активных радикалов кислорода, ПОЛ и целый каскад реакций, повреждающих не затронутые патологическим процессом ткани [18]. Поэтому свойство Даларгина нормализовать гиперактивацию нейтрофилов является патогенетически важным звеном для реализации его противоожогового эффекта.

В настоящее время опубликованы данные экспериментов по эффективности парентерального введения Даларгина при ожогах, однако ни в одном из них не изучалось противоожоговое действие при применении препарата в виде местной аппликации. В одной работе сравнивали Даларгин с дельта-сон индуцирующим пептидом (ДСИП) в терапии ожогов, при этом оба препарата вводили подкожно животным внутривенно (патент RU № 2070054, дата публикации: 10.12.1996). В другом исследовании Даларгин (п/к в дозе 0,3 мг) продемонстрировал значительное ускорение репарации кожи, а также снижение выраженности продуктивного воспаления, в модели термического ожога 3 степени у крыс [9]. Патент RU № 2196603 раскрывает применение Даларгина (1-2 мг в 1-2 мл внутривенно капельно) в составе инфузионной терапии для лечения ожоговой болезни.

В отличие от приведенных работ настоящее изобретение раскрывает потенциал препарата Даларгин в виде лекарственной формы для наружного применения.

Кроме того, имеются данные по применению Даларгина при ряде других заболеваний. Патенты UA 6829 U, UA 6823 U и UA 6826 U раскрывают применение Даларгина для лечения острого экспериментального панкреатита. Применение Даларгина в качестве антистрессорного агента освещалось в патентах UA 67632, UA 67630 и UA 67629 на экспериментальных моделях хронического панкреатита, острого аднексита и перитонита соответственно. Антистрессорная активность Даларгина была показана в патенте UA 67626 в модели экспериментального хронического стресса. Патент RU № 2180598 раскрывает применение Даларгина для лечения токсического гепатита у пациентов с хронической наркоманией. Эффективность Даларгина была продемонстрирована в терапии вирусных заболеваний в патентах RU № 2261722 (лечение скрытой формы генитального герпеса у женщины с синдромом потери плода), RU № 2167671 (терапия клещевого энцефалита). Публикация MD1413F раскрывает применение Даларгина для лечения слизистой оболочки полости рта и красного плоского лишая, а публикация MD1296F предоставила данные по терапии Даларгином плоского лишая. В патенте RU № 2008131509 представлена фармацевтическая композиция для терапии демиелинизирующих заболеваний, которая включала Даларгин. Патент RU № 2218896 раскрывает применение Даларгина для лечения буллезной кератопатии. Публикации MD1963F и MD1610F освещают применение Даларгина при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите, а патент RU № 2230549 - для терапии аллергических дерматозов. Публикация Донцова А.В. [19] показала эффективность Даларгина как средства, корректирующего цитокиновый профиль у пациентов с ишемической болезнью сердца и метаболическим синдромом. Вместе с тем, настоящее изобретение, заявляя эффективность Даларгина в терапии ожогов, принципиально отличается от перечисленных работ, которые имеют отношение к лечению других заболеваний.

Резюмируя вышеизложенное можно заключить, что Даларгин является очень перспективным для клинической разработки препаратом, комплексное действие которого, устраняя патофизиологические процессы (оксидативный стресс, ПОЛ, гипервоспалительная и ноцицептивная реакция) и усиливая репаративные процессы, обеспечивает неоспоримые преимущества этого препарата в местной терапии раневых и ожоговых поражений кожи.

Наиболее близким аналогом заявляемого изобретения является средство для наружного применения Д-Пантенол, обладающее ранозаживляющими и противоожоговыми свойствами, содержащее в 1 г: в качестве активного вещества декспантенол - 50 мг, вспомогательные вещества: фенолип - 4 мг; ланолин - 160 мг; пчелиный воск белый - 50 мг; парафин белый мягкий - 210,8 мг; диметикон - 5 мг; эмульгатор Lanette SX - 20 мг; пропиленгликоль - 20 мг; бутилгидроксианизол - 0,1 мг; бутилгидрокситолуен - 0,1 мг; декаметилциклопентасилоксан - 20 мг; магния сульфата гептагидрат - 5 мг; протегин В - 295 мг; вода очищенная - 160 мг (РЛС, статья Д-Пантенол (D-Panthenol), Последняя актуализация описания производителем 19.09.2017, [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_12869.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_12869.htm)).

Действующим веществом указанного средства является декспантенол, механизм действия которого направлен на стимуляцию регенерации кожи, нормализацию клеточного метаболизма, увеличение прочности коллагеновых волокон. И поэтому очевидный недостаток указанного средства состоит в том, что в нем не затрагиваются иные биологические механизмы, возникающие при поражении кожи и участвующие в заживлении ран.

### **Раскрытие изобретения**

Исходя из изложенного, задачей изобретения является создание средства для уменьшения отечности и гиперемии кожи, нормализации лимфоцитарно-нейтрофильного индекса и стимуляции формирования волокнистых элементов в рубцовой ткани при раневых или ожоговых поражениях кожи.

Техническим результатом заявленного изобретения является:

использование гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина для стимуляции процессов регенерации тканей в области ран, снижение выраженности продуктивного воспаления после термической травмы, уменьшение отечности и гиперемии;

выраженный ранозаживляющий и противоожоговый эффект заявленного вещества в составе композиции для наружного применения, которое обеспечивается комплексным действием, как-то устранение патофизиологических процессов (оксидативный стресс, ПОЛ, гипервоспалительная и ноцицептивная реакция) и усиление репаративных процессов, обеспечение неоспоримых преимуществ этого препарата в местной терапии раневых и ожоговых поражений кожи.

Для решения данной задачи предлагается средство для уменьшения отечности и гиперемии кожи, нормализации лимфоцитарно-нейтрофильного индекса и стимуляции формирования волокнистых элементов в рубцовой ткани при раневых или ожоговых поражениях кожи, предназначенное для ежедневного однократного применения до заживления раны, в виде лекарственной формы для наружного применения, состоящее из активного вещества гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина - 0,02-0,5 мас.%, фармацевтически приемлемой добавки/фармацевтически приемлемых добавок - остальное.

В частном случае осуществления изобретения средство представляет собой раствор, который содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина и фармацевтически приемлемую добавку при следующем соотношении компонентов: гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина - 0,02-0,5 мас.%, вода очищенная - до 100%.

В частном случае осуществления изобретения средство представляет собой гель, который содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина и фармацевтически приемлемые добавки при следующем соотношении компонентов: гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина - 0,02-0,5 мас.%, гидроксипропилцеллюлоза - 2,5-3 мас.%, сорбат калия - 2-3 мас.%, вода очищенная - до 100%.

#### Краткое описание чертежей и других поясняющих материалов

Таблица 1. Динамика отека ожоговой раны (баллы) как реакции на термическую травму, где \* - статистически значимые различия по сравнению с группой контроля, \*\* - статистически значимые различия по сравнению с группой, получавшей Декспантенол.

Таблица 2. Динамика гиперемии ожоговой раны (баллы), где \* - статистически значимые различия по сравнению с группой контроля, \*\* - статистически значимые различия по сравнению с группой, получавшей Декспантенол.

Таблица 3. Результаты планиметрического исследования (гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в виде раствора): площадь ожога (в см<sup>2</sup>), где \* - статистически значимые различия по сравнению с группой контроля, \*\* - статистически значимые различия по сравнению с группой, получавшей Декспантенол.

Таблица 4. Результаты планиметрического исследования (гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в виде геля): площадь ожога (в см<sup>2</sup>), где \* - статистически значимые различия по сравнению с группой контроля, \*\* - статистически значимые различия по сравнению с группой, получавшей Бепантен.

Фиг. 1 - средняя скорость заживления ожоговых ран (см<sup>2</sup>/сутки), где I - контроль, II - декспантенол, III - гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина (0,02-0,5% раствор).

Фиг. 2 - динамика изменений лимфоцитарно-нейтрофильного индекса после термической травмы, где по оси ординат - значения индекса, по оси абсцисс - дни наблюдения,  $\blacktriangleleft$  - контроль,  $\blacktriangleright$  - декспантенол,  $\blacksquare$  - гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина (0,02-0,5% раствор).

Фиг. 3 - влияние на заживление кожной раны, где по оси абсцисс - дни наблюдения, по оси ординат - средний линейный размер раны,  $\blacktriangleleft$  - контроль,  $\blacktriangleright$  - декспантенол,  $\blacksquare$  - гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина (0,02-0,5% раствор).

Фиг. 4 - средняя скорость заживления ожоговых ран (см<sup>2</sup>/сут.), где I - контроль, II - бепантен, III - гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина (0,02%-й гель), IV - гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина (0,5% гель).

#### Осуществление изобретения

Пример 1.

Получение средства в виде раствора для лечения ран и ожоговых поражений кожи для наружного применения.

Производство композиции, содержащей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в виде раствора для наружного применения, включает приготовление раствора гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина, заполнение флаконов, проверка качества раствора.

В очищенную воду 200 мл при перемешивании прибавляют расчетное количество даларгина 0,04-1,0 г и перемешивают до полного растворения. Полученный раствор пропускают через стерилизующий фильтр (размер пор 0,22 мкм) и таким образом получают раствор для наружного применения.

Композиция для наружного применения.

Название	Содержание в г.
Гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина	0,02-0,5
Вода очищенная	до 100 мл

## Пример 2.

Получение средства в виде геля для лечения раневых и ожоговых поражений кожи для наружного применения.

Для приготовления 150 мл заявляемого геля берут:

гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина - 0,04-0,75 г,

вода очищенная - 135-139 мл,

гидроксиэтилцеллюлоза - 4-4,5 г,

сорбат калия - 3-4 г.

В реактор залить заданное по рецептуре количество воды, включить перемешивание, ввести сыпучие компоненты, перемешивать до полного расплавления, затем ввести остальные компоненты в рецептурных количествах. Продолжить перемешивание в течение 30 мин до образования однородной эмульсии. Отобрать пробу на анализ. Если значения анализируемых показателей соответствуют нормативным документам, то готовый полупродукт выгрузить в промежуточную емкость, передать на фасовку.

Состав геля, содержащего гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина.

Название	Содержание масс %
гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина	0,02-0,5
Гидроксиэтилцеллюлоза	2,5-3
Сорбат калия	2-3
Вода очищенная	до 100

## Пример 3.

Данные эксперимента по изучению эффективности гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина на модели ожога у крыс.

Оценка эффективности местного применения гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в терапии термических ожогов выполнялась при моделировании ожога II-IIIА степени у 30 нелинейных крыс-самцов. Животные находились в режиме виварного содержания (температура окружающей среды 19-23°C) в соответствии с нормами надлежущей лабораторной практики Евразийского экономического союза, а также актуальными руководствами [20].

В качестве термического агента использовали плоскодонные стеклянные сосуды соответствующего диаметра, на 2/3 наполненные жидким парафином. Перед аппликацией на кожу емкости предварительно нагревали на водяной бане. Животные были рандомизированы на три группы (n=10 в каждой группе): контрольная и две опытные. В качестве сравнения был выбран другой стимулятор репарации тканей - Декспантенол (мазь для наружного применения 5%). Все крысы получали ожоги нормированной площади, составляющей  $\approx 40 \text{ см}^2$ .

После нанесения термической травмы в течение первых 20 мин животным контрольной группы накладывали асептическую повязку с дальнейшей терапией йодпироном и левомеколем (группа I); в опытных группах дополнительно использовали исследуемые лекарственные средства Декспантенол (группа II) или 0,02-0,5% раствор гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина (группа III, которую составляли 5 животных, получавших 0,02% раствор и 5 животных, получавших 0,5% раствор).

В ходе эксперимента оценивали общее состояние животных, давали макроскопическую оценку выраженности отека тканей в области ожога, гиперемии, инфильтрации, характеру раневого отделяемого, эпителизации раневого дефекта. Указанные симптомы оценивали в баллах: максимальная выраженность симптома оценивалась в 3 балла, его отсутствие - 0 баллов. Объективную оценку процесса заживления осуществляли по результатам планиметрии. Все наблюдения осуществляли в 1-, 3-, 5-, 7- и 10-е сутки эксперимента.

Скорость заживления определяли по формуле  $V=(S1-S2)/t$  (где S1 - величина площади раны при предыдущем измерении; S2 - величина площади раны при последующем измерении; t - количество суток между предыдущим и последующим измерениями).

Также в эксперименте оценивали реакцию лейкоцитарного пула - как отношение абсолютного количества лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов венозной крови.

Результаты. В 1-е сутки исследования общее состояние всех экспериментальных животных оценивалось как средней степени тяжести, что было обусловлено объемом нанесенной термической травмы. Животные мало двигались в пределах клетки, большую часть времени спали и слабо реагировали на внешние раздражители.

К 3-м суткам отмечали увеличение их активности, подвижности, животные проявляли оборонительную реакцию при извлечении из клетки, появился аппетит и т.п. Различий в общем состоянии жи-

вотных между экспериментальными группами выявлено не отмечалось. В табл. 1 приведены изменения отечности ожоговой раны и прилежащих тканей. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что первоначальный отек как реакция на термическую травму и сроки его исчезновения были значительно меньшими в группе, получавшей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина, как по сравнению с контрольной группой, так и с группой, получавшей декспантенол.

Таблица 1

Группа	День после нанесения термической травмы				
	1-й	3-й	5-й	7-й	10-й
группа I (контрольная)	3,0±0,3	2,0±0,4	0,9±0,3	0,3±0,3	0,0±0,0
группа II (Декспантенол)	2,0±0,5*	1,3±0,4	0,7±0,5	0,3±0,3	0,0±0,0
группа III (гексапептид тирозил-D-аланил- глицил- фенилаланил- лейцил-аргинина)	1,0±0,4**	0,7±0,4 *	0,3±0,2*	0,0±0,0	0,0±0,0

Подобная динамика отмечалась и при оценке гиперемии (табл. 2). Использование препаратов уже в 1-е сутки уменьшало выраженность покраснения кожного покрова. Причем гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина значительно превосходит декспантенол по снижению динамики гиперемии.

Таблица 2

Группа	День после нанесения термической травмы				
	1-й	3-й	5-й	7-й	10-й
группа I (контрольная)	2,6±0,2	1,5±0,3	0,7±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0
группа II (Декспантенол)	1,8±0,2*	1,4±0,2	0,5±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0
группа III (гексапептид тирозил-D-аланил- глицил- фенилаланил- лейцил-аргинина)	0,8±0,3**	0,7±0,2**	0,0±0,0**	0,0±0,0	0,0±0,0

При выполнении планиметрии отмечалась выраженная статистически значимая положительная динамика заживления ожоговых ран у животных группы III (гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина). Она характеризовалась достоверным снижением площади ожога уже на 3-и сутки эксперимента, уменьшением глубины ожога и, как следствие, более благоприятным течением раневого процесса. Результаты в группах II и III также показали преимущества гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в динамике сокращения площади ожогового поражения (табл. 3).

Таблица 3

Группа	День после нанесения термической травмы					
	1-й	3-й	5-й	7-й	10-й	14-й
группа I (контрольная)	40±2	23±2	20±3	18±2	15±2	12±2
группа II (Декспантенол)	40±2	18±3	15±2*	13±2*	12±3	7±3
группа III (гексапептид тирозил-D-аланил- глицил- фенилаланил- лейцил-аргинина)	40±2	12±3**	11±2	8±2**	6±2**	0±0**

Средняя скорость заживления представлена на фиг. 1. Статистически значимые различия выявлены только между контрольной и группой, получавшей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина.

Динамика изменения лимфоцитарно-нейтрофильного индекса.

Принимая во внимание, что физиологической особенностью крыс как биологической модели является преобладание в периферической крови моноцитарного пула лейкоцитов (в норме у животных лимфоциты составляют 65-77% всех лейкоцитов), было исследовано изменение лейкограмм в экспериментальных группах путем оценки лимфоцитарно-нейтрофильного индекса (отношения количества лимфоцитов к сегментоядерным нейтрофилам).

Анализ показал, что в 1-е сутки наблюдения отмечалось выраженное снижение лимфоцитарно-нейтрофильного индекса, что свидетельствовало о закономерной реакции, обусловленной термической травмой. Динамика изменений лимфоцитарно-нейтрофильного индекса, показанная на фиг. 2, демонстрирует статистически значимые различия по этому показателю между группой I (контрольной) и группой III (гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина). В группе III этот показатель нормализовался уже к 7-у дню, сохраняя тенденцию к увеличению в других группах животных.

Таким образом, местное применение гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина сразу после термической травмы позволяет уменьшить отечность и гиперемию. При этом отмечается выраженная эффективность по таким показателям, как площадь раневой поверхности, средняя скорость заживления раны, а также динамика лимфоцитарно-нейтрофильного индекса.

Полученные в доклиническом эксперименте результаты свидетельствуют о высокой эффективности гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина как для оказания первой помощи, так и дальнейшего лечения поверхностных ожогов средней степени тяжести. Кроме того, полученные результаты позволяют утверждать, что гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина также может применяться для подготовки раневых поверхностей глубоких ожогов к последующей трансплантации кожи, а также в терапии трофических язв у ослабленных пациентов с низким регенераторным потенциалом.

Пример 4.

Данные эксперимента по изучению эффективности гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в модели плоскостных ран у крыс.

Исследование проводилось на самцах белых крыс линии Wistar. Все животные случайным образом были разделены на три группы по 13 особей в каждой:

I) контрольная группа (без лечения);

II) группа сравнения (Бепантен, крем для наружного применения, с содержанием декспантенола - 5%) и

III) опытная группа (гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина).

Опытную группу составляли пять животных, получавших 0,02% раствор, и пять животных, получавших 0,5% раствор), в тексте приведены средние данные по статистике в этой группе.

Линейные раны представляли собой продольный разрез кожи и подкожной жировой клетчатки по средней линии спины длиной около 4 см. После разреза края раны сближали, накладывая три шва на равном расстоянии друг от друга. Начиная со дня операции, животным наносили исследуемые препараты, группа контроля получала плацебо. В каждой группе три крысы предусматривались для выполнения тензиометрического исследования - с эвтаназией на 7-й день эксперимента. Сразу после достижения полного заживления (на 25-26-е сутки) были взяты образцы для выполнения гистологического исследования.

Сравниваемые препараты наносили однократно в сутки, ежедневно, в течение 20 дней. Оценку ра-

нозаживляющего действия проводили по характеру клинического течения (наличие гнойного воспаления, динамике срастания краев раны) на 4-, 7-, 15- и 20-е сутки эксперимента.

На фиг. 3 представлены результаты визуального контроля, наглядно демонстрирующие более интенсивное заживление линейной раны в опытной группе (гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина), по сравнению как с контрольной, так и группой активного сравнения.

Как известно, 15-20-е сутки, соответствующие третьей фазе заживления, характеризуются эпителизацией и формированием рубца. Однако в контрольной группе даже на 20-е сутки наблюдения не наблюдалось полного заживления, сохранялся струп, а полная эпителизация в этой группе происходила только на 25-26-е сутки.

В группе контроля по данным микроскопического исследования в интактной зоне коллагеновые волокна были рыхло расположены и характеризовались большей толщиной по сравнению с областью заживления линейной раны, где коллагеновые волокна были значительно тоньше, и сохранялось большое количество капиллярных сосудов, т.е. имели место все признаки незрелости образовавшегося рубца. При этом отмечалась незавершенная регенерация эпителия в зоне консолидации краев раны. В структуре рубца отмечались очагово-диффузные воспалительные инфильтраты. Грануляционная ткань распространялась глубоко в дерму практически до границы с подкожной жировой клетчаткой.

В группе, получавшей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина, рубец заканчивался по глубине волосяных фолликулов, отмечалось запустевание сосудов, в рубцовой ткани отмечали преобладание волокнистых элементов над клеточными, что свидетельствовало о стадии завершения формирования рубца.

Промежуточные результаты гистологического исследования (между группой контроля и группой, получавшей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина) были обнаружены для группы терапии кремом Бепантен.

Данные тензиометрического измерения показали весомое превосходство гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина по сравнению с группой контроля - более чем в 2 раза.

Пример 5.

Данные эксперимента по изучению эффективности гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина, примененного в виде 0,02 и 0,5% геля на модели ожога у крыс.

Оценка эффективности местного применения гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в терапии термических ожогов выполнялась на основе модели ожога II-III степени у 40 нелинейных крыс-самцов. Животные находились в режиме виварного содержания в соответствии с нормами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза, а также актуальными руководствами [20]. Роль термического агента выполняли плоскодонные стеклянные сосуды соответствующего диаметра, на 2/3 наполненные жидким парафином, предварительно нагреваемые на водяной бане перед аппликацией на кожу. Животных рандомизировали на четыре группы (n=10 в каждой группе): I - контрольная и три опытные. В качестве сравнения был выбран широко распространенный препарат для репарации тканей - Бепантен (крем для наружного применения, содержащий 5% декспантенол). Площадь ожоговой поверхности была нормирована и составляла  $\approx 40 \text{ см}^2$ .

В качестве контроля использовали асептическую повязку, накладываемую в течение первых 20 мин после ожога, с дальнейшей терапией йодпироном и левомеколом (I группа). Группа II в качестве терапии получала Бепантен. Группа III получала гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в виде 0,02% геля для наружного применения, и группа IV получала гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в виде 0,5% геля для наружного применения.

В ходе эксперимента помимо мониторинга общего состояния животных на 1-, 3-, 5-, 7- и 10-е сутки эксперимента давали планиметрическую оценку процесса заживления. Скорость заживления определяли по формуле  $V=(S1-S2)/t$  (где S1 - величина площади раны при предыдущем измерении; S2 - величина площади раны при последующем измерении; t - количество суток между предыдущим и последующим измерениями).

Результаты.

В 1-е сутки исследования общее состояние всех экспериментальных животных соответствовало средней степени тяжести. Улучшение состояния и увеличение активности наблюдались к 3-м суткам эксперимента. На этом этапе не наблюдалось различий в общем состоянии животных между экспериментальными группами.

В табл. 4 приведены результаты планиметрии. Отмечалась выраженная статистически значимая положительная динамика заживления ожоговых ран у животных групп III и IV (гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина 0,02 и 0,5% соответственно). Она характеризовалась достоверным (как по сравнению с группой контроля, так и с группой, получавшей Бепантен) снижением площади ожога уже на 3-и сутки эксперимента, уменьшением площади и глубины ожога и, как следствие, более благоприятным течением раневого процесса. Статистически значимых отличий между группами III и IV не обнаружено, хотя у группы IV имеется тенденция более выраженного сокращения ожоговой площади, чем в группе III (табл. 4).



Таблица 4

Группа	День после нанесения термической травмы					
	1-й	3-й	5-й	7-й	10-й	14-й
группа I (контрольная)	40±2	24±3	22±3	18±3	16±4	12±3
группа II (Бепантен)	40±2	19±3	16±2*	14±2	12±3	8±3
группа III (гексапептид тирозил-D-аланил- глицил- фенилаланил- лейцил-аргинина 0,02% гель)	40±2	14±3	12±3**	9±2**	7±2	2±2**
группа IV (гексапептид тирозил-D-аланил- глицил- фенилаланил- лейцил-аргинина, 0,5% гель)	40±2	11±3**	10±3**	7±2**	5±2**	0±0**

Средняя скорость заживления представлена на фиг. 4. Статистически значимые различия выявлены только между группой контроля I и группами, получавшими гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в виде геля (как 0,02, так и 0,5%). Несмотря на более хорошие показатели скорости заживления раны у группы IV, достоверных различий в сравнении с группой III не выявлено, что объясняется малой выборкой исследования. Результаты подтверждают выраженную эффективность гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в виде 0,02 или 0,5% геля в отношении сокращения как площади ожоговой поверхности, так и средней скорости заживления ожоговых ран.

Полученные в доклиническом эксперименте результаты свидетельствуют о высокой эффективности гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина как для оказания первой помощи, так и для дальнейшего лечения поверхностных ожогов средней степени тяжести. Полученные результаты позволяют утверждать, что гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина, в лекарственной форме "гель для наружного применения" или "раствор для наружного применения", может применяться для подготовки раневых поверхностей глубоких ожогов к последующей трансплантации кожи, а также в терапии трофических язв у пациентов с низким регенераторным потенциалом. Терапевтический диапазон концентраций для гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина в лекарственных формах раствор для наружного применения или гель для наружного применения составляет 0,02-0,5%.

Список литературы.

[1] Всемирная организация здравоохранения, Информационный бюллетень, август 2017 г., ссылка: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru>.

[2] Алексеев А. А. Современные методы лечения ожогов и ожоговой болезни //Комбустиология (эл. версия). – 1999. – №. 1.

[3] Зохиров А. Н. и др. Влияние синтетического аналога опиоидных пептидов даларгина на антиоксидантный статус собак //Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2016. – №. 9.

- [4] Львова С. П., Горбунова Т. Ф., Абаева Е. М. Влияние гипотермии и даларгина на перекисное окисление липидов в тканях крыс //Вопросы медицинской химии. – 1993. – Т. 39. – №. 3. – С. 21-24.
- [5] Жмеренецкий К. В. Микроциркуляция и влияние на нее лекарственных препаратов разных классов при сердечнососудистых заболеваниях: Дис... д-ра мед. наук. – 2013.
- [6] Заболотских И. Б., Чуприн С. В., Курзанов А. Н. Дозозависимые эффекты даларгина в анестезиологии и интенсивной терапии //Вестник интенсивной терапии. – 2002. – №. 4. – С. 75-79.
- [7] Шехтер А. Б. и др. Влияние опиопептида даларгина на репаративные процессы при заживлении ран //Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. – 1988. – №. 10. – С. 487-490.
- [8] Панькова Т. Д., Тимошин С. С. Доказательства реализации стимулирующего эффекта даларгина на процесс клеточного деления через опиатные рецепторы //Бюл. экспер. биол. и мед. – 1990. – №. 7. – С. 96-98.
- [9] Носков А. А. и др. Влияние препарата даларгин на регенерацию кожи после ожога у крыс //Актуальные вопросы медицины в современных условиях. – 2017. – С. 59-60.
- [10] Инструкция по применению лек. препарата для мед. применения Даларгин-Деко (ЛП-004596, интернет портал РГЛС <https://grls.rosminzdrav.ru/>, дата обращения 31.01.2018).
- [11] Тимошин С. С., Алексеенко С. А., Штука А. А. Влияние даларгина на репаративную способность гастродуоденальной слизистой оболочки у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки //Клиническая медицина. – 1991. – Т. 69. – №. 3. – С. 75-77.
- [12] Алексеенко С. А. и др. Влияние даларгина на репаративную способность слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при различных гастроэнтерологических заболеваниях //Дальневосточный медицинский журнал. – 2010. – №. 3.
- [13] Виноградов В. А., Полонский В. М., Смагин В. Г. Влияние даларгина на репаративные процессы в слизистой оболочке гастро-дуоденальной зоны //Бюлл. ВКНЦ. – 1982. – №. 5. – С. 40-42.
- [14] Максакова Е. В. Даларгин в лечении травматических повреждений роговицы //Офтальмолог. журнал. – 2000. – №. 6. – С. 95-97.
- [15] Дас Д.К., Молик Н. Превращение сигнала гибели в сигнал выживания при редокс-сигнализации // Биохимия. - 2004. - Т. 69, №1. - С. 16-24.

[16] Животова Е. Ю., Лебедько О. А., Тимошин С. С. Влияние структурных аналогов лей-энкефалина на процессы синтеза ДНК и свободнорадикальное окисление в слизистой оболочке желудка белых крыс //Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – №. 1.

[17] Балачевский Б. В., Курзанов А. Н., Славинский А. А. Даларгин-индуцируемая модуляция функционально-метаболической активности нейтрофильных лейкоцитов //Успехи современного естествознания. – 2008. – №. 5.

[18] Донцов В. И. и др. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении //Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С. 50-69.

[19] Донцов А. В. Эффективность Даларгина в коррекции цитокинового профиля у больных ИБС и метаболическим синдромом //Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2013. – №. 1.

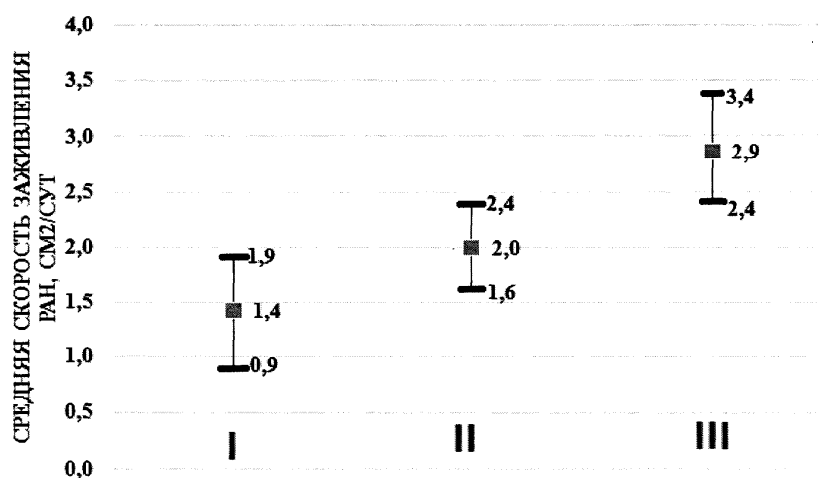
[20] Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. - 944 с.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

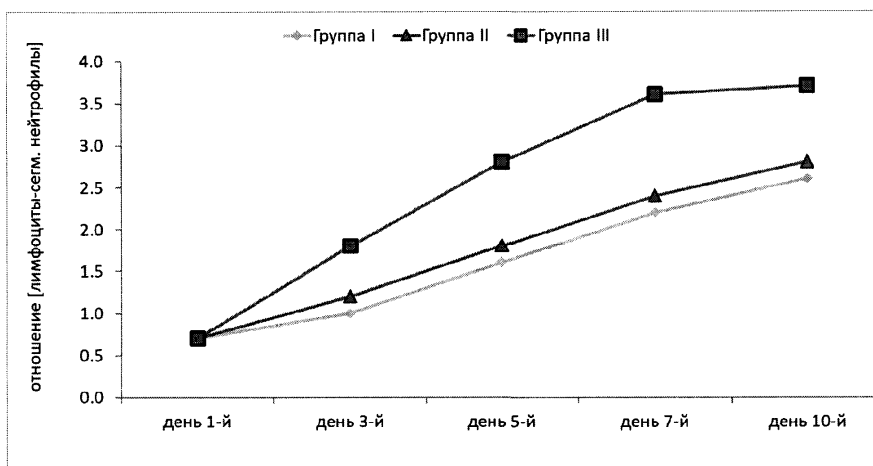
1. Средство для уменьшения отечности и гиперемии кожи, нормализации лимфоцитарно-нейтрофильного индекса и стимуляции формирования волокнистых элементов в рубцовой ткани при раневых или ожоговых поражениях кожи, предназначенное для ежедневного однократного применения до заживления раны, в виде лекарственной формы для наружного применения, состоящее из активного вещества гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина - 0,02-0,5 мас.%, фармацевтически приемлемой добавки/фармацевтически приемлемых добавок - остальное.

2. Средство по п.1, отличающееся тем, что представляет собой раствор, который содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина и фармацевтически приемлемую добавку при следующем соотношении компонентов: гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина - 0,02-0,5 мас.%, вода очищенная - до 100%.

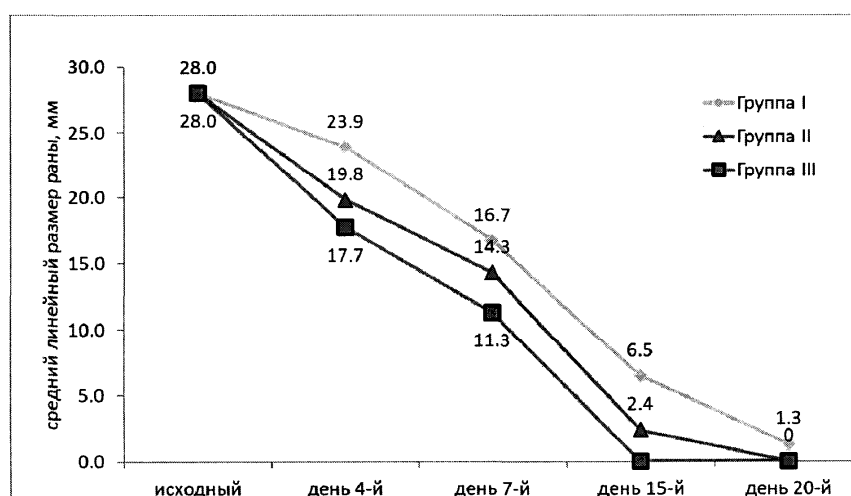
3. Средство по п.1, отличающееся тем, что представляет собой гель, который содержит гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина и фармацевтически приемлемые добавки при следующем соотношении компонентов: гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина - 0,02-0,5 мас.%, гидроксипропилцеллюлоза - 2,5-3 мас.%, сорбат калия - 2-3 мас.%, вода очищенная - до 100%.



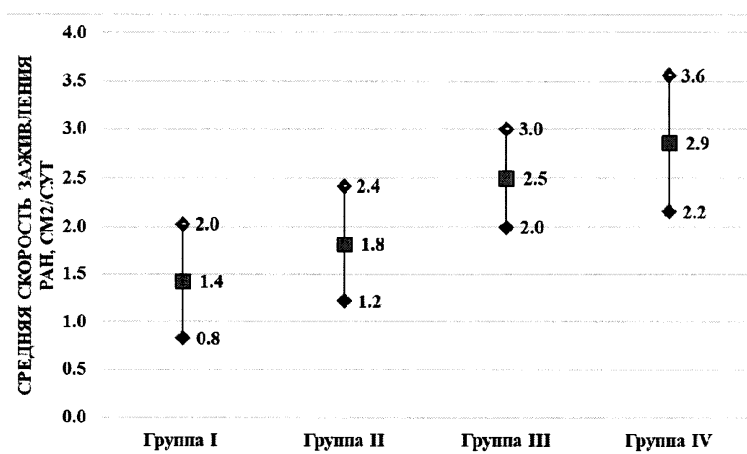
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4