



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61K 35/64 (2006.01); A61K 2121/00 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016101207, 15.01.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
15.01.2016

Дата регистрации:  
04.04.2018

Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 15.01.2016

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2017 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 04.04.2018 Бюл. № 10

Адрес для переписки:  
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВПО  
"Алтайский государственный университет",  
отдел охраны интеллектуальной собственности  
ООИС

(72) Автор(ы):  
Кейно Виктор Викторович (RU),  
Горячева Ксения Валерьевна (RU),  
Смирнов Иван Владимирович (RU),  
Бондарев Александр Александрович (RU),  
Дыгай Александр Михайлович (RU),  
Жданов Вадим Вадимович (RU),  
Шунк Александр Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования "Алтайский  
государственный университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: ГОРЯЧЕВА К.В. и др.  
Исследование влияния гомогената  
трутневой личинки на функциональную  
активность кроветворных клеток-  
предшественников в системе in vitro //  
Материалы 82-й Всероссийской  
Байкальской научно-практической  
конференции молодых учёных и студентов  
с международным участием, посвященной  
95-летию ИГМУ и 170-летию со дня  
рождения И.И. (см. прод.)

(54) Средство гемостимулирующего действия

(57) Реферат:  
Изобретение относится к фармакологии, а  
именно к средству гемостимулирующего действия.  
Средство гемостимулирующего действия,  
обладающее эффектом пролиферации и  
дифференцировки лейкоцитарного ростка крови  
in vivo, выделенное из гомогената трутневых  
личинки, взятых через 10-12 суток после засева  
маткой сота, измельченных в мясорубке,

отфильтрованных через сито, при этом  
нефильтруемый остаток прессуется,  
гомогенизируется, смешивается с  
отфильтрованной жидкостью и замораживается  
при определенных условиях. Вышеописанное  
средство позволяет расширить арсенал средств,  
обладающих гемостимулирующим эффектом. 2  
табл.

RU 2 649 817 C2

RU 2 649 817 C2

(56) (продолжение):

Мечникова "Актуальные вопросы современной медицины". Иркутск: ИНЦХТ, 2015 (20-22 апреля 2015 г). С. 30-31. RU 2258522 С1, 20.08.2005. МИНИНА С.А. и др. Химия и технология фитотерапии. М.: ГЭОТАР - Медиа, 2009. С. 82-97. RU 2505308 С1, 27.01.2014.

R U 2 6 4 9 8 1 7 C 2

R U 2 6 4 9 8 1 7 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 35/64* (2015.01)  
*A61P 7/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 35/64* (2006.01); *A61K 2121/00* (2006.01)(21)(22) Application: **2016101207, 15.01.2016**(24) Effective date for property rights:  
**15.01.2016**Registration date:  
**04.04.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **15.01.2016**(43) Application published: **20.07.2017** Bull. № 20(45) Date of publication: **04.04.2018** Bull. № 10

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VPO  
"Altajskij gosudarstvennyj universitet", otdel  
okhrany intellektualnoj sobstvennosti OOIS**

(72) Inventor(s):

**Kejno Viktor Viktorovich (RU),  
Goryacheva Kseniya Valerevna (RU),  
Smirnov Ivan Vladimirovich (RU),  
Bondarev Aleksandr Aleksandrovich (RU),  
Dygaj Aleksandr Mihajlovich (RU),  
Zhdanov Vadim Vadimovich (RU),  
Shunk Aleksandr Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
professionalnogo obrazovaniya "Altajskij  
gosudarstvennyj universitet" (RU)**(54) **MEANS OF HEMOSTIMULATING ACTION**

(57) Abstract:

FIELD: pharmacology.

SUBSTANCE: invention relates to pharmacology, namely to means of hemostimulating action. Means of hemostimulating action, which has the effect of proliferation and differentiation of the leukocyte germ of the blood in vivo, isolated from the homogenate of the ternary larvae, taken 10–12 days after inoculation

of the honeycomb, ground in a meat grinder, filtered through a sieve, while the unfiltered residue is compressed, homogenized, mixed with the filtered liquid and frozen under certain conditions.

EFFECT: above described means allow to expand the range of means having a hemostimulating effect.

1 cl, 2 tbl

C 2  
7  
1  
8  
6  
4  
9  
2  
R UR U  
2  
6  
4  
9  
8  
1  
7  
C 2

Изобретение относится к медицине и фармации, конкретно к фармакологии, фармакогнозии и гематологии.

Нормализация уровня лейкоцитов является важнейшим условием и необходимым этапом эффективного комплексного лечения онкозаболеваний. Традиционно ее проводят при помощи комбинаций различных фармакологических средств. Чаще всего степень лейкопении определяет выбор используемых препаратов для корректировки этого негативного эффекта лечения. Например, при лейкопении легкой степени ( $1-1,5 \times 10^9/\text{л}$ ) применяют стимуляторы лейкопоэза различного происхождения (лейкоген, метилурацил). При лейкопении умеренной степени ( $0,5-1 \times 10^9/\text{л}$ ) добавляют глюкокортикоиды и при тяжелой степени ( $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ ) в ход уже идут комбинации из антибиотиков, глюкокортикоидов, стимуляторов лейкопоэза (лейкоген, метилурацил) и колониестимулирующих факторов (КСФ). КСФ изменили взгляд на профилактику и лечение лейкопений. Такие препараты как граноцит, лейкомакс, нейпоген ускоряют созревание лейкоцитов, увеличивают продолжительность их жизни и высвобождают лейкоциты из костного мозга [Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Роль гемопозиндуцирующего микроокружения в регуляции кроветворения при цитостатических миелосупрессиях // Томск: СТТ. - 1999. - С. 33-84].

Недостатки: высокая стоимость препаратов этого ряда ограничивает их применение, ограниченная доступность препарата.

Одним из близких по достигаемому результату препаратов является ленограстим, один из препаратов гликозирванного гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора. Его недостатками являются сложная технология производства и очистки и, как следствие, большая стоимость; высокая частота побочных эффектов, а также инъекционный тип введения, как единственно возможный для белкового препарата, что создает трудности для приема пациентом самостоятельно. [Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Гриф и К // - 2012. - 944 с.].

Наиболее близким к заявленному решению по назначению и совокупности существенных признаков является исследование влияния гомогената трутневой личинки на функциональную активность кроветворных клеток-предшественников в системе *in vitro* [Горячева К.В. и др. Исследование влияния гомогената трутневой личинки на функциональную активность кроветворных клеток-предшественников в системе *in vitro* // Материалы 82-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, посвященной 95-летию ИГМУ и 170-летию со дня рождения И.И. Мечникова «Актуальные вопросы современной медицины». Иркутск: ИНЦХТ, 2015 (20-25 апреля 2015 г.). - С. 30-31], в котором раскрыто стимулирующее действие гомогената трутневой личинки на образование гранулоцитарных колоний (лейкоцитарных) *in vitro*, исследования *in vivo* не проводились.

Задачей, решаемой настоящим изобретением, является расширение арсенала эффективных и безопасных гемостимулирующих средств.

Используемое средство было разработано и получено ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» НИИ Биологической медицины.

Поставленная задача достигается применением гомогената трутневой личинки (ГЛТ) в качестве средства, влияющего на стимуляцию пролиферации и дифференцировки лейкоцитарного ростка крови.

При исследовании выявлена принципиальная возможность и высокая эффективность управления способностью костномозговых нуклеаров образовывать гранулоцитарные колонии мезенхимальных стволовых клеток с помощью ГЛТ [Горячева К.В., Кейно

В.В., Горячева М.В., Шунк А.А., Бондарев А.А., Смирнов И.В. Изучение биологической активности видов животного сырья / Аллегория и иммунология, том 16, №4, 2015. - Москва.: Изд-во «Медицина-Здоровье». - 414 с.]. При их применении *in vivo* обнаружена выраженная стимуляция пролиферации и дифференцировки в гранулоцитарных колониях.

5 ГЛТ получают следующим образом.

В гнезде пчелосемей ставятся рамки с трутневой вощиной, через 7 дней проводится контроль отстройки сота и засева его маткой, до окукливания личинки. После засева маткой всего сота проводят отбор трутневых запечатанных личинок, извлекают из  
10 рамок сота и пускают на переработку через 10-12 суток. Соты вырезаются ножом из рамок, измельчаются в мясорубке, масса фильтруется через сито с ячейкой 0,8-1,0 мм. Нефильтруемый остаток помещают в ручной винтовой пресс, прессуют, гомогенизируют. Фильтр и жидкость смешивают, разливают в тару и замораживают при температуре не ниже -10°C, получают ГЛТ, который характеризуется следующими свойствами: жидкость слабо-желтого цвета, с запахом прополиса и меда.

15 При появлении «побелки» сотов в гнезде пчелосемей ставится рамка с трутневой вощиной. Рамка ставится между кормовой и крайней расплодной рамкой. Через 7 дней проводится контроль отстройки сота и засева его маткой до окукливания личинки. Дата начала яйцекладки фиксируется в пасечном журнале. После засева маткой всего сота трутневый сот извлекается из гнезда пчелосемей и пускается на переработку через  
20 10-12 суток. В это время трутневые личинки на таком соте запечатаны, но у них еще не появились зачатки глаз, крыльев, ног (фиолетовые пятна на теле личинки). Благоприятно то, что именно в этот момент начинается гистолиз личиночных тканей и формирование тканей и органов взрослого насекомого (имаго).

Вместо извлеченного трутневого сота ставится новая рамка с трутневой вощиной.  
25 Если пчелосемья достаточно развита (занимает более 12 рамок Дадана, 8-10 рамок расплода), то возможна постановка второй рамки с трутневой вощиной. Вторую рамку ставят с противоположной стороны гнезда - данная процедура позволяет получить большее количество гомогената трутневой личинки.

Лимитирующим фактором при отстройке трутневых сотов и их засева маткой является  
30 наличие в природе трутневого взятка. При отсутствии в течение 3-х суток поступления пыльцы прекращается засев маткой трутневых ячеек, а если такой период затягивается более 6 суток, то возможно уничтожение пчелами яиц в трутневых сотах и поедание трутневых личинок. Для предотвращения гибели трутней проводят подкормку пчел или располагают ульи в более выгодных районах, с наибольшим количеством растений,  
35 которые цветут.

Активное строительство трутневых сотов и их засев маткой наблюдается при стабильном, устойчивом взятке нектара и пыльцы - привес контрольного улья 0,5-1,0 кг.

В условиях юго-западной части Алтайского края период строительства и засева  
40 трутневых сотов продолжается до 20 июня, но в отдельные годы возможно продление этого периода до 10 июля. При позднем периоде производства трутневого расплода, после 15-20 июня, и при проявлении сильного взятка с донников возможно попадание нектара и меда в гомогенат трутневых личинок.

Извлечение соты с трутневым расплодом переносят в лабораторию, где соты  
45 вырезаются ножом из рамок. Вырезанные соты измельчаются в мясорубке. Измельченная масса фильтруется через сито с ячейкой 0,8-1,0 мм. Нефильтруемый остаток помещается в ручной винтовой пресс, где и проводится прессование. Фильтрат и жидкость после прессования смешивается, разливается в тару и замораживается при

температуре не ниже  $-10^{\circ}\text{C}$ . Оставшуюся часть при прессовании – жмых - также замораживают. Полученное средство характеризуется следующими свойствами: жидкость слабо-желтого цвета, с запахом прополиса и меда.

5 Вместо рамок с трутневой вошиной можно применить строительные рамки - магазинные рамки. Пчелы на нижнем бруске магазинной рамки строят трутневый сот, который срезают через 10-12 суток после откладки маткой яиц. Использование данных рамок уменьшает стоимость производства ГЛТ.

Исследование гемостимулирующей активности проводили в соответствии с (Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 10 Часть первая. Гриф и К // - 2012. - 944 с.).

ГЛТ вводили группе мышей интрагастрально через зонд.

1. Эксперимент проводят на белых беспородных мышах, массой 22-25 гр. Животным первой группы вводят циклофосфан в дозе 80 мг/кг в 0,2 воды для инъекций внутривбрюшинно.

15 2. Животным второй группы вводили циклофосфан в дозе 80 мг/кг в 0,2 воды для инъекций внутривбрюшинно однократно, а также животные получали гомогенат трутневой личинки внутрижелудочно, объемом 0,2 мл, в течение 5 дней.

3. Третья группа была интактной. В интактной группе был произведен забор крови и костного мозга из бедра кости для определения нормальной функции кроветворения 20 костного мозга и периферической крови.

У мышей первых двух групп забор крови и костного мозга производили на 3, 5, 8 и 10 сутки по 7 мышей из каждой группы. Забор костного мозга производился после эвтаназии мышей эфирным наркозом.

25 Заборы крови проводили следующим образом: мышь усыпляли диэтиловым эфиром, затем декапитировали, пробирку смачивали 10%-ным раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты, далее в нее добавляли кровь из декапитированной мыши, аккуратно перемешивали.

Для подсчета общего количества эритроцитов (ОКЭ) в новую пробирку наливали 4 мл физиологического раствора, капилляром Сали добавляли 0,02 мл крови, все 30 осторожно взбалтывали, выдерживали пять минут. Заправляли камеру Горяева, выдерживали одну минуту. Подсчитывали общее количество эритроцитов (ОКЭ) в  $5 \times 16$ -и квадратных квадратах по диагонали. Полученное значение делили на 100, получали количество эритроцитов =  $N \times 10^6$  на мышь.

35 Далее производили подсчет общего количества лейкоцитов (ОКЛ). В пробирку к 0,4 мл 3%-ной уксусной кислоты прибавляли 0,02 мл крови капилляром Сали. Перемешивали, заправляли, камеру Горяева, выдерживали 1 минуту. ОКЛ считали в 25 больших квадратах, полученное значение делили на 20. Получали  $N \times 10^6$  лейкоцитов на мышь.

40 Для изучения костного мозга выделяли бедренную кость мыши, очищали ее от мягких тканей, вскрывали мышелок, с другой стороны отрезали кончик этой кости, и препарировали центральный канал 1 мл 3%-ного раствора уксусной кислоты. Костный мозг суспендировали шприцем через иглу. Затем из этой суспензии микропипеткой отбирали 0,05 мл ГЛТ, добавляли 0,45 мл 3% раствора уксусной кислоты, считали общее 45 количество кариоцитов (ОКК) в 5 больших квадратах по диагонали. Полученное число делили на 8 и получали число миелокариоцитов  $N \times 10^6$  на бедро.

Полученные результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Разницу

сравниваемых средних считали достоверной, если показатель достоверности (P) был меньше 0,05.

5 Результаты исследования функции кроветворения костного мозга представлены в таблице 1, показатели ОКК у группы, которая получала первые пять дней ГЛТ на фоне введения циклофосфана, выше, чем у группы, которая получала только циклофосфан (P<0,005). Увеличенное значение ОКК наблюдается на протяжении всего эксперимента и своего максимума достигает на 8 сутки (P>0,005). Наиболее выраженное различие между группами было на десятые сутки, когда в группе, которая получала только циклофосфан, произошло значительное снижение ООК, а у второй группы показатель  
10 ООК незначительно изменился по сравнению с восьмью сутками (P<0,005).

Ускорение восстановления клеточности костного мозга с последующим возрастанием числа зрелых клеток в периферической крови после введения изучаемого вещества на фоне цитостатической миелосупрессии следует рассматривать как проявление гемостимулирующего эффекта у исследуемого препарата.

15 В таблице 2 показано, что введение ГЛТ на третьи сутки во второй группе привело к снижению ОКЛ ниже, чем в группе миелосупрессии (P>0,005), но уже на пятые сутки это значение превышало показатели первой группы (P>0,005). Свой максимум группы ГЛТ достигала на десятые сутки, когда количество ОКЛ было достоверно выше (P<0,005), чем в интактной. В группе, которая получала только циклофосфан, также  
20 наблюдается увеличение показателей ОКЛ, но в меньшей степени (P<0,005) по сравнению со второй группой, и у этой группы показатели не превышали значения интактной.

В ходе эксперимента было установлено, что: гомогенат трутневой личинки обладает выраженным стимулирующим эффектом в отношении пролиферации кариоцитов в костном мозге. Это подтверждает увеличение ОКК; увеличение ОКЛ указывает на то,  
25 что ГЛТ имеет влияние на стимуляцию пролиферации и дифференцировки лейкоцитарного ростка крови. При этом влияние гомогената трутневой личинки на процессы регенерации кроветворной ткани *in vivo* и возможность стимуляции гемопоэза за счет активации родоначальных клеток крови не известны. Эксперимент показал непредсказуемые результаты.

30 Факт применения гомогената трутневой личинки с достижением нового технического результата, заключающегося в стимуляции гемопоэза, для специалиста является не очевидным. Новые свойства не вытекают явным образом из уровня техники в данной области и не обнаружены в патентной и научно-технической литературе. Предлагаемое изобретение может быть использовано в медицине.

35

40

45

Таблица 1.

Динамика содержания общего количества кариоцитов (ОКК) в костном мозге мышей после введения дистиллированной воды(1) либо гомогената трутневой личинки(2) на фоне однократного введения циклофосфана в дозе 80 мг/кг, %

Сроки исследования,сутки	Группы	ОКК,%
До введения		100
3	1	34,23 * p<0,01
	2	49,31 * p<0,01
5	1	23,28*p<0,01
	2	44,9 * p<0,01
8	1	83,26
	2	88,7
10	1	17,95 * p<0,01
	2	66,86 * p<0,05

Примечание: \* - различия достоверны по отношению к интакту

Таблица 2.

Динамика содержания общего количества лейкоцитов (ОКЛ) в периферической крови мышей после введения дистиллированной воды(1) либо гомогената трутневой личинки(2) на фоне однократного введения циклофосфана в дозе 80 мг/кг, %

Сроки исследования,сутки	Группы	ОКЛ,%
До введения		100
3	1	23,18* p<0,01
	2	18,54* p<0,01
5	1	14,57* p<0,01
	2	25,83* p<0,01
8	1	29,14* p<0,01
	2	92,38
10	1	69,21
	2	121,19* p<0,05

Примечание: \* - различия достоверны по отношению к интакту

## (57) Формула изобретения

Средство гемостимулирующего действия, обладающее эффектом пролиферации и дифференцировки лейкоцитарного ростка крови *in vivo*, выделенное из гомогената трутневых личинок, взятых через 10-12 суток после засева маткой сота, измельченных в мясорубке, отфильтрованных через сито с ячейкой 0,8-1,0 мм, при этом нефилтруемый остаток прессуется, гомогенизируется, смешивается с отфильтрованной жидкостью и замораживается при температуре не ниже -10°C.