



УКРАЇНА

(19) UA (11) 28342 (13) A

(51) 5 A61K31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ РЕЧОВИНИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ СЕРЦЕВИХ ЗАХВО-
РЮВАНЬ

(21) 96083095

(22) 01.08.1996

(24) 16.10.2000

(33) UA

(46) 16.10.2000, Бюл. № 5, 2000 р.

(72) Кайдашев Ігор Петрович, Катрушов Олександр Васильович, Куценко Лариса Олександрівна, Павленко Анна Петрівна

(73) УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб одержання біологічно активної речовини для лікування захворювань серця, що включає знежирення та зневоднення подрібненої тканини в органічному розчиннику, кислотну екстракцію, фі-

льтрацію суміші, преципітацію фільтрату органічним розчинником, обробку одержаного осаду ефіром, виділення препарату з наступною його ліофілізацією, який відрізняється тим, що як тканинний матеріал використовують тканини серця великої рогатої худоби або свиней, як органічний розчинник для зневоднення подрібненого матеріалу використовують ацетон, екстракцію здійснюють 1-5% розчином трихлороцтової кислоти з додатковим введенням 0,1% розчину хлориду магнію, а виділення матеріалу проводять фільтрацією екстракту на мембранах, що пропускають молекули з масою менше 10000 Д.

Винахід стосується галузі медицини та може бути використаний у біотехнології та фармації для добування біологічно активної речовини (БАР) поліпептидної природи для лікування захворювань серця.

В теперішній час гостро стоїть проблема лікування захворювань серцево-судинної системи (Лоренс Д.Р., Бенніт П.Н. Клиническая фармакология: В 2-х т.: Пер. с англ. - М.: Медицина, 1993).

Для їх успішного лікування необхідне створення препаратів, що мають виражену метаболічну та регенераторну дію.

Існуючі ж сьогодні препарати для терапії подібної патології або взагалі не мають регенераторного впливу (нітрати, антикоагулянти, антиагреганти, серцеві глікозиди та інші), або ж він мало виражений (АТФ, рибоксин та інші) (М.Д. Машковский. Лекарственные средства, т. 2. - М.: Медицина, 1994. - С. 164-168).

Найбільш близьким до способу, що пропонується, є спосіб одержання біологічно активної речовини, яка має регенераторну та імуномодулюючу дію, зокрема тималіну, що включає зневоднення, подрібнення до розмірів 2×2×2 мм тимуса, попередньо очищеного від жиру, судин та ін., в ацетоні, у співвідношенні 1:8, при 4°C на протязі 12 годин, висушування обробленого тимуса, його екстракцію 3% розчином оцтової кислоти (рН 4,5) в присутності 0,1% хлориду цинку при 4°C на протязі 72 годин, фільтрацію реакційної суміші, преципітацію фільтрату ацетоном, взятим у співвідношенні

1:10 при 4°C на протязі 12 годин, обробку одержаного осаду сумішшю ацетону з ефіром, сушку та ліофілізування продукту (Морозов В.Г., Хавінсон В.Х., Писарев О.А. // Доповіді АН СРСР, 1979, т. 233, № 3. - С. 491). Тималін, одержаний цим способом, знаходить використання як імуномодулятор та препарат, підсилюючий регенераторні процеси (М.Д. Машковский. Лекарственные средства, т. 2. - М.: Медицина, 1995).

Але даний препарат не має органоспецифічності при лікуванні патологій конкретних органів, зокрема, серця, а лише корегує неспецифічні порушення в системах імунітету, гемостазу та неспецифічної резистентності організму.

В основу винаходу поставлене завдання вдосконалення способу одержання біологічно активної речовини, у якому за рахунок використання як тканинного матеріалу тканини серця великої рогатої худоби або свиней, здійсненням екстракції 1-5% розчином трихлороцтової кислоти з додатковим введенням 0,1% розчину хлориду магнію та виділенням матеріалу фільтрацією екстракту на мембранах, що пропускають молекули з масою менше 10000 Д одержують речовину, яка має органоспецифічну регенераторну дію на тканини серця, що забезпечує відновлення порушених структур та функцій серця.

Поставлене завдання вирішується тим, що в спосіб одержання біологічно активної речовини для лікування захворювань серця, що включає знежирення та зневоднення подрібненої тканини в

органічному розчиннику, кислотну екстракцію, фільтрацію суміші, преципітацію фільтрату органічним розчинником, обробку одержаного осаду ефіром, виділення препарату з наступною його модифікацією згідно винаходу вводиться використання як тканинного матеріалу тканин серця великої рогатої худоби або свиней, здійснення екстракції 1-5% розчином трихлороцтової кислоти з додатковим введенням 0,1% розчину хлориду магнію, а виділення матеріалу проводять фільтрацією екстракту на мембранах, що пропускають молекули з масою менше 10000 Д.

Спосіб здійснюється наступним чином. Тканини серця очищають від жиру, сухожильних тканин, подрібнюють до розмірів 2×2×2 мм, після чого зневоднюють ацетоном 24 години при 4°C. Проводять екстракцію 1-5% трихлороцтовою кислотою з 0,1% хлориду цинку і 0,1% хлориду магнію (рН 2,5), що приводить до зменшення рН розчину (більш кисла реакція). Присутність додаткових катіонів магнію забезпечує більшу екстракційну здатність суміші. Екстракція триває 72 години при 4°C при постійному перемішуванні. Після фільтрування реакційної суміші її обробляють ацетоном при 4°C 12 годин. 1-5% розчин кислоти не тільки екстрагує пептидні речовини, але і преципітує великі білки, що засмічують екстракт.

Преципітат розчиняють у дистильованій воді (рН 5,0) та проводять фільтрацію на патронах "Centricon - 10" компанії "Amikon" (США), що забезпечує отримання речовин з вагою <10 кД. Після цього екстракт серцевої тканини ліофілізують з одержанням чистого продукту. Отримана речовина дає позитивні реакції на пептидний зв'язок, цукри, катіони цинку та магнію. Активність БАР умовно названої "кордіалат" вивчалась на моделі ізадринного інфаркту міокарда.

Дослідження було проведено на безпородних білих щурах обох статей, вагою 180-220 г, що утримувались у стандартних умовах.

Моделлю серцевої патології був експериментальний ізадринний некроз міокарда, який відтворювали за методикою. Новодринний некроз міокарда відтворювали шляхом одноразового внутрим'язового введення розчину новодрини в дозі 75 мг на кг ваги тіла. Всі тварини були поділені на 5 груп: перша - інтактні; друга - контрольні до третьої групи, яким вводили новодрин, через 5 хвилин вводили фізіологічний розчин в об'ємі 0,2 мл з наступним забоем через 3 години; третя група - тварини, які одержували кордіалат в дозі 1 мг на кг ваги тіла, при збереженні умов досліду; четверта група - контрольні тварини до п'ятої групи, які одержували новодрин в тій же дозі та фізіологічний розчин з наступним забоем через 15 годин; п'ята група - тварини, які одержували замість фізіологічного розчину кордіалат в тій же дозі, з наступним забоем через 15 годин (Резников К.М., Леонов А.Н., Китаєва Р.И. и др. Моделирование пораженного миокарда различной степени выраженности // Бюл. экспер. биол. и мед. - 1985. - № 5. - С. 532-534).

Контрольним тваринам з інфарктом вводили щодобово 0,5 мл фізіологічного розчину внутрим'язово на протязі 7 діб. Біологічно активну речовину вводили тим же об'ємом з розрахунку 0,1 мг/кг, тималін - 0,1 мг/кг.

У тварин під гексеналовим наркозом забирали кров та тканини серця.

Досліджували вміст малонового діальдегіду Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 249 с., активність супероксиддисмутази Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина // Бюл. эксп. биол. и мед. - 1976. - № 1. - С. 33-35, спонтанний гемоліз еритроцитів Спиричев В.Б., Конь И.Я. Биологическая роль жирорастворимых витаминов: Итоги науки и техники: Серия: Физиология человека и животных. - М.: ВИНТИ, 1989. - т. 37. - С. 220, концентрацію церулоплазмину Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь, 1976. - 311 с., час рекальцифікації: Bergerhof H.D., Roka L. Estimation of plasma recalcification time. - Zschr. Vitamin - Hormon and Fermentforsch. - 1954. - № 6. - P. 25-39, рівень антитромбіну - III Hensen A., Locliger B.A. Antithrombin III: its metabolism and its function in blood coagulation // Stuttgart, 1963. - 160 p. та бета-нафтоловий тест: Балуда В.П., Баркачан З.С., Гольдберг Е.Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. - Томск, 1980. - 320 с.

Тканини міокарду для гістологічних досліджень фіксували 10% формаліном та заливали у парафін. Тканинні зрізи забарвлювали гематоксіліном - еозіном та по Ван - Гізон.

Як видно з табл. 1, розвиток ізадринного інфаркту призводив до підсилення рівню вільнорадикального окислення в крові. Різко зростали процеси перекисного окислення ліпідів, накопичувались кінцеві продукти малонового діальдегіду (МДА), компенсаторно зростала активність антиокислювального ферменту - супероксиддисмутази, знижувалась перекисна резистентність еритроцитів. Різко прискорювались процеси зсідання крові на фоні зниження антитромбінового потенціалу крові та надходження продуктів паракоагуляції у кровообіг (табл. 2). В тканині міокарда розвивався синдром ліпідної пероксидації із виснаженням антиокислювальних систем.

Введення тваринам біологічно активної речовини призводило до значної нормалізації показників, що досліджувалися. В порівнянні з тималіном пептидний комплекс виділений з тканин серця мав більш виражену терапевтичну активність.

Введення БАР, одержаної способом, що пропонується, викликало значне відновлення структури міокарда, покращення процесів зсідання крові та перекисного окислення ліпідів. Отже, біологічно активна речовина тканин серця має значну терапевтичну дію.

Порівняльна характеристика дії вивчаємої БАР та тималіну на показники ПОЛ та АОЗ при відтворенні моделі ізадринного інфаркту міокарду

Вивчаємі показники	Статистичні показники	Інтактні тварини n=10	Ізадринний інфаркт міокарду		
			Контрольні тварини n=10	Введення БАР n=10	Введення тималіну n=10
Рівень малонового діальдегіду до інкубації мкмоль/л (кров)	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	6,53 0,62	8,42 0,58 <0,05	8,31 0,76 <0,05 >0,05	7,39 0,82 >0,05 >0,05
Рівень малонового діальдегіду після інкубації 1,5 год мкмоль/л (кров)	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	11,69 1,14	26,84 1,95 <0,05	16,21 0,98 <0,05 <0,05	18,24 1,72 <0,05 <0,05 >0,05
Приріст малонового діальдегіду за 1,5 год інкубації, %		79 (60-94)	210 (140-270)	120 (96-142)	160 (120-196)
Супероксид--дисмутаза, (Од)	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	1,56 0,14	2,89 0,13 <0,05	1,57 0,17 >0,05 <0,05	2,72 0,15 <0,05 <0,05 <0,05
Спонтанний гемолиз еритроцитів, %	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	11,41 1,99	18,98 1,70 <0,05	12,38 1,64 >0,05 <0,05	15,11 1,56 <0,05 >0,05 <0,05
Церулоплазмін, мг/л	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	274,8 24,4	362,6 20,1 <0,05	283,4 27,1 >0,05 <0,05	328,7 21,2 <0,05 >0,05 <0,05

Таблиця 2

Показники зсідання крові

Вивчаємі показники	Статистичні показники	Інтактні тварини n=10	Ізадринний інфаркт міокарду		
			Контрольні тварини n=10	Введення БАР n=10	Введення тималіну n=10
1	2	3	4	5	6
Час рекальцифікації, с	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	89,4 0,9	62,4 1,1 <0,05	96,2 1,2 <0,05 <0,05	74,8 2,1 <0,05 <0,05 <0,05
Антитромбін-III, %	M	92,4 (83-123)	72,8 (60-91)	101,7 (83-110)	94,5 (73-108)
Бета-нафтоловий тест, бали	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	0	2,8 0,1 <0,05	0,8 0,05 <0,05 <0,05	1,4 0,2 <0,05 <0,05 <0,05

Показники ПОЛ та АОЗ в тканинах міокарду

1	2	3	4	5	6
Вміст малонового диальдегіду до початку інкубації, мкмоль/кг	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	11,42 1,81	13,91 1,08 >0,05	12,09 1,12 >0,05 >0,05	13,27 2,01 >0,05 >0,05 >0,05
Малоновый диальдегід після інкубації, мкмоль/кг	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	12,84 1,35	36,21 2,97 <0,05	28,31 3,04 <0,05 <0,05	34,69 1,25 <0,05 >0,05 <0,05
% накопичення малонового диальдегіду		101 (91-124)	296 (256-319)	205 (185-217)	268 (241-295)
Супероксиддисмутаза, (Од)	M ±m P ₁ P ₂ P ₃	2,04 0,11	0,63 0,13 <0,05	1,82 0,14 >0,05 <0,05	1,21 0,10 <0,05 <0,05 <0,05

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 35 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
