



УКРАЇНА

(19) UA (11) 20471 (13) C2

(51) B A61K35/78

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ З МОРСЬКИХ ОРГАНІЗМІВ КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАЛЬНОГО ЗАСОБУ, РЕПАРУЮЧОГО МЕМБРАНИ ФУНКЦІЙНО РІЗНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ

1

2

(21) 97030997

(22) 06 03 1997

(24) 15 01 2002

(46) 15 01 2002, Бюл. № 1, 2002 р.

(72) Даценко Зоя Михайлівна, Комісаренко Сергій Васильович, Гула Надія Максимівна, Фролькіс Володимир Веніамінович, Марпич Віктор Михайлович, Костюков Сергій Миколайович

(73) Даценко Зоя Михайлівна

(56) Патент UA № 16988

(57) 1 Спосіб одержання з морських організмів комплексного лікувального засобу, репаруючого мембрани функційно різних клітин людини, який

включає подрібнення сировини, екстракцію етанолом, очищення активованим вугіллям рідкої фази та її стабілізацію вітаміном Е, який відрізняється тим, що одержаний екстракт відстоюють на холоді до повного осадження білків, а після видалення осаду та стабілізації екстракту, концентрують його випарюванням у вакуумі

2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що додатково етанол підкислюють оцтовою кислотою

3 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що час екстракції вихідної сировини встановлюють, виходячи з повноти вилучення кінцевого продукту

Винахід відноситься до фармацевтичної і харчової промисловості та може бути використаний в профілактичних цілях і як засіб для лікування порушень функції печінки, легень різної етіології, дихальної недостатності при тяжких інфекційно-токсичних станах, для зменшення концентрації холестеролу в крові при серцево-судинних захворюваннях для лікування чоловічої неплідності та гормональних відхилень у системі гіпофіз-гонади. Крім того засіб може бути використаний для нормалізації метаболічних порушень, активації захисно-детоксикуючих, регуляторних функцій організму та неспецифічних імунно-захисних механізмів, а також в якості природнього антиоксиданту, мембраностабілізатора та імунomodлятора.

Встановлено, що за патологічних станів розмитої етіології в мембранах функційно різних клітин відбуваються зміни у складі та рівні певних ліпідів, що свідчить про їх важливу роль у забезпеченні нормального функціонування організму. При цьому виявлено можливість корекції цих змін за допомогою деяких екзогенних ліпідів.

Існують способи одержання з морських організмів косметичних препаратів Мельник Е.А., Ющенко В.А., Даценко З.М. і др. Моющее средство для тела - Авт. свид. N 1528494, A61K 7/06, 1989, БИ N 46, комплексу фосфоліпідів з властивостями сурфактанту Даценко З.М., Белебезев Т.И., Дужак В.Г. і др. Спосіб получения вещества, обладаю-

щего свойствами сурфактанта Авт. свид. N 1392685, A61K 35/56, 1988, неоприлюднене

За прототип винаходу прийнято "Спосіб обробки морських організмів" (п. UA №16988)

Спосіб обробки морських організмів включає подрібнення сировини, екстракцію етанолом, перерозчинення в гексані, відстоювання на холоді до утворення осаду і супернатанту, з останнього випаровують гексан, перерозчиняють в етанолі, очищують активованим вугіллям, стабілізують вітаміном Е і одержують комплекс фосфоліпідів, осад переосаджують сумішшю етанолу з ефіром у співвідношенні (1-3) 1, розділяють на тверду та рідку фазу, після чого останню випаровують, перерозчиняють в етанолі, очищують активованим вугіллям та ультрафільтрацією до одержання речовини з тестостероногенними властивостями.

Цей спосіб включає три етапи виділення двох окремих продуктів фосфоліпідного комплексу та речовини із тестостероногенними властивостями. Практичне значення має тільки одержання комплексу поверхнево-активних речовин з виходом до 6%. Одержання гормоноподібної речовини з тестостероногенними властивостями не має практичного значення через низький її вихід - до 0,6%.

У зв'язку з цим прототип має вузький спектр властивостей, що обмежує лікування різних захворювань.

Спосіб обробки морських організмів трудоміст-

(13) C2

(11) 20471

(19) UA

кий Крім того, він потребує застосування таких небажаних хімічних реактивів як гексан та ефір, що може завадити впровадженню способу в промислове виробництво

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб одержання з морських організмів засобу, репаруючого мембрани функційно різних клітин людини

Новий спосіб одержання біологічно активних речовин (БАР) з морських організмів дозволяє шляхом застосування нової схеми обробки морських організмів забезпечити одержання засобу з необхідним спектром властивостей, та збільшити вихід специфічних речовин, призначених для лікування багатьох захворювань до 10 - 12%

Поставлена задача вирішується в способі одержання з морських організмів - комплексного лікувального засобу, репаруючого мембрани функційно різних клітин людини, що включає подрібнення сировини, екстракцію етанолом, відстоювання на холоді до поділу на тверду та рідку фазу, очищення активованим вугіллям та стабілізацію вітаміном Е, в якому згідно з винаходом, екстракцію ведуть етанолом, підкисленим оцтовою кислотою, а рідку фазу декантують від осаду і після очищення та стабілізації концентрують випарюванням у вакуумі

Етанол для екстракції підкислюють оцтовою кислотою до рН не нижче 4,0

Екстракцію ведуть протягом 3 - 5 год

Новий спосіб дозволяє виділити високоактивну субстанцію, яка може бути використана як лікувальний засіб для терапії різних захворювань, пов'язаних із порушенням ліпідного статусу мембран функційно різних тканин людини, а також як харчова домішка

Перевага нового способу порівняно з прототипом є

скорочення технологічних операцій,

одержання більшого виходу необхідних БАР завдяки екстрагуванню сировини етанолом, підкисленим оцтовою кислотою,

усунення небажаних білків завдяки очищенню екстракту відстоюванням на холоді

Суть винаходу ілюструються конкретними прикладами його здійснення 1 - 5 та результатами дослідження одержаного кінцевого продукту

Приклад 1 100г відібраних частин молюсків (кальмар) подрібнюють на м'ясорубці, заливають 10 об'ємами етилового спирту, підкисленого оцтовою кислотою до рН4 0, перемішують 5 год в реакторі з мішалкою Одержаний екстракт фільтрують

від залишків сировини та відстоюють на холоді до випадіння білкового осаду Освітлений розчин декантують і після очищення активованим вугіллям та стабілізації вітаміном Е, концентрують випарюванням у вакуумі Одержують кінцевий продукт субстанції - 12г

Приклад 2 100г молюсків (рапан) подрібнюють на м'ясорубці, заливають 10 об'ємами етилового спирту, підкисленого оцтовою кислотою до рН4 5, перемішують 5 год в реакторі з мішалкою Одержаний екстракт фільтрують від залишків сировини та відстоюють на холоді до випадіння осаду Освітлений розчин декантують, очищують активованим вугіллям, та після фільтрації додають вітамін Е до кінцевої концентрації 0 03%, концентрують випарюванням у вакуумі Одержують кінцевий продукт субстанції - 10г

Приклад 3 100г відібраних частин молюсків подрібнюють на м'ясорубці, заливають 10 об'ємами етилового спирту, перемішують 3 год в реакторі з мішалкою Одержаний екстракт фільтрують від залишків сировини та відстоюють на холоді до випадіння осаду Освітлений розчин декантують, очищують активованим вугіллям, та після фільтрації додають вітамін Е до кінцевої концентрації 0 03%, концентрують випарюванням у вакуумі Одержують кінцевий продукт субстанції - 10г

Приклад 4 100г відібраних частин молюсків (кальмар) подрібнюють на м'ясорубці, заливають 10 об'ємами етилового спирту, перемішують 3 год в реакторі з мішалкою Одержаний екстракт фільтрують від залишків сировини та відстоюють на холоді до випадіння осаду Освітлений розчин декантують і після фільтрації додають вітамін Е, концентрують випарюванням у вакуумі Одержують кінцевий продукт субстанції - 8г

Приклад 5 100г відібраних частин морських риб (хек, тріска, скумбрія, оселедці, лосось, тунець) подрібнюють на м'ясорубці, заливають 10 об'ємами етилового спирту, перемішують 5 год в реакторі з мішалкою Одержаний екстракт фільтрують від залишків сировини та відстоюють на холоді до випадіння осаду Освітлений розчин декантують, очищують активованим вугіллям, та після фільтрації додають вітамін Е до кінцевої концентрації 0 03%, концентрують випарюванням у вакуумі Одержують кінцевий продукт субстанції - 7,6г

Результати дослідження хімічного складу засобу, одержаного запропонованим способом, наведені у табл 1

Таблиця 1

Досліджувані препарати	Вміст леорганічного фосфору, мкг/мг сухої речовини	Вміст вазоту, мкг/мг сухої речовини	Складові фосфоліпідного комплексу, % від загальної суми
Біологічно активний комплекс морських організмів	250-300	300-350	ФХ 65 % ФЕА 12 % СМ 4-6 ФС 0 6 1 6 ДФГ - 0 3 0 6 ЛФХ 1 5 2 0

Примітка ФХ - фосфатидилхолін, ФЕА - фосфатидилетаноламін, СМ - сфінгомелін, ДФГ - дифосфатидилглицерол, ЛФХ - лізо-фосфатидилхолін, ДФГ - дифосфатидилглицерол

Вивчення мембранопротекторної дії засобу, тобто його вплив на репарацію пошкоджених мембран клітин при розвитку патологічного стану проводили після введення щурам токсичної речовини - тетрахлорметану протягом доби і після лікування тварин запропонованим засобом з морських організмів. Критерієм репарації мембран є відновлення ліпідного складу мембран та зниження швидкості утворення вільних радикалів

Таблиця 2

Досліджувані показники	Контроль (норма) (n=12)	Введення тетрахлорметану (n=12)	Репарація мікроомембран засобом з морських організмів (n=12)
Індивідуальні фосфоліпіди (% від загальної кількості)			
ФХ	60.5±1.8	49.5±1.1	58.1±1.3
ФЕА	27.5±1.4	31.7±0.9	27.4±0.2
СМ	4.6±0.3	4.0±0.5	5.3±0.7
ДФГ	2.1±0.3	4.2±0.1	2.4±0.5
ЛФЕА	0.8±0.3	2.7±0.2	1.2±0.1
ЛФХ	1.2±0.5	2.5±0.5	1.5±0.4
Холестерол, мкг/мг ліпідів	59.0±7.0	92.0±3.0	63.0±4.8
Загальний фосфор, мкг/мг ліпідів	19.2±1.8	10.2±2.7	19.2±1.4
Діагнози кон'югати, мкг/мг білка	1.42±0.11	2.45±0.04	1.2±0.08

Продовження таблиці 2

Малонсиди дивальдегід, мкмоль/мг білка	1.44±0.12	3.80±0.08	0.75±0.14
Індекс холестерол/фосфоліпідів	0.12	0.36	0.13
Індекс ФХ/ФЕ	2.10	1.50	2.00
Індекс ФХ/ДФГ	49.0	11.7	33.0

Примітка ФХ - фосфатидилхолін, ФЕА - фосфатидилетаноламін, СМ - сфінгомелін, ДФГ - дифосфатидилглицерол, ЛФЕА - лізо-фосфатидилетаноламін, ЛФХ - лізо-фосфатидилхолін

Як впливає з табл 2, після введення токсичної речовини підвищується рівень лізо-форм фосфоліпідів, спостерігається зменшення загального рівня фосфоліпідів та збільшення кількості холестеролу. При цьому індекс холестерол/фосфоліпіди збільшується в 3 рази порівняно з контролем. Введення запропонованого нового лікувального засобу з морських організмів спричиняє відновлення вмісту як сумарних фосфоліпідів мембрани, так і основного компоненту фосфоліпідів - фосфатидилхоліну. Тимчасом спостерігається зменшення рівня цитотоксичних ЛФХ, ЛФЕА та вільних ліпідних радикалів. Мембраностабілізуючу дію вказаний засіб може проявляти завдяки наявності в його складі фосфоліпідів з поліненасиченими жирними кислотами та ейкозаноїдами, оскільки відомо, що есенційні фосфоліпіди можуть усувати ушкодження ліпідного бішару мембрани. Деякий внесок у мембраностабілізуючу дію препарату вносить природний вітамін Е завдяки утворенню комплексів з неетерификованими жирними кислотами або обмеженням молекулярної мобільності компонентів.

Таким чином, новий засіб з морських організмів як мембранопротектор може здійснювати метаболічний контроль насиченості ліпідів мембрани, що є дуже важливим у регуляції мембранних функцій.

Дослідження біологічних властивостей одержаного за новим способом засобу проводили за тестом на визначення тестостеронової активності та показників спермограми осіб репродуктивного віку. Визначення тестостеронової активності проводили радіоімунологічним методом за допомогою тест-наборів kit на щурах самцях у віці 2 - 2,5 роки (вагою 500 - 550 г), яких поділили на 2 групи: 1 група - контрольна, 2 група - дослідна. Одержаний засіб вводили внутрішньом'язово по 0,1 мг на 100 г ваги протягом 10 днів. Вимірювали рівень тестостерону крові на початку дослідження та після 10-ти добового курсу. Результати наведено в табл 3.

Таблиця 3

Групи тварин (n-8)	Досліджувані препарати	Вихідний рівень: тестостерону	Рівень тестосте- рону після курсу введення препарату
1. Контроль	фізіологічний розчин	0,97±0,04	1,05±0,45
2. Дослід	Одержаний засіб	0,87±0,07	10,58±0,71 * p<0,001

Примітка позначкою \* помічено вірогідні зміни порівняно з контролем

Як випливає з табл 3, введення старим тваринам одержаного засобу дає значний ефект, збільшуючи концентрацію тестостерону в крові

Дослідження показників еякуляту проводили на кількох неплідних добровольцях-чоловіках репродуктивного віку, яким призначили одержаний засіб перорально протягом 3-х тижнів. Результати наведено в табл 4

Таблиця 4

Групи	Показники спермиограми				
	Кількість жмичиків	Об'єм еяку- ляту, мл	Рухомі, %	Живі, %	Патологі- чні фор- ми, %
1. Контроль, здорові	68±9	3±0,3	80±2	72±2	17±1
2. Хворі на неплідність	32±3	5±0,4	40±4	54±9	29±5
3. Хворі на неплідність після засто- сування за- собу, одержа- ного пропово- ваним способом	44±7	4±0,3	86±2	88±2	16±4

Як показано на табл 4, за неплідності значно знижується кількість та рухомість сперматозоїдів, а також збільшується кількість патологічних форм. Після дії досліджуваного засобу кількість сперматозоїдів в еякуляті значно збільшується. Подібно збільшується і кількість рухомих сперматозоїдів, навіть в порівнянні з нормою. Досліджуваний засіб впливає на секрецію статевих гормонів, покращує морфо-функційні характеристики еякуляту, корегуючи зміни мембранних ліпідів сперматозоїдів, що обумовлює його ефективність при усуненні порушень статевої

функції та сприяє реалізації здатності до запліднення

Таким чином, запропонований винахід вирішує задачу одержання з морських організмів засобу, до якого входять фосфоліпіди, вільні жирні кислоти та речовини з гормоноподібною дією у співвідношенні, необхідному для проявлення мембрано-протекторної дії та збільшує вихід специфічної речовини до 10 - 12%

Одержаний запропонованим способом засіб репарує склад мембранних ліпідів функціонально різних клітин і тим самим сприяє лікуванню різних патологічних станів

Здатність вказаного засобу коригувати та репарувати змінений ліпідний склад мембранних структур клітин функційно різного походження сперми, печінки, легень, міокарду, мозку, нирок тощо, а також знижувати рівень холестеролу, лежить в основі лікувального ефекту цього засобу за різних патологій вказаних органів