

Винахід стосується медицини, біології й може бути використаний для лікування та профілактики інфекції банального характеру локалізованої та генералізованої, благотворно впливає на функцію серцево-судинної, нервової, м'язової системи, органи дихання, опірно-рушійний апарат, покращує обмін речовин, при захворюваннях органів малого тазу (простатит, геморої, уретрит, гінекологічних захворюваннях запального характеру), запальних процесах додаткових пазух носу, бронхолегеневої системи. Засіб складається з бактерицидного препарату, який одержано з синьо-зеленої водорості *Oscillatoria neglecta* Lemm., та сорбуючого препарату - альгінату кальцію.

З спеціальної літератури відомо, що природні хімічні сполуки, похідні 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагідропірроло-(1,2-С)-піримідину та його похідних за рахунок заміщення водню у бокових радикалах піримідину та пірролу, а також включення сполук сірки відносяться до групи фармакологічно-активних речовин і можуть бути використані як антимікробні й гангліоблокуючі природні препарати:

з дінофітових водоростей, що відносяться до родів *Gonyaulax*, *Gymnodinium*, *Peridinium* (Bower D.I., Hart R.I., Matthews P.A., Howden M.E.H. Nonprotein neurotoxins // Clin. Toxicol., 1981, vol. 18,7. - P. 813 - 863); молюсків (там же, де й попередні);

синьо-зелених водоростей (Горюнова С.В., Демина Н.С. Водоросли - продуценты токсических веществ, М.: Наука, 1974. - 256с.; Кирпенко Ю.А., Сиренко Л.А., Орловский В.М., Лукина Л.Ф. Токсины синезеленых водорослей и организм животного, К.: Наукова думка, 1977. - 232с.; Kirpenko Yu.A., Kirpenko N.I. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide // Subject Area: Water Resources. Printed in the U.S.A. ISBN-89867-824, 1995. - 227p.; Kirpenko Yu.A., Sirenko L.A., Kirpenko N.I. Influence of metabolites of certain algae on human and animal cell cultures // International Journal on Algae, 1999, 1(1). - P. 122 - 126].

Найбільш близьким до заявленої природної сполуки з мікроводоростей є біологічно активна речовина подібної структури з синьо-зеленої водорості *Aphanizomenon flos-aquae* (Carmichael W.W. The Cyanotoxins // Advances in Botanical Research, vol. 27, ISBN-12-005927-4. - P. 211 - 256), яку одержують шляхом висушування клітин водорості виморожуванням, повторним ресуспензуванням у 0,1N HCL з наступною обробкою супернатанту 1 N KOH до pH 5,5, центрифугуванням та ліофілізацією з загальною назвою - «мікропистин» (М). Розподіл та очищення одержаної речовини проводиться хроматографічно й за рахунок елюції 0,01N HCL. Активна сполука являє собою за агрегатним станом аморфну склоподібну гігроскопічну масу, що погано кристалізується.

Головним недоліком вказаної сполуки є часткова денатурація продукту при виділенні й недостатня чистота речовини, що впливає на спектр біологічної дії та невелика тривалість терапевтичної дії, що примушує застосовувати повторні введення її для підтримки діючих концентрацій.

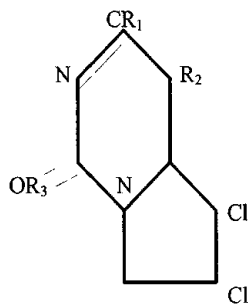
Зазначені недоліки в певній мірі усунуті Ives [Ives K.I. Algae and Water suppliers. 5The removal of algae by chemical coagulants // J. Water and Water Eng., 1957, vol. 61,741. - P. 481 - 488] за рахунок виділення індивідуалізованої речовини та її ідентифікації з штамів мікроводоростей (ціанобактерій) *Anabaena*, *Hepalosiphon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* низки біологічно активних сполук під назвою «мікроцистини», з М.м. від 909 до 1115Да й загальною формулою від $C_{46}H_{67}N_7O_{12}$ до $C_{52}H_{81}N_{11}O_{14}S$. Однак виділені й очищені сполуки не ідентифікувались як похідні 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагідропірролопіримідин і відзначались надто високою токсичністю для теплокровних.

Задачею даного винаходу є одержання з природних популяцій водоростей (наприклад, *Microcystis aeruginosa* Kutz.em. Elenk, *Oscillatoria neglecta* Lemm., та інші, а також з біомаси водоростей, що вирощуються у індустриальній культурі *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. та інших) природно активної речовини 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагідропірроло-(1,2-С)-піримідину, який може бути використаний як лікарський засіб з пролонгованою дією.

8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагідропірроло-(1,2-С)-піримідин та його похідні одержували з біомаси дезінтегрованих клітин мікроводоростей після попередньої екстракції водою на активованому аніоніті АВ-22 з наступним елюванням 70% етанолом, перекристалізацією, очисткою діалізом або хроматографуванням і криосубілімацією.

Вказаним способом можна одержати кристалічну речовину, що розчиняється у воді й органічних розчинниках (п-бутиловий, етиловий, метиловий спирти, ацетон), з температурою плавлення 81,2°C. У розчиненому вигляді речовина витримує стерилізацію кип'ятінням та автоклавуванням.

За хімічною будовою речовина має бути віднесена до поліцикличнополіпептидних сполук. Продукт гідролізу речовини 2% фосфорною кислотою при 2атм являє собою 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагідропірроло-(1,2-С)-піримідину з загальною формулою наступного складу:



$C_{700}H_{1187}N_{307}O_{75} \times 2HCl$ Молекулярна маса 16800Да.

Залежно від заміщення кінцевих радикалів та з'єднання кілець гетероциклів речовина 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагідропірроло-(1,2-С)-піримідин може утворювати низку похідних.

Альгінат кальцію додано до складу комплексного засобу у зв'язку з його здатністю при просяканні бактерицидною речовиною тривалий час зберігати протимікробну та противірусну активність, затримувати всмоктування радіоактивного стронцію [Зайцев В.П., Ажгихин И.С., Гандель В.Г. Комплексное использование морских организмов. - М.: Пищевая промышленность, 1980. - 280с.].

Взагалі альгінова кислота (АК) - представник водоростевих поліуронідів. Накопичується у всіх крупних бурих морських водоростях (*Laminaria*, *Macrocystis*, *Fucus*), де її вміст досягає 40% сухої маси [McNeely N.H. *Algin*. In: *Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives*, Press New York and London, 1959. - Р. 55 - 82.]. Але здебільшого кількість альгінової кислоти коливається від 15 до 30% [Возжинская і др. Промысловые водоросли СССР / А.С. Цапко, Е.И. Блинова, А.А. Калугина, Ю.Е. Петров. - М.: Пищевая пром-сть, 1971. - 270с.], хоча в окремих випадках у деяких видів (напр. *Laminaria japonica*, *L. cichoioides*) його кількість може досягати 54,6 та 49,6% відповідно [Хоменко В.А. Общая характеристика полисахаридов бурых водорослей. - Химия и биохимия углеводов. - М.: Химия, 1967. - 124с.].

Хімічна структура АК, як і хімічні структури багатьох других поліоз з водоростей, непостійна й залежить від виду водорості та других факторів. Так, співвідношення у ній D-маннуринової та L-гулуринової кислот коливається від 0,5 до 3,0. Молекули АК побудовані з залишків β-D-ангідром-мануринової кислоти, яка має лінійну структуру та зв'язана (1→4)-зв'язками, які поєднують окремі моноцукри. Результати рентгеноструктурного аналізу альгінових фібрил свідчать, що аргідроманнозні ланки мають структуру піраноїдних кілець [Йиргенсонс Б. Природные органические макромолекулы. - Пер. с английского Л.Н. Акимовой и М.С. Хлудовой - М.: Мир, 1965. - С. 203 - 206; 210 - 212.].

Є відомості, що АК навіть з одного виду водоростей, може являти собою суміш поліцукрів неоднакового складу, тому що окремі методи осадження можуть давати фракції, одна частина яких збагачена D-маннуриновою кислотою, а друга - L-гулуриновою. Але обидві уронів кислоти обов'язково входять до складу однієї полімерної молекули, тому що відновлення всіх карбоксильних груп АК та м'який частковий гідроліз нейтрального поліцукриду, що утворюється, приводить до одержання відповідного гетеродицукриду 4-O-β-D-маннопіранозил-L-гулози [Percival E., McDowell R. *Chemistry and enzymology of marine algae polysaccharides*, London and New York: Academic Press, 1967. - 219p.; Levring T., Hope H.A., Schmid O.J. *Marine algae. A survey of research and utilization*. Gram. De Guryer and Co., Hamburg, 1969. - 421p.].

Загальний випуск АК та альгінатів (А) значно перевищує випуск всіх других водоростевих продуктів за виключенням водоростевого борошна, і складає близько 4000т на рік у США, 2000т у Англії, 1000т у Франції, більше 500т у Японії, Канаді, Іспанії, Норвегії.

Відомо декілька методів одержання АК - за Стенфордом, Гріном, Глоахен-Хертером й др. [Кизеветтер И.В., Грюнер В.С., Евтушенко В.А. *Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений*. - М.: Пищевая пром-сть, 1967. - 416с.; Возжинская. Промысловые водоросли СССР / А.С. Цапко, Е.И. Блинова, А.А. Калугина, Ю.Е. Петров. - М.: Пищевая пром-сть, 1971. - 270с.; Челмен В. Морские водоросли и их использование / Пер. с англ. С.В. Максимовой. - М.: ИЛ, 1953. - 248с.; Levring T., Hope H.A., Schmid O.J. *Marine algae. A survey of research and utilization*. Gram. De Guryer and Co., Hamburg, 1969. - 421p.].

У нашій країні розповсюджений метод, який засновано на комплексному використанні бурих водоростей [Зайцев В.П., Ажгихин И.С., Гандель В.Г. *Комплексное использование морских организмов* - М.: Пищевая промышленность, 1980. - 280с.]. Спершу з водоростей вилучають маніт, який являє собою шестиатомний спирт, що застосовується у медицині та деяких галузях промисловості, а водоростевий залишок використовують для одержання розчинної солі альгінової кислоти - альгінату натрію. Для цього водоростевий залишок та водорості завантажують у реактор, додають гарячу воду (у співвідношенні 10 - 15 частин води на 1 частину водоростей) та кальциновану соду (до рН 10 - 12). Суміш варять протягом 2 - 3 год при температурі 75 - 80°C і безперервному помішуванні. До кінця варки суміш повинна мати однорідну консистенцію. Ця методика використана для одержання альгінату кальцію у наших дослідженнях.

Для полегшення утворення альгінатів невилужену водорість замочують у 0,5% сірчаної кислоти, нагрівають до 40 - 50°C й витримують протягом 1 год. Кислий водний розчин зливають, водорості промивають водою, подрібнюють та варять у розчині луку, як подано вище.

Після завершення варки до маси додають гарячу воду, суміш ретельно перемішують шляхом барбатування стисненого повітря та залишають відстоюватись 3 - 4 год. Відстояний розчин зливають за допомогою сифону через тканинний фільтр, залишок тричі промивають водою, поєднують зливи з першим, після чого залишок відкидають. Зібрані розчини фільтрують, альгінову кислоту осаджують мінеральною кислотою, відділяють від кислого маточника й ретельно відмивають водою від залишків мінеральної (частіше сірчаної) кислоти.

Сиру альгінову кислоту переносять у змішувач та змішують з гідрокарбонатом натрію. В'язкий розчин альгінату натрію висушують на вальцевих сушарках при температурі поверхні вальців не вище 120°C. Вихід альгінату натрію складає біля 10% маси повітряно-сухої водорості.

Готовий продукт має вигляд пластинок неправильної форми й товщини або порошку з вологістю біля 18%. Пакують його у ящики (нето 20кг) та картонні коробки (нето 10кг).

Випускають технічний та харчовий АН. Харчовий АН відрізняється від технічного більш світлим забарвленням, меншим вмістом золи (25 та 35% відповідно), речовин, які нерозчинні у холодній воді (0,5тв 0,3% відповідно), вільного луку; більшим вмістом альгінової кислоти (70 - 60% відповідно) та його 1% розчин має більш високу в'язкість (2,5 та 1,5п. відповідно). Харчовий АН високої якості випускається з використанням технології, яка розроблена ТНІРО [Зайцев В.П., Ажгихин И.С., Гандель В.Г. *Комплексное использование морских организмов* - М.: Пищевая промышленность, 1980. - 280с.]. Його пакують у мішки або пакети з крафт-паперу.

Комплексний препарат антибактеріальної пролонгованої дії має компонентний склад:

антибактеріальний засіб - 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагідропіріоло-(1,2-С)-піримідин (ТГПП) - 0,1%;

альгінат кальцію - 10%;

наповнювач (вода, глюкоза) до 100%.

Враховуючи складові частини комплексного препарату, з нього є можливість приготувати декілька лікформ - порошки, таблетки, грануляти, розчини, мазі.

Переваги запропонованого комплексного засобу показані прикладами виконання.

ПРИКЛАД 1. Спектр та тривалість антимікробної дії комбінованого засобу та генерика «мікроцистин» визначені на коковій, палочковій, сапрофітній та патогенній, спорогенній та неспорогенній мікрофлорі. Для цього визначені бактеріостатичні та бактерицидні концентрації речовин для конкретних випадків, які використані для

визначення тривалості бактерицидного ефекту через 24, 48, 72, 96 годин методом пересівів з рідких на тверді поживні середовища (табл.1).

Таблица 1

Антимікробні, антимікозні та тривалість антимікробної дії ТГПП та мікроцистину на різні штами мікроорганізмів властивості Ung.Algophymim та Ung. Algovit

Штами мікроорганізмів	Тривалість бактерицидної дії ТГПП та мікроцистину у бактерицидній концентрації для обох засобів (0,001мг/мл)	
	ТГПП	Мікроцистин
Staphylococcus aureus	-96	-48; +72
Staphylococcus albus	-96	-48; +72
Staphylococcus aureus 209	-96	-24; +48
Staphylococcus haemoliticus	-96	+48
Staphylococcus nonhaemoliticus	-96	-24; +48
Streptococcus faecalis	-96	+48
Salmonella typhi	-96	+48
Salmonella paratyphi A	-96	+48
Salmonella paratyphi B	-96	+48
Salmonella paratyphi Breslau	-96	-24; +48
Salmonella paratyphi Gertneri	-96	-24; +48
Proteus Morganii	-96	+48
Salmonella paratyphi Suipertifer	-96	+24
Salmonella pillorum	-96	+48
Shigella Flexneri	-96	+48
Shigella dysenteriae Shiga	-96	+48
Escherichia coli	-96	-24; +48
Vibrio cholerae	-96	+24
Bacterium rhusiopathiae suis	-96	+48
Chromobacterium prodigiosum	-96	+48
Pseudomonas aeruginosa	-96	+48
Proteus vulgaris	-96	+24
Bacterium Fridlenderi	-96	+48
Corynebacterium diphtheriae	-96	+24
Bacillus subtilis	-96	+72
Bacillus megaterium	-96	+48
Bacillus mesenterium	-96	+48
Bacillus anthracis	-96	+48
Bacillus macroides	-96	+72
Candida	-96	+48

Примітка: знак (-) означає відсутність росту - стерильне середовище;

знак (+) означає проростання мікроорганізмів;

цифра поряд знаків означає години, коли проведено контрольний висів на тверде середовище

З наведених даних витікає, що заявляємий комбінований засіб зберігає бактерицидну активність протягом 96 годин, а мікроцистин втрачає ці властивості через 24 - 48 годин.

ПРИКЛАД 2. Бактерицидна активність комбінованого засобу (ТГПП) та мікроцистину визначена також на гостросептичній моделі на білих мишах, яку одержували внутрішньоочеревинним введенням змиву добової культури Staphylococcus aureus 209 у кількості 400тис. мікробних тіл за оптичним стандартом, досліджувані речовини вводили також внутрішньоочеревинно через 4 години після введення мікроорганізмів та контролювали дію антисептиків висівами асцитичної рідини та методом відбитків внутрішніх органів (печінка, легені, міокард, селезінка). Ці відомості представлені у табл. 2.

Таблица 2

Дія ТГПП та мікроцистину in vivo на тлі гостросептичної моделі, викликаній Staphylococcus aureus 209 у кількості 400тис. мікробних тіл

Групи та кількість тварин	Асцитична рідина	Печінка	Легеня	Міокард	Селезінка	Загибель тварин
Контроль (30 білих мишей)	+	+	+	+	+	30 тварин, через 20 ± 6,5 год.
ТГПП (30 білих мишей)	-	-	-	-	-	-
Мікроцистин (30 білих мишей)	+	+	-	-	+	18 тварин через 48 год

Умовні позначення: знак (-) означає відсутність росту мікроорганізмів;

знак (+) - мікроорганізми висіваються з відповідних органів

Таким чином, ТГПП зберігає бактерицидну активність до кінця експерименту, в результаті чого явища септикопії відсутні; мікроцистин має бактерицидну активність протягом 48 год і патогенні мікроорганізми висівають з асцитичної рідини, печінки та селезінки.