

Винахід відноситься до медицини, соціології, біотехнології, а також до одержання методом мікробіологічного синтезу засобів від алкогольної та наркотичної залежності.

Найбільш близькими до заявлюваного винаходу є препарати природного походження, які використовуються як засоби від алкогольної та наркотичної залежності [патент США № 4647460, публікація 87.03.03, т. 1076, № 1, індекс МПК А 61 К 35/74; патент США № 4569843, публікація 86.02.11, т. 1063, № 2, індекс МПК А 61 К 35/74; патент США № 4696818, публікація 87.09.29, т. 1082, № 5, індекс МПК А 61 К 35/74; патент України № 10420 А, публікація 96.12.25, бюл. № 4, індекс МПК⁵ А 61 К 35/74]. Однак деякі з них лише полегшують стан абстиненції [патент США № 4569843, публікація 86.02.11, т. 1063, № 2, індекс МПК А 61 К 35/74], інші тільки сприяють виведенню наркотика із організму [патент США № 4647460, публікація 87.03.03, т. 1076, № 1, індекс МПК А 61 К 35/74], але не позбавляють алкогольної залежності.

Прототипом даного винаходу є антиалкогольний та антинаркотичний засіб природного походження, який створено з використанням біомаси та/або продуктів життєдіяльності штама бактерій *Methylococcus thermophilus* IMB-3126 [патент України № 10420 А, публікація 96.12.25, бюл. № 4, індекс МПК⁵ А 61 К 35/74]. Недоліком цього засобу є його недостатня ефективність. За 1996–1999 роки авторами розроблені біотехнологічні підходи, які дозволили в значній мірі збільшити ефективність препарату.

В основу винаходу, який пропонується, поставлена задача одержання більш удосконаленого засобу від алкогольної та наркотичної залежності шляхом модифікації та оптимізації умов культивування продуцента *Methylococcus thermophilus* B-3126, щоб забезпечити більшу ефективність засобу C-3126 (прототип), який отримується методом мікробіологічного синтезу, для розширення арсеналу природних засобів проти алкоголізму та наркоманії.

Поставлена задача вирішується шляхом культивування штаму бактерій *Methylococcus thermophilus* B-3126 на модифікованому середовищі з високим вмістом CuSO_4 , що підвищує ефективність мікробної біомаси та/або продуктів метаболізму *Methylococcus thermophilus* B-3126 як засобу від алкогольної та наркотичної залежності.

Суттєві ознаки винаходу, які відмінні від прототипу:

- біомаса та продукти метаболізму штаму *Methylococcus thermophilus* B-3126 (тобто засіб C-3126/29), які одержані в результаті його культивування на модифікованому мінеральному середовищі з високим вмістом CuSO_4 , характеризуються збільшенням активності першого ферменту окислення етанолу (алкогольдегідрогенази);

- біохімічні показники у алкоголізованих тварин (характерні для цієї патології), які викликані гострим або хронічним вживанням алкоголю, нормалізуються більш ефективно;

- прояв емоційно-позитивного ефекту у наркотизованих тварин, який розвивається під впливом морфіну, знижується або повністю зникає.

Приклад 1. Проведена оптимізація умов культивування штаму *Methylococcus thermophilus* B-3126 за такими параметрами: джерела азотного живлення, pH середовища, концентрація $\text{CuSO}_4 \times x \times 5\text{H}_2\text{O}$ та концентрація інших мікроелементів.

Експерименти проводили у 0,75 л колбах на качалках (240 оборотів/хвилину), в які вносили по 5 мл засівного матеріалу (суспензія штаму B-3126) та по 100 мл мінерального середовища наступного складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; KH_2PO_4 – 0,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; NaCl – 0,3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,001. Суміш мікроелементів вносили у вигляді концентрованого розчину (1 або 5 мл на 1 л середовища). Склад розчину мікроелементів (мкг/мл): $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 60; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 26; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5; H_3BO_3 – 10; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 6; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 10. Склад газової фази (об.%): кисень – 15; метан – 50; атмосферний азот – 35. Тривалість досліду – 36–48 годин.

Результати оцінювали шляхом порівняльного аналізу активності алкогольдегідрогенази у штама-продуцента на різних мінеральних середовищах, тому що антиалкогольна дія засобу C-3126 (прототип) залежить від активності цього ферменту. Результати представлені у таблиці 1.

Показано (табл. 1), що при збільшенні концентрації $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ до 200 мкг у 1 л (або 200 мг у 1 м³) мінерального середовища активність алкогольдегідрогенази підвищується (до 188 нмоль/мг за хвилину). Зміна інших умов культивування (pH середовища, джерела азоту, концентрація мікроелементів) значно не впливала на активність ферменту.

Далі на лабораторній ферментаційній установці АК-210 (робочий об'єм – 4 л) проведено культивування штаму B-3126 (безперервний процес – 240 годин) на мінеральному середовищі з високим вмістом $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (200 мкг/л). В режимі хемостату проток культуральної рідини ($D = 0,2 \text{ ч}^{-1}$) здійснювали модифікованим середовищем такого складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,5; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; NaCl – 0,9; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,9; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,06; $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,06; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,28. Суміш мікроелементів подавали у вигляді концентрованого розчину (мкг/мл): $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 6,0; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 26,0; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,0; H_3BO_3 – 108; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 6,0. В результаті культивування штаму-продуцента на модифікованому мінеральному середовищі з високим вмістом $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ одержано біомасу та продукти метаболізму (тобто засіб C-3126/29), які характеризуються збільшенням активності алкогольдегідрогенази – першого ферменту окислення етанолу.

Приклад 2. Ефективність дії запропонованого засобу (C-3126/29) на алкоголізованих тварин оцінювали по зміні біохімічних показників, які характерні для організмів у цьому стані: концентрація етанолу та ацетальдегіду в крові, активність ферментів метаболізму етанолу, вміст у крові біогенних амінів, адреналін, норадреналін, дофамін.

Досліджено дію засобу C-3126/29 на стан організму при алкогольній інтоксикації у моделі на щурах. Щурів (групу з 100 тварин) провокували на споживання алкоголю шляхом запропонованого їм вільного

вибору: споживання 15% розчину етанолу або води. Для оцінки дії С-3126/29 на алкоголізованих тварин відбирали щурів, які віддавали перевагу розчину етанолу. Їм вводили *per os* водну суспензію засобу С-3126/29 (60 мг/100г ваги тварин) щоденно на протязі 10 днів. Весь час на протязі досліду тварини знаходились в умовах вільного вибору між 15% розчином етанолу та водою. Показано, що споживання 15% розчину етанолу тваринами експериментальної групи зменшилось (порівняно з початковим рівнем) після того, як їм почали вводити С-3126/29. На протязі досліду фізіологічна потреба тварин у воді стабільно задовольнялась збільшенням споживання води (за рахунок зменшення споживання розчину алкоголю) і через 20 днів досягла фізіологічної норми. Таким чином, введення засобу С-3126/29 алкоголізованим тваринам призвело до відмови від алкоголю, а також до нормалізації водного навантаження.

Одержані результати свідчать про те, що у щурів з експериментально викликаною залежністю від алкоголю при лікуванні засобом С-3126/29 знімалась алкогольна мотивація, нормалізувалось водне навантаження.

У сироватці крові алкоголізованих тварин через 20 днів після введення їм засобу С-3126/29 визначали активність алкогольдегідрогенази і ацетальдегіддегідрогенази. Це здійснювали за допомогою спектрометричного методу (по кількості відновленого НАД з етанолом або ацетальдегідом, як субстратами), а також вміст адреналіну, норадреналіну, дофаміну, які визначали флюорометричним методом.

Введення засобу С-3126/29 сприяло нормалізації у алкоголізованих тварин алкогольдегідрогенази, ацетальдегіддегідрогенази і адреналіну (табл. 2). При цьому засіб С-3126/29 відновлював у щурів біохімічні показники, порушення яких було викликано хронічним споживанням алкоголю (табл. 2), ефективніше, ніж прототип.

Приклад 3. Визначали вплив засобу С-3126/29 на біохімічні показники в крові щурів, які виникали при введенні їм субнаркотичних доз етанолу. В гострих експериментах досліджували інтактних тварин, яким одноразово вводили *per os*: 0,4 г етанолу на 100 г ваги тварини, або 60 мг С-3126/29 на 100 г ваги тварини, або вводили одночасно алкоголь і засіб С-3126/29. Контрольним тваринам вводили відповідну кількість води. Через 30 хвилин тварин декапітували і у крові визначали біохімічні показники методами, які наведені у прикладі 2, а також визначали концентрацію етанолу і ацетальдегіду, використовуючи газохроматографічний метод.

Показано (табл. 3), що при сумісному введенні тваринам етанолу і засобу С-3126/29 у їх крові знижувався вміст етанолу (порівняно з введенням одного етанолу). При введенні тваринам одного етанолу активність алкогольдегідрогенази і ацетальдегіддегідрогенази підвищувалась, в той час, як при введенні засобу С-3126/29, спостерігалась тенденція до зниження активності алкогольдегідрогенази і до підвищення активності ацетальдегіддегідрогенази. При сумісному введенні етанолу і С-3126/29 знижувалась активність алкогольдегідрогенази і підвищувалась активність ацетальдегіддегідрогенази, що пов'язано із сповільненням процесу накопичення у крові альдегіду. Під впливом етанолу (а також засобу С-3126/29) підвищувався вміст адреналіну у крові. Однак при їх сумісному введенні вміст адреналіну у крові був значно нижче, ніж при введенні одного етанолу (табл. 3). Засіб С-3126/29 нормалізував також вміст у крові норадреналіну і дофаміну.

Таким чином, використання засобу С-3126/29 одночасно з етанолом знижувало у крові піддослідних тварин вміст етанолу; сприяло нормалізації ферментів обміну етанолу (алкогольдегідрогенази і ацетальдегіддегідрогенази), а також концентрації катехоламінів. При цьому у експериментальних тварин засіб С-3126/29 сприяв відновленню біохімічних показників (характерних для алкогольної інтоксикації) ефективніше, ніж прототип.

Приклад 4. Оцінку антинаркотичної дії запропонованого засобу (С-3126/29) проводили, застосовуючи метод виникнення умовної реакції переваги (УРП) у тварин на місце введення наркотика. Цей метод широко застосовується при вивченні наркологічної залежності від нейротропних сполук.

Установка для експериментів являла собою клітку, розділену на дві камери: темну та освітлену 100 Вт лампою. Визначали початкову перевагу, яку тварини надають місцю їх знаходження у камерах клітки. Тестування проводили двічі. Встановлено, що всі інтактні тварини (100%) віддають перевагу темній камері, час перебування у світлій камері становив 54 ± 14 секунд за 10 хвилин спостереження.

Оцінку виникнення УРП у щурів на введення їм морфіну здійснювали таким чином. Тварин після ін'єкції морфіну на 30 хвилин примусово розміщували у світлій камері. Перехід між світлою і темною камерою на цей час закривали. Морфін вводили тваринам одноразово (внутрішньочеревинно) на протязі чотирьох днів у концентраціях: 1,5–2,0 мг морфіну на 100 г ваги тварин. Оцінку УРП здійснювали тестуванням (визначали час перебування тварин у світлій камері) при наявності вільного переходу між світлою та темною камерою.

Показано, що після чотирьох ін'єкцій морфіну час перебування щурів у світлій камері збільшився, порівняно з інтактними тваринами (54 ± 14 секунд), до 391 ± 52 секунди. Тобто у них розвинулась УРП на введення морфіну. У 70% тварин, що перебували у світлій камері, розвивались симптоми, які імітують дію морфіну ("застигання", тобто частота дихання знижувалась до 70–80/хв, проти 110–150/хв у нормі, латентний стан виникнення такого стану – від 3 до 11 хвилин). У 30% щурів, навпаки, було відмічено рухливий неспокій (пошук, грумінг).

Вплив засобу С-3126/29 на розвиток УРП у щурів проводили шляхом добавляння засобу С-3126/29 у хлібні кульки (із розрахунку 60 мг С-3126/29 на 100 г ваги тварини), які поїдалися тваринами за 30–40 хвилин до внутрішньочеревних ін'єкцій морфіну. Ця група щурів після третьої ін'єкції морфіну розподілилась на дві підгрупи.

Перша підгрупа (50% тварин) відмовилась від споживання хлібних кульок з С-3126/29, хоча охоче споживала хлібні кульки без нього. Під час тестування у них відмічалась наявність УРП, але менш вираже-

на, ніж у контрольній групі, що отримувала морфін без С-3126/29. Час знаходження тварин першої підгрупи у світлій камері складав 205 ± 47 секунд. Латентний період до "застигання" коливався від 3 до 11 хвилин.

Друга підгрупа (50% тварин) продовжувала споживати хлібні кульки з С-3126/29, і їм було зроблено четверту ін'єкцію морфіну. Наступне тестування виявило повну відсутність УРП у 30% тварин (час перебування у світлій камері – 13 ± 4 секунди). Наявність УРП спостерігалась у 20% тварин (час перебування у світлій камері – 150 ± 41 секунди), але була менш виражена, ніж у контролі, що свідчило лише про відносне надання переваги місцю, де вводився наркотик. Латентний час до "застигання" збільшився (4–15 хвилин) порівняно з контрольними тваринами, які отримували морфін без С-3126/29.

Одержані результати свідчать про те, що під дією С-3126/29, який поїдали тварини (у вигляді хлібних кульок) за 30–40 хвилин до ін'єкцій морфіну, зникає або знижується УРП (тобто прояв емоційно-позитивного ефекту наркотика). Це виявляється у зменшенні часу перебування тварин у світлій камері після фармакологічного обумовлення морфіном (зниження УРП) та у зменшенні кількості тварин з УРП (зникнення УРП). Паралельно з цим у тварин сповільнюється умовно-реф-лєкторний розвиток симптомів, що імітують дію морфіну (зменшення частоти дихання, "застигання"). Відмова тварин від споживання С-3126/29 після виникнення УРП в результаті введення морфіну пояснюється тим, що С-3126/29 пригнічує емоційно-позитивний ефект активації системи "нагорода", який розвивається під впливом морфіну. Таким чином, засіб С-3126/29 знижує ризик виникнення фізичної залежності від наркотика і діє більш ефективно, ніж прототип.

Наведені приклади демонструють, що запропонований засіб С-3126/29 у дослідних тварин знижує алєгольну мотивацію; нормалізує активність ферментів метаболізму етанолу і вміст біогенних амінів у крові; зменшує прояв емоційно-позитивного ефекту, який розвивається під впливом морфіну.

Таблиця 1

Вплив різних умов культивування на рівень накопичення біомаси штама В-3126 (г/л) та активність алкогольдегідрогенази (нмоль/мг за хвилину) у біомасі

Умови досліджу		Біомаса, г/л	Алкогольдегідрогеназа, нмоль/мг білку за хвилину
Джерело азоту	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2±0,23	123±8
	KNO ₃	1,1±0,30	119±9
рН середовища	6,5	1,2±0,30	128±6
	7,0	1,2±0,16	122±5
Концентрація мікроелементів	1 мл*/л	1,2±0,27	121±8
	5 мл*/л	1,3±0,22	130±4
Концентрація CuSO ₄ (мкг/л)	10	1,2±0,21	123±6
	50	1,3±0,25	147±8
	100	1,3±0,20	160±7
	200	1,3±0,23	188±8
	300	1,2±0,28	180±5

* Вміст мікроелементів у концентрованому розчині (мкг/мл) наведено вище у тексті.

Таблиця 2

Біохімічні показники* у алкоголізованих щурів при лікуванні їх засобом С-3126/29

Умови досліджу	Алкогольдегідрогеназа, нмоль/мг хв	Альдегіддегідрогеназа, нмоль/мг хв	Адреналін, мкг/л
До введення С-3126/29 алкоголізованим щурам	0,18	0,71	3,9
Після введення С-3126/29 алкоголізованим щурам	0,115	1,42	1,45
Після введення С-3126 алкоголізованим щурам	0,126	1,27	1,96
Щури, яким не вводили етанол (контроль)	0,11	2,0	1,0

* Приведені середні значення для 10 тварин у кожному експерименті.

Таблиця 3

Біохімічні показники* у крові щурів після введення розчину етанолу (0,4 г/100 г ваги) та/або засобу С-3126/29 (60 мг/100 г ваги) у гострому експерименті

Введено тваринам	Біохімічні показники у крові щурів				
	Етанол, мг%	Ацетальдегід, мг%	Алкогольдегідрогеназа, нмоль/мг хв	Альдегіддегідрогеназа, нмоль/мг хв	Адреналін, мкг/л
Етанол	780±15	0,27±0,02	0,198±0,11	2,25±0,13	4,0±0,23
С-3126/29	2,3±0,7	0,31±0,02	0,032±0,05	1,9±0,11	2,0±0,02
С-3126/29 + етанол	350±11	0,25±0,02	0,095±0,07	2,2±0,09	2,1±0,18
С-3126**+етанол	440±10	0,32±0,02	0,098±0,06	2,1±0,09	2,5±0,23
Тварини, яким не вводили ні етанол, ні С-3126/29 (контроль)	0,2±0,06	0,01±0,01	0,103±0,08	1,55±0,08	1,05±0,01

* Приведені середні значення для 10 тварин у кожному експерименті.

** Прототип (наведено для порівняння).

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
