



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **114650**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 36/05 (2006.01)

A61K 33/04 (2006.01)

A61K 33/30 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 10403**

(22) Дата подання заявки: **12.10.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.03.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.03.2017, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):

**Боднар Оксана Ігорівна (UA),
Вінярська Галина Богданівна (UA),
Грубінко Василь Васильович (UA),
Лихацький Петро Григорович (UA),
Фіра Людмила Степанівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА,
вул. М. Кривоноса, 2, м. Тернопіль, 46027
(UA)**

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО СЕЛЕН-ЦИНК-ЛІПІДНОГО КОМПЛЕКСУ З ХЛОРЕЛИ

(57) Реферат:

Спосіб отримання селен-цинк-ліпідного комплексу з *Chlorella vulgaris* Beij включає культивування мікроводорості на живильному середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема № 11 (22-25 °С, 2500 лк впродовж 16 год/добу). У середовище вносяться біологічно активні мікроелементи (натрію селеніту в концентрації 10,0 мг/дм³ по селену та цинк сульфату в концентрації 5,0 мг/дм³ по цинку) з подальшою інкубацією культури впродовж семи діб та наступним виділенням лише фракції ліпідів без сторонніх домішок та інших органічних сполук з відповідною регульованою фармацевтичною дозою селену та цинку в залежності від потреб організму.

UA 114650 U

UA 114650 U

Корисна модель належить до біологічної галузі, зокрема до технологій отримання біологічно активних препаратів на основі біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris* Beij., та може бути використана в медицині, харчовій промисловості та сільському господарстві.

Відомий спосіб отримання препаратів на основі біомаси *Chlorella vulgaris* та доведення їх біологічної активності щодо регуляції метаболічних процесів в організмі експериментальних тварин [Chovancikova M., Simek V. Effects of high-fat and *Chlorella vulgaris* feeding on changes in lipid metabolism in mice// *Biologia* (Bratislava). - 2001. - Vol.56, № 6. - P. 661-666; Lee H.S., Park H.J., Kim M.K. Effect of *Chlorella vulgaris* on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet// *Nutr. Res. Pract.* - 2008. - Vol. 2, № 4. - P. 204-210], який полягає у тому, що для корекції ліпідного обміну мишей використовували висушену хлорелу з підвищеним вмістом біологічно активних речовин. Недоліком даного способу є можливе додаткове навантаження на певні ланки метаболічних процесів організму, у зв'язку із введенням додаткової кількості ліпідів та білків у раціон харчування, навіть незважаючи на їх позитивну дію у даних випадках.

Відомий також спосіб використання селену, що входить до складу збагаченої біомаси мікроводорості спіруліна - "Селен-Спирулина" [Selenium// *Alternative Medicine Review.* - 2003. - 8, № 1. - P. 63-71], який полягає у культивуванні водоростей неперервним способом з подальшим додаванням у відібрану біомасу неорганічних солей металів та неметалів. Недоліком зазначеного способу є використання субстанції з висушених і подрібнених нативних клітин цієї водорості, яка характеризується нестабільним вмістом селену та іонів металів, а оскільки не є очищеною, то містить вторинні метаболіти, що мають алергенний ефект (наприклад лізофосфоліпіди і деякі феофітини), які можуть утворюватися за нестабільності умов культивування водоростей.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб отримання з біомаси хлорели ліпідного комплексу з оптимальним вмістом селену (Se IV) та цинку (Zn II), при збереженні природних властивостей хлорели і її ліпідного складу, шляхом вирощування хлорели у культуральному середовищі в накопичувальному режимі з подальшим внесенням до культури водних розчинів натрію селеніту та цинку сульфату на 7 діб, наступним екстрагуванням ліпідів з біомаси хлорели та отримання продукту, що містить в додаткових адекватних кількостях селен і цинк.

Поставлена задача вирішується тим, що водний розчин натрію селеніту (Na_2SeO_3) в заданій концентрації по селену в розрахунку на кількість іонів Se(IV) - $10,0 \text{ мг/дм}^3$, а також водний розчин цинку сульфату ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в заданій концентрації по цинку у розрахунку на кількість Zn^{2+} - $5,0 \text{ мг/дм}^3$, додають в спеціально приготовлений розчин суспензії *Chlorella vulgaris* у стандартному середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема № 11 ($22-25^\circ\text{C}$, 2500 лк впродовж 16 год./добу) [Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике/ Под ред. А.В. Топачевского. - К.: Наукова думка, 1975. - 247 с.]. Суспензія культури хлорели разом з добавками натрію селеніту та цинк сульфату витримується в живильному середовищі протягом семи діб до досягнення стаціонарної фази росту. Клітини відокремлюються від розчину шляхом центрифугування. Отриманий щільний осад вручну ресуспендується в слабо притертому гомогенізаторі Поттера в хлороформ-метаноловій суміші у відношенні 2:1 за методом Фолча [Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов/ М. Кейтс. - М.: Мир, 1975. - 322 с.]. Вміст селену у клітинах хлорели визначається спектрофотометрично з о'-фенілєндіаміном при довжині хвилі 335 нм [Дедков Ю.М. Селен: биологическая роль, химические свойства и методы определения// Ю.М. Дедков, А.В. Мусатов. - ВИНТИ. РЖ Химия, 2002. - № 1688-В. - С. 19-23]. Вміст цинку у клітинах водоростей визначається атомно-адсорбційним методом на спектрофотометрі Selmi C-115 M.

Результати щодо підбору оптимальних умов вирощування *Ch. vulgaris* у накопичувальній культурі для отримання потенційної сировини показали, що найефективнішими умовами є культивування водорості протягом 7-й діб з додатковим введенням натрію селеніту в концентрації $10,0 \text{ мг Se (IV)/дм}^3$ та іонів цинку в концентрації $5,0 \text{ мг Zn}^{2+}/\text{дм}^3$ (табл. 1).

Таблица 1

Вміст селену та цинку у ліпідному комплексі з хлорели, $M \pm m$; $n=5$

Вміст	Контроль	Дія $10,0 \text{ мг Se(IV)/дм}^3 + 5,0 \text{ мг Zn}^{2+}/\text{дм}^3$
Селену, мкг/г сухої маси ліпідів	$34,73 \pm 1,55$	$80,33 \pm 2,98^*$
Цинку, мкг/г сухої маси ліпідів	$423,33 \pm 24,45$	$4202,14 \pm 254,07^*$

Вміст селену за дії селеніту з Zn^{2+} збільшився на 131,3 % щодо контролю. Хлорела також активно накопичує цинк майже у 10 разів проти контролю. Таким чином, спосіб дозволяє в накопичувальному режимі досягти включення біля 80 мкг Se (IV) та 4000 мкг Zn (II) на 1 г ліофілізованого ліпідного екстракту, що цілком відповідає фармакологічним дозам для виготовлення повноцінних профілактичних і лікувальних препаратів на основі хлорели.

Склад і структура виділеного селен-цинк-ліпідного комплексу встановлена методами тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії (рідинний хромато-мас-спектрометр Agilent 1200 SL/DAD/FD/MSD 6130; "Agilent Technologies", USA).

Достовірність включення зазначених мікроелементів підтверджується результатами мас-спектрометричного дослідження структури селен-цинк-ліпідного комплексу (креслення а, б, в). За детекції спектра DAD і мас-детектора за позитивної і негативної іонізації MSD ESI +/- всі піки DAD та MSD узгоджені.

Отримані спектри свідчать про включення двох атомів селену (DAD 225 nm-2, 4; MSD ESI (+) - 2, 5; MSD ESI (-) - 4, 6), атома цинку (DAD 225 nm-3; MSD ESI (+) - 2), гліцеролу (DAD 225 nm-13; MSD ESI (+) - 13) та жирнокислотних хвостів (DAD 225 nm-18-28 з максимумами 18, 21, 25; MSD ESI (+) - 18-28 з максимумами 19, 21, 23-26; MSD ESI (-) - 20-30 з максимумами 21, 22, 23, 27). Високоймовірнісне співпадіння максимумів речовин - складових комплексу, підтверджує його сталість.

Біологічну активність селен-цинк-ліпідного комплексу досліджували на білих безпородних щурах-самцях з масою тіла 160-180 г, що утримувалися на стандартному раціоні віварію. Зазначені комплекси розчиняли в 1 % водному розчині крохмалю, 1 мл якого у підсумку містив 0,4 мкг селену, 2,5 мкг цинку і 0,5 мг ліпідів, та вводили тваринам внутрішньошлунково впродовж 14-и діб. На 14-у добу від початку експерименту проводили забій щурів шляхом евтаназії під тіопенталом натрію. У печінці та сироватці крові тварин визначали показники антиоксидантної системи та енергетичного обміну.

Дослідження впливу селен-цинк-ліпідного комплексу із хлорели на окисдаційний статус щурів показало (табл. 2), що за його введення пригнічувалися активність окиснювальних процесів у сироватці крові дослідних тварин. При вивченні процесів ліпопероксидації нами відмічено зниження вмісту ТБК-АП у сироватці крові щурів при застосуванні селен-цинк-ліпідного комплексу на 23 % порівняно з контролем.

Таблиця 2

Показники окиснювальних процесів в організмі щурів після застосування селен-цинк-ліпідного комплексу ($M \pm m$; $n=6$)

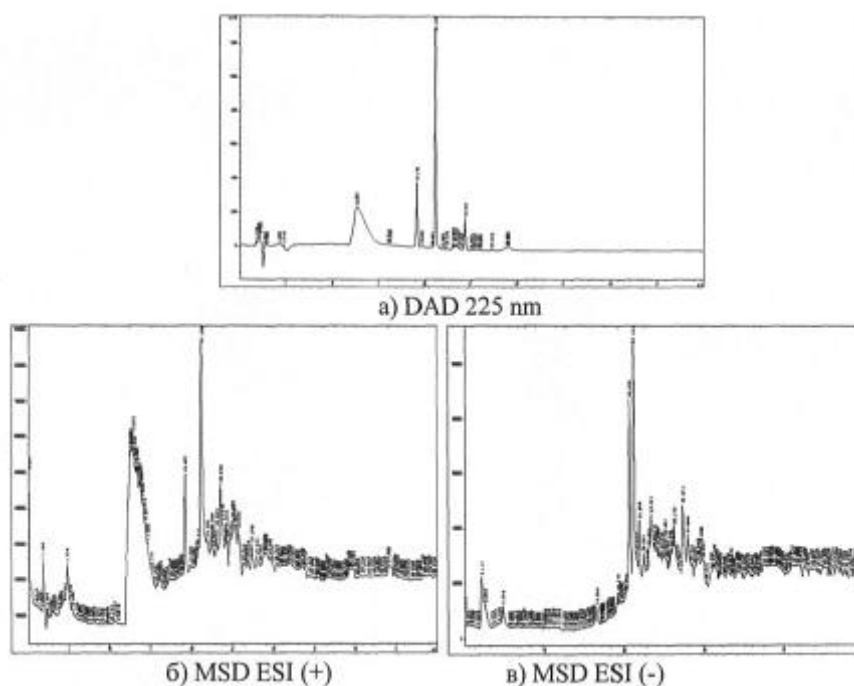
Показники	Сироватка крові		Печінка	
	Контроль	Селен - цинк - ліпідний комплекс	Контроль	Селен - цинк - ліпідний комплекс
ТБК-АП, мкмоль/л	18,99 \pm 1,63	14,57 \pm 0,32*	84,40 \pm 5,83	91,88 \pm 8,22
2,4-ДНФГ ₁ , мкмоль/г білка	0,061 \pm 0,007	0,052 \pm 0,003	0,086 \pm 0,004	0,053 \pm 0,002*
2,4-ДНФГ ₂ , мкмоль/г білка	0,029 \pm 0,002	0,029 \pm 0,002	0,060 \pm 0,004	0,054 \pm 0,003
Відновлений глутатіон, ммоль/л	0,27 \pm 0,01	0,71 \pm 0,03*	0,63 \pm 0,06	1,06 \pm 0,02*
Каталаза, мкат/л	0,152 \pm 0,007	0,223 \pm 0,005*	0,252 \pm 0,002	0,281 \pm 0,001*
Церулоплазмін, г/л	19,70 \pm 1,39	27,56 \pm 1,10*	відсутній	відсутній
МСМ ₁	0,77 \pm 0,05	0,52 \pm 0,03*	не визначали	не визначали
МСМ ₂	0,59 \pm 0,05	0,50 \pm 0,03	не визначали	не визначали

Отримані результати з вивчення показників антиоксидантного захисту підтверджують активне включення мікроелементів, які в комплексі з ліпідами, проникають через плазматичні мембрани клітин, у структуру системи антиоксидантного захисту та зниження інтенсивності окиснювальних процесів в організмі: достовірне зростання активності каталази та вмісту відновленого глутатіону як в сироватці крові, так і в печінці, активності церулоплазміну у сироватці крові та зменшення вмісту продуктів пероксидного окиснення, насамперед ТБК-активних

- продуктів та 2,4-ДНФГ. При цьому, результати досліджень вмісту МСМ дозволяють припустити можливість застосування використаних нами дослідних комплексів за різних патологічних станів організму, що супроводжуються поглибленням ендогенної інтоксикації, маркерами якої і є середньомолекулярні пептиди. В умовах патології селен-цинк-ліпідний комплекс з хлорели, очевидно, зможе кон'югуватись із середніми молекулами, чим саме призводитиме до дезінтоксикації організму.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб отримання селен-цинк-ліпідного комплексу з *Chlorella vulgaris* Beij, що включає культивування мікроводорості на живильному середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема № 11 (22-25 °С, 2500 лк впродовж 16 год/добу), який **відрізняється** тим, що у середовище вносяться біологічно активні мікроелементи (натрію селеніту в концентрації 10,0 мг/дм³ по селену та цинк сульфату в концентрації 5,0 мг/дм³ по цинку) з подальшою інкубацією
- 15 культури впродовж семи діб та наступним виділенням лише фракції ліпідів без сторонніх домішок та інших органічних сполук з відповідною регульованою фармацевтичною дозою селену та цинку в залежності від потреб організму.



Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601