



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 85226

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/702

C08B 37/00

C07H 3/00

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

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

(54) АЛЬГІНАТ ОЛІГОСАХАРИДУ ТА ЙОГО ПОХІДНІ, ЇХ ОДЕРЖАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) а200611222

(22) 25.02.2005

(24) 12.01.2009

(86) PCT/CN2005/000226, 25.02.2005

(31) 200410023827.0

(32) 24.03.2004

(33) CN

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) ГЕНГ МЕЙЮ, КСІН КСЯНЛЯНГ, СУН ГВАНГ-КЯНГ

(73) ОУШЕН ЮНІВЕРСІТІ ОФ ЧАЙНА

(56) CN 1401786 A 12.03.2003

CN 1341665 A 27.03.2002

CN 1414002 A 30.04.2003

CN 1473836 A 11.02.2004

CN 1562050 A 12.01.2005

CN 1486988 A 07.04.2004

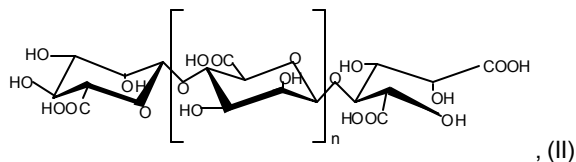
CN 1380342 A 20.11.2002

CN 13411664 A 27.03.2002

CN 1408360 A 09.04.2003

CN 1454992 A 12.11.2003

(57) 1. Похідні альгінату олігосахариду або його фармацевтично прийнятні солі, які **відрізняються** тим, що згадані похідні альгінату олігосахариду складаються з β -D-мануранової кислоти, сполученої α -1,4 глікозидними зв'язками, в яких відновна кінцева група в положенні 1 є карбоксильним радикалом, як показано в



, (II)

де n означає 0 або ціле число від 1 до 19.

2. Похідні альгінату олігосахариду або його фармацевтично прийнятні солі за п. 1, які **відрізняються** тим, що n приймає значення від 2 до 10.

3. Похідні альгінату олігосахариду або його фармацевтично прийнятні солі за п. 2, які **відрізняються** тим, що n приймає значення від 4 до 8.

4. Спосіб одержання похідних альгінату олігосахариду або його фармацевтично прийнятних солей

за п. 1, в якому здійснюють стадії в наступному порядку:

стадія кислотного гідролізу: водний розчин альгінату піддають взаємодії протягом 2-6 годин в автоклаві при pH 2-6 і температурі близько 100-120°C;

стадія регулювання pH: після закінчення реакції кислотного гідролізу доводять величину pH до значення близько 7;

стадія окислювальної деструкції: додають окислювач і здійснюють реакцію протягом від 15 хвилин до 2 годин при температурі 100-120°C;

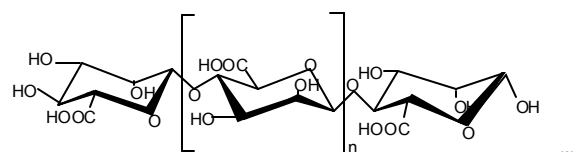
стадія регулювання pH: після закінчення реакції окислювальної деструкції доводять величину pH до значення близько 7.

5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що згаданий альгінат є альгінатом натрію і згадану реакцію кислотного гідролізу здійснюють протягом 4 годин при pH 4 і температурі 110°C.

6. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що після доведення pH до 7 додають спирт з одержанням осаду, який відфільтровують при відсмоктуванні, дегідратують, сушать та знесолюють.

7. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що згаданим окислювачем є гідроксид міді, і окислювальну деструкцію здійснюють протягом 30 хвилин при температурі 100°C.

8. Застосування олігосахариду мануранової кислоти формули I як будь-якого засобу, вибраного з групи, яка складається з лікарського засобу для профілактики та лікування хвороби Альцгеймера, інгібітору утворення білка амілоїду- β фібрил, лікарського засобу для профілактики та лікування діабетів, інгібітору утворення білка амілоїду фібрил та промотору дезагрегації фібрил



, (I)

(13) C2

(11) 85226

(19) UA

де у формулі n означає 0 або ціле число від 1 до 19.

9. Фармацевтична композиція, яка містить ефективну кількість похідних олігосахариду мануронової кислоти за будь-яким з пп. 1-3 та фармацевтично прийнятні носії.

10. Фармацевтична композиція за п. 9, яка **відрізняється** тим, що згадана композиція є будь-яким

засобом, вибраним з групи, яка складається з лікарського засобу для профілактики та лікування хвороби Альцгеймера, інгібітору утворення білка амілоїду- β фібрил, лікарського засобу для профілактики та лікування діабетів, інгібітору утворення білка амілоїду фібрил острівців підшлункової залози та промотору дезагрегації фібрил.

Представлений винахід стосується альгілату олігосахариду та його похідних, способу їх одержання та їх застосування для лікування хвороби Альцгеймера (AD) та діабету.

На даний час AD і діабет є звичайними та широко розповсюдженими захворюваннями, які становлять серйозну загрозу здоров'ю людства. Зокрема, із збільшенням в світі кількості людей похилого віку захворюваність підвищується рік з роком. Тому профілактика та лікування цих захворювань стають все більш важливими.

На даний час засоби для попередження та лікування AD навряд чи здійснюють революцію в лікуванні AD внаслідок того, що їх дія обмежується лише усуненням симптомів, або внаслідок їх сильних побічних ефектів. Ліками, зазвичай використовуваними для лікування діабетів, є головним чином інсулін та інші гіпоглікемічні засоби орального призначення, недоліками більшості з яких є незручність у застосуванні і токсичність. Дослідженнями було показано, що випадки AD та діабету пов'язані з відкладеннями амілоїду-бета ($A\beta$) та аніліну (IAAP), наступним фібрилогенезом та підвищенням кількості вільних окислювальних радикалів дають привід вважати, що інгібування утворення фібрилів амілоїду-бета та аніліну є перспективним для профілактики та лікування цих захворювань.

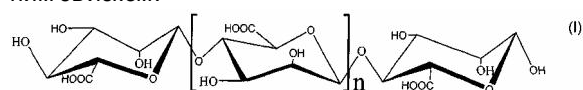
Альгілати є головними компонентами клітинної стінки бурих водоростей і які є лінійними аніонними полісахаридами, що складається з β -D-мануронової кислоти (ManA) та α -L-гулутонової кислоти (GulA), пов'язаних 1-4 глікозидними зв'язками. Альгінат належить до високомолекулярних полімерів з молекулярною масою від 10^4 до 10^6 , що отримується з багатьох джерел. Альгінат широко застосовується в харчовому виробництві, хімічній промисловості та медицині. Останні дослідження показали, що альгінат має широкий спектр біологічної активності. Однак, його застосування як лікарського засобу певною мірою обмежено із-за великої молекулярної ваги. Таким чином, олігосахарид, виділений з альгілату шляхом деструкції різними способами, має важливе значення для хімії глікозидів, біології глікозидів, розробки глікозидів та дослідження ліків на основі сахаридів. Способи деструкції альгілату включають ферментну, фізичну та хімічну деструкцію, хоча необхідність в специфічних ферментах обмежує застосування ферментної деструкції. Фізичною деструкцією, яка зазвичай застосовується в комбінації з іншими методами, неможливо легко отримати олігосахариди, оскільки молекулярна маса

продукту складає близько 50,000 Da. Хімічна деструкція полісахариду включає кислотний гідроліз і окислювальну деструкцію. Кислотний гідроліз обмежується його можливістю отримувати олігосахариди з молекулярною вагою близько 4000 Da або менше, коли здійснюється при нормальній температурі та при нормальному тиску.

Для вирішення вищеприказаних проблем з урахуванням глибоких досліджень винахідників було виявлено, що альгінат олігосахариду з молекулярною масою близько 4000 Da або менше може бути одержаний кислотним гідролізом при високій температурі і високому тиску, а його похідні, чий відновлені кінцеві групи в положенні 1 є карбоксильними радикалами, можна отримати в присутності окисдантів. Винахід здійснено на вищевказаній основі.

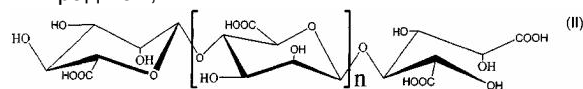
Представлений винахід стосується альгілату олігосахариду та його похідних з низькою молекулярною масою або їх фармацевтично прийнятних солей, а також способу їх одержання. Представлений винахід також стосується лікарського засобу для профілактики та лікування AD і діабетів, який містить вищезгаданий низькомолекулярний альгінат олігосахариди або його похідні, або їх фармацевтично прийнятні солі.

Представлений винахід стосується альгілату олігосахариди, представленого формулою (I) та його похідних або їх фармацевтично прийнятних солей. Згаданий олігосахарид складається з β -D-мануронової кислоти, сполученої α -1,4 глікозидним зв'язком.



де у формулі n представляє 0 або ціле число серед від 1 до 19.

В представленому винаході прикладом згаданих похідних альгілату олігосахариду є сполука, представлена формулою (II), в якій відновлюваною кінцевою групою в положенні 1 є карбоксильний радикал,



і в якій n означає 0 або ціле число від 1 до 19.

У згаданих формулах (I) і (II) n переважно є у інтервалі від 2 до 10, і більш переважно від 4 до 8. Причини того, що біологічні ефекти тетрасахариду до додекасахариду (переважно, гексасахариду до декасахариду) є кращими залишається незрозумі-

лою, що може викликатися здатністю цих олігосахаридів розпізнаватися та поглинатися клітинами.

Згадані похідні альгінату олігосахариду в подальшому включають, наприклад, похідні, в яких частина гідроксильних груп в маннурановій кислоті сульфатована.

Фармацевтично прийнятні солі згаданого альгінату олігосахариду та його похідних олігосахариду можуть бути, наприклад, натрієвою, калієвою, кальцієвою і магнієвою сіллю і т.п. Серед них перевага надається натрієвій солі. Фармацевтично прийнятні солі можуть бути одержані звичайними способами.

Представлений винахід також стосується способу одержання згаданого альгінату олігосахариду або його похідних, в якому розчин альгінату піддають реакції протягом від 2 до 6 годин в автоклаві при pH2-6 і температурі 100-120°C; і pH після закінчення реакції доводять до 7. Продукт окислювальної деструкції отримують шляхом додавання окислювача до розчину альгінату олігосахариду.

В переважному втіленні винаходу, 0,5-5%-ний водний розчин альгінату нагрівали протягом 4 годин в автоклаві при pH4 та температурі близько 110°C. Після закінчення реакції реакційну суміш відсмоктували і охолоджували, і потім доводили величину pH до 7 розчином NaOH. При перемішуванні фільтрат поволі вливали в промисловий спирт, об'єм якого був в 4 рази більшим, ніж об'єм фільтрату, і залишали на ніч для осадження. Осад відфільтровували у вакуумі до сухого залишку і зневоднювали шляхом промивання абсолютним етанолом. Отримували на фільтрі білий осад, який сушили в сушильній шафі при температурі 60°C з одержанням неочищеного альгінату олігосахариду. Неочищений альгінат олігосахариду переводили в 10%-ний розчин і осаджували 95%-ним етанольним розчином. Осад промивали абсолютним етанолом, сушили і переводили в 5%-ний розчин. Розчин фільтрувати через плівку 3 мкм для видалення домішок, потім знесолювали на Bio-Gel-P6 колонці (1,6×180см) з 0,2мол/л NH_4HCO_3 як рухомої фази і збирали продукт в декілька етапів. Елюат досліджували сульфатно-карбазольним методом. Фракції, які містили сахариди, збирали, концентрували при зниженому тиску і знесолювали, та ліофілізували з одержанням альгінату олігосахариду.

Одержання похідних, представлених формулою (II), проводили наступним чином: додавали окислювач і реакцію проводили протягом від 15 хвилин до 2 годин при температурі 100-120°C, після чого проводили реакцію альгінатного розчину протягом від 2 до 6 годин в автоклаві при pH2-6 та температурі близько ~100-120°C. В конкретному втіленні винаходу 25мл 5%-ного розчину сульфату міді додавали до 50мл 10%-ного NaOH (водн.), перемішували і відразу ж додавали 40мл 5%-ного розчину альгінату олігосахариду. Одержану суміш нагрівали в киплячій водяній бані до припинення утворення осаду червоно-коричневого кольору. Суміш центрифугували для видалення осаду. Деяку кількість надосадової рідини відбирали і додавали до 10%-ного NaOH (водн.) і 5%-ного розчину сульфату міді у вищезгаданій пропорції для пере-

вірки будь-якого утворення осаду червоно-коричневого кольору. Якщо осад не утворювався, надосадову рідину додавали до промислового спирту, об'єм якого був в 4 рази більшим, ніж об'єм надосадової рідини, і залишали на ніч для осадження. Осад відфільтровували на водоструминному насосі до сухого залишку, зневоднювали шляхом неодноразового промивання абсолютним етанолом і сушили в сушильній шафі при температурі 60°C. Розділення проводили таким же чином як і у випадку альгінату олігосахариду формули (I).

Винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить ефективну кількість згаданого альгінату олігосахариду або його похідних, або його фармацевтично прийнятних молей та фармацевтично прийнятної носії.

Фармацевтична композиція може використовуватися як лікарський засіб для профілактики та лікування хвороби Альцгеймера.

Крім того, фармацевтична композиція може використовуватися як інгібітор утворення білка амілоїда- β фібрил і промотор дезагрегації фібрил.

Фармацевтична композиція може також використовуватися як лікарський засіб для профілактики та лікування діабетів.

Крім того, фармацевтична композиція може використовуватися як інгібітор утворення білка амілоїда фібрил острівців підшлункової залози і інгібітор утворення поліпептида амілоїда острівців підшлункової залози. Приймаючи до уваги труднощі, пов'язані з відсутністю ефективних лікарських засобів для профілактики та лікування AD та діабетів, особливо важливо, що альгінат олігосахариду згідно з представленим винаходом використовують для виробництва лікарського засобу для профілактики та лікування AD та діабетів.

Опис малюнків

На Фіг.1 показано криву елюювання альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом, розділеного на колонці Bio-Gel-P6 після кислотного гідролізу.

На Фіг.2 показано спектр MALDI-TOF альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом.

На Фіг.3 показано криву елюювання продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду, розділеного на колонці Bio-Gel-P6.

На Фіг.4 показано MALDI-TOF спектр продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду (позитивна методика).

На Фіг.5 показано вплив альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на інкубаційний період виникнення у миші хвороби Альцгеймера, викликаной $\text{A}\beta_{1-40}$.

На Фіг.6 показано вплив альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на похибку виникнення у миші хвороби Альцгеймера, викликаной $\text{A}\beta_{1-40}$.

На Фіг.7 показано захисну дію альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на SH-SY5Y клітини, пошкоджені $\text{A}\beta_{25-35}$.

На Фіг.8 показано захисну дію альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на SH-SY5Y клітини, пошкоджені $\text{A}\beta_{1-40}$.

На Фіг.9 показано інгібувальну дію альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на нормальне та викликане гепарином утворення фібрил Аβ₁₋₄₀.

На Фіг.10 показано дестабілізуючу дію альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на фібрили Аβ₁₋₄₀.

На Фіг.11 показано вплив альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на структуру розчиненого 250мкг/мл Аβ₁₋₄₀.

На Фіг.12 показано захисну дію альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на NIT клітини, пошкоджені IAAP.

На Фіг.13 показано вплив суміші продуктів окислювальної деструкції альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на час затримки між стимулом і реакцією у мишей з AD, викликану Аβ₁₋₄₀, в дослідженнях з використанням водного лабіринту Моріса.

На Фіг.14 показано вплив суміші продуктів окислювальної деструкції альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на дальність плавання мишей з AD, викликану Аβ₁₋₄₀, в дослідженнях з використанням водного лабіринту Моріса.

На Фіг.15 показано вплив суміші продуктів окислювальної деструкції альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на час першого прибуття на платформу мишей з AD, викликану Аβ₁₋₄₀, в дослідженнях з використанням водного лабіринту Моріса.

На Фіг.16 показано вплив суміші продуктів окислювальної деструкції альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на кількість переходів через платформу мишей з AD, викликану Аβ₁₋₄₀, в дослідженнях з використанням водного лабіринту Моріса.

На Фіг.17 показано захисну дію суміші продуктів окислювальної деструкції альгінату олігосахариду згідно з представленим винаходом на NIT клітини, пошкоджені IAAP.

1. Виготовлення альгінату олігосахариду

До дистильованої води додавали 1г поліманнануронату натрію (середня молекулярна вага 8,235 Da, виробляється Lantai Pham. LTD., Ocean University of China) з одержанням 1%-ного розчину, доводили рН до 4 соляною кислотою, поміщали в автоклав і нагрівали протягом 4 годин при температурі 110°C. Після охолодження доводили рН до 7 водним розчином NaOH. При перемішуванні повільно вливали фільтрат в промисловий спирт, об'ємом в 4 рази більшим, ніж фільтрат, залишали на ніч для осадження. Осад відфільтровували до сухого залишку з використанням водоструминного насоса і піддавали дегідратації шляхом промивання абсолютним етанолом. Отримували на фільтрі білий осад і сушили в сушильній шафі при температурі 60°C з одержанням сирого альгінату олігосахариду.

Переводили сирий альгінат олігосахариду в 10%-ний розчин і осаджували 95%-ним етанольним розчином. Осад промивали абсолютним етанолом і переводили в 5%-ний розчин після висушування. Розчин фільтрували через 3мкм плівку для видалення домішок і потім знесолювали на

Bio-Gel-P6 колонці (1,6×180см) з використанням 0,2моль/л NH₄HCO₃ як рухомої фази та збирали продукт в декілька етапів. Елюат досліджували сульфатно-карбазольним методом і компоненти, які містили сахариди, збирали, концентрували при зниженому тиску і знесолювали їх на колонці G-10. Зовнішній об'ємний компонент в подальшому відокремлювали на Bio-Gel-P10 колонці (1,6×180см) та ліофілізували з одержанням серії альгінатів олігосахаридів (Фіг.1).

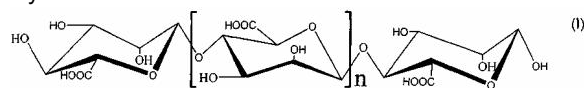
2. Виготовлення продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду

5г Одержаного вище альгінату олігосахариду переводили в 5%-ний розчин. Додавали 25мл 5%-ного розчину сульфату міді до 50мл 10%-ного водного розчину NaOH і одразу ж перемішували та додавали 40мл 5%-ного розчину альгінату олігосахариди. Одержану суміш нагрівали в киплячій водняній бані до припинення утворення осаду червоно-коричневого кольору. Суміш центрифугували для видалення осаду. Частину надосадової рідини відбирали і додавали до 10%-ного водного розчину NaOH та 5%-ного розчину сульфату міді у наведеному вище співвідношенні для перевірки утворення осаду червоно-коричневого кольору. Якщо осад не утворювався, надосадову рідину додавали до промислового спирту, об'єм якого був в 4 рази більшим, ніж об'єм надосадової рідини, і залишали на ніч для осадження. Осад відфільтровували на водоструминному насосі до сухого залишку, зневоднювали шляхом неодноразового промивання абсолютним етанолом і сушили в сушильній шафі при температурі 60°C. Таким чином отримували сирий окислений продукт альгінату олігосахариду.

Сирий продукт окислювальної деструкції альгінату олігосахариду переводили в 10%-ний розчин і осаджували 95%-ним етанольним розчином. Осад промивали абсолютним етанолом і переводили в 5%-ний розчин після висушування. Розчин фільтрували через 3мкм плівку для видалення домішок і потім знесолювали на Bio-Gel-P6 колонці (1,6×180см) з використанням 0,2моль/л NH₄HCO₃ як рухомої фази та збирали продукт в декілька етапів. Елюат досліджували сульфатно-карбазольним методом і компоненти, які містили сахариди, збирали, концентрували при зниженому тиску і знесолювали їх на колонці G-10. Зовнішній об'ємний компонент в подальшому відокремлювали на Bio-Gel-P10 колонці (1,6×180см) та ліофілізували з одержанням серії альгінатів олігосахаридів (Фіг.2).

3. Визначення структури альгінату олігосахариду

Визначали структури олігосахаридів, що містяться у фракції, отриманій при одержанні альгінатів олігосахаридів. Біло підтверджено, що олігосахаридами є альгінати олігосахаридів, що складаються з β-D-маннурової кислоти, зв'язаної 1,4-глікозидними зв'язками. Структурна формула:



в якій n представляє 0 або ціле число від 1 до 19.

В подальшому фракцію близько 292мл елюата (фракція, позначена як «6», на Фіг.1, згадувана нижче як компонент 6) відбирали як приклад для того, щоб проілюструвати аналіз структури вищезгаданих олігосахаридів.

3.1 Ультрафіолетова спектрограма абсорбції

Фракцію олігосахариду в приблизно 292мл елюата розбавляли до відповідної концентрації і досліджували при довжині хвилі 190-400нм за допомогою спектрофотометра UV-2102 UV-VIS. Було виявлено, що в ультрафіолетовій області ніяких специфічних піків поглинання не спостерігається, що вказує на те, в структурі немає кон'югованих подвійних зв'язків. Проте, при довжині хвилі 190-200нм були відмічені неспецифічні піки поглинання. Таким чином, при знесолненні олігосахариду можна проводити онлайн перевірку у вищезгаданій ультрафіолетовій області.

3.2 Інфрачервона спектрометрія

Зважували 0,5мг вищезгаданої фракції олігосахаридів. ІЧ-спектри визначали за допомогою інфрачервоного мікропроцесорного спектрометра NEXUS-470 з таблетками KBr. Піки при $3420,79\text{см}^{-1}$, $3214,64\text{см}^{-1}$ та $2924,61\text{см}^{-1}$ можуть бути віднесені до симетричних коливань розтягування гідроксильної групи; пік при $1600,25\text{см}^{-1}$ може бути віднесений до симетричного коливання розтягування

карбонільної групи карбоксилату; пік при $1406,54\text{см}^{-1}$ може бути віднесений до симетричного деформаційного коливання гідроксильної групи; пік при $1146,42\text{см}^{-1}$ може бути віднесений до симетричного коливання розтягування С-О зв'язку карбоксильної групи, пік при $1045,77\text{см}^{-1}$ може бути віднесений до антисиметричного коливання розтягування безводного етеру; і пік при $804,02\text{см}^{-1}$ може бути віднесений до антисиметричного коливання розтягування циклічного скелета маннуринової кислоти. Це вказує на те, що така сполука містить карбоксильну групу, гідроксильну групу та циклічну структуру у скелета маннуринової кислоти.

3.3 Мас-спектрометричний аналіз

Мас-спектрометричний аналіз здійснювали за допомогою мас-спектрометра MALDI-TOF типу BIFLEX II від Bruker Daltonics Co. Як видно із спектрів (Фіг.2, таблиця 1), пік $1073,9$ (m/z) є піком молекулярного іону $[M-H]^{-1}$; пік $1096,6$ (m/z) представляє $[M+Na-2H]^{-1}$; пік $1028,0$ (m/z) представляє $[M-H_2O-CO-H]^{-1}$; пік $821,2$ (m/z) представляє $[M-ManA-CH_2O-2H_2O-H]^{-1}$; пік $704,3$ (m/z) представляє $[M-2ManA-H_2O-H]^{-1}$; пік $634,4$ (m/z) представляє $[M-2ManA-2(CH_2O)-CO-H]^{-1}$; пік $536,5$ (m/z) представляє $[M-2H]^{2-}$; і пік $357,4$ (m/z) представляє $[M-3H]^{3-}$. У спектрі ESI-MS вищезгаданого олігосахариду пік молекулярного іона представляє m/z $1073,9$, що вказує на те, що його молекулярна вага складає 1074 .

Таблиця 1

Аналіз мас-спектрів альгінату олігосахариди (Компонент 6)

Осколочний іон	m/z
$[M-H]^{-1}$	1073,9
$[M+Na-2H]^{-1}$	1096,6
$[M-H_2O-CO-H]^{-1}$	1028,0
$[M-ManA-CH_2O-2H_2O-H]^{-1}$	821,1
$[M-2ManA-H_2O-H]^{-1}$	704,3
$[M-2ManA-2(CH_2O)-CO-H]^{-1}$	634,4
$[M-2H]^{2-}$	536,5
$[M-3H]^{3-}$	357,4

3.4 Ядерна магнітно-резонансна спектроскопія альгінату олігосахариду

Спектри ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР альгінату олігосахариду, представленого формулою (I) ($n=4$) отри-

мували на JNM-ECP600 спектрометрі. Результати наведено в таблицях 2 і 3.

Таблиця 2

^1H ЯМР аналіз
альгінату олігосахариду (компонента 6)

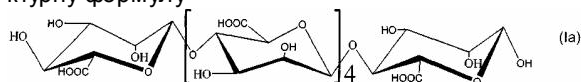
	Хімічний зсув (млн. ч.)				
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
α	5,21	3,98	4,03	4,04	4,16
β	4,91	3,99	3,77	3,90	3,77
α	4,69	4,03	3,75	3,93	3,69
β	4,64	4,03	3,75	3,65	3,69
n	4,63	3,74	3,63	3,75	4,01

Таблиця 3

¹³C-ЯМР аналіз
альгінату олігосахариду (компонента 6)

	Хімічний зсув (млн. ч.)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
r α	93,54	70,06	69,02	78,37	72,60	175,84
r β	93,74	70,42	71,60	78,28	76,08	175,84
m	99,08	70,63	71,43	78,07	75,90	175,41
n	100,15	68,48	72,47	76,27	70,05	175,27

Згідно з вищенаведеними результатами аналізів підтверджено, що альгінат олігосахариду, який міститься в вищезгаданій фракції, є гексасакхаридом маннуринової кислоти, що має наступну структурну формулу



3.5 Визначення вмісту маннуринової кислоти в альгінаті олігосахариду (¹H-ЯМР спектроскопією)

Склад альгінату олігосахариду досліджували за допомогою ¹H-ЯМР високого розділення для кількісного визначення співвідношення маннуринової кислоти до гулуринової кислоти (M/G) в альгінаті згідно з інтенсивністю сигналу протона аномерного вуглецю. Зважували 3-5мг сухого зразка, розчиняли в D₂O при нейтральному рD і додавали 0,3мг EDTA. Зразок досліджували ЯМР спектрометром Bruker DPX-300. Спектр реєстрували при 70°C так, щоб пік D₂O відійшов далеко від резонансної зони аномерного протону. Відносну інтенсивність сигналу виражали в інтегральних величинах площі піку. Результати вказують, що сигнал H-1 радикала M з'являється при 4,64млн.ч. та 4,66млн.ч (тобто H-1 сигнали м радикалу в MM і MG послідовностях, відповідно); усі сигнали H-1 радикала G з'являються при 5,05млн.ч (подвійний пік). Відносний вміст M і G в зразку може бути виражений за інтенсивностями їх H-1 наступним рівнянням:

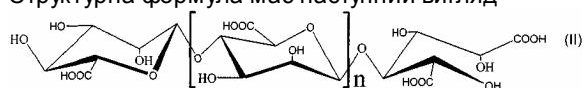
$$M\% = \frac{I_{4,64} + I_{4,66}}{I_{4,64} + I_{4,66} + I_{5,05}} \times 100\%$$

де I представляє інтенсивність піку, виражену в інтегральних величинах площі піку. За даними вищезазначеного способу відносний вміст D-маннуринової кислоти в зразку складає 98,07%,

що вказує на те, що альгінат олігосахариду головним чином складається з маннуринової кислоти.

4. Визначення структури продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду

Визначали структуру продукту окислювальної деструкції олігосахариду у фракції, отриманій в процесі одержання продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду. Було підтверджено, що продукт окислювальної деструкції є похідним альгінату олігосахариду, що складається з β-D-маннуринової кислоти, зв'язаної 1,4-глікозидними зв'язками, в якій відновна кінцева група в положенні 1 є карбоксильним радикалом. Структурна формула має наступний вигляд



де n представляє 0 або ціле число від 1 до 19.

Компонент 6 взятий як приклад для ілюстрації структурного аналізу вищезгаданого продукту окислювальної деструкції олігосахариду.

4.1 Ультрафіолетова спектрограма

Відповідну кількість продукту окислювальної деструкції розбавляли дистильованою водою до певної концентрації, і проводили дослідження за допомогою ультрафіолетового спектрофотометра Shimadzu LJV-260 (190nm~700nm) при повній довжині хвилі. Було виявлено, що не спостерігається ніяких специфічних піків поглинання в ультрафіолетовому та видимому спектрі світла

4.2 Аналіз інфрачервоних спектрів

Інфрачервоний спектр продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду досліджували за допомогою інфрачервоного мікропроцесорного спектрометра NICOLE NEXUS-470. Результати наведено в таблиці 4.

Таблиця 4

ІЧ спектри продукту
окислювальної деструкції альгінату олігосахариду

Пік абсорбції (см ⁻¹)	Вид коливання	Група	Інтенсивність
3400,56	u _{OH}	-OH	s
3219,02	u _{OH}	-OH	s
	u _{OH}	-COOH	
2924,65	u _{OH}	-COOH	m
1599,76	u _{C=O}	-COOH	s
1405,95	u _{C-O}	-COOH	s
1296,26	δ _{O-H}	-OH	m

Продовження таблиці 4

1037,84 817,14	$u_{as}(C-O-C)$ u_{as} (сахарний цикл)	безводний етер циклічний скелет маннуринової кисло-	m m
669,80	Y_{OH}	ти -OH	m

4.3 1H -ЯМР аналіз

1H ЯМР і ^{13}C ЯМР спектри продукту окислювальної деструкції отримували за допомогою ЯМР спектрометра Bruker Avance DPX-300. Як видно з 1H ЯМР спектра, він в основному складається з сигналів шести атомів водню в β -D-маннуриновій кислоті. Після визначення структури кожного сигналу було відзначено, що продукт окислювальної деструкції альгінату олігосахариду головним чином складається з маннуринової кислоти. Якщо відновною кінцевою групою в положенні 1 є альдегідна група, то хімічний зсув H-1 α та H-1 β повинен бути 5,11млн.ч. і 4,81млн.ч., відповідно. Оскільки відновною кінцевою групою в положенні 1 альгінату олігосахариду є карбоксильна група, одержана окисленням з альдегідної групи, H-1 зникає, таким чином сигнали при 5,11млн.ч. та 4,81млн.ч. зникають. Як видно з ^{13}C -ЯМР спектра, він головним чином складається з сигналів шести атомів вуглецю в β -D-маннуриновій кислоті. Після визначення структури кожного сигналу було виявлено, що молекула проміжної сполуки головним чином складається з маннуринової кислоти. У порівнянні зі спектром проміжної сполуки сигнал відновної кінцевої

групи C-1 маннуринової кислоти (94млн.ч.) зникає. Сигнал відновної кінцевої групи C-1 (175,81млн.ч.) зсувається у напрямку нижчої області. Причина полягає в тому, що відновною кінцевою групою в положенні 1 альгінату олігосахариду є карбоксильна група, одержана окисленням альдегідної групи, і хімічний зсув C-1 змінюється від приблизно 175,81млн.ч. альдегідної групи до 94млн.ч. карбоксильної групи.

4.4 Мас-спектрометричний аналіз

Мас-спектрометричний аналіз здійснювали за допомогою мас-спектрометра MALDI-TOF типу BIFLEX III від Bruker Daltonics Co. Результати представлено на Фіг.4. Як видно з Фіг.4, пік 1113,7 (m/z) представляє $[M+Na]^+$; пік 1113,7 (m/z) представляє $[M-O+Na]^+$; пік 1083,7 (m/z) представляє $[M-CH_2O+Na]^+$; пік 1067,6 (m/z) представляє $[M-CH_2O-O+Na]^+$; пік 1053,6 (m/z) представляє $[M-2(CH_2O)+Na]^+$; пік 979,6 (m/z) представляє $[M-3(CH_2O)-CO_2+Na]^+$ і пік 921,6 (m/z) представляє $[M-4(CH_2O)-CO_2-CCHNa]^+$. MC аналіз продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду наведено в таблиці 5.

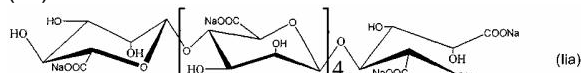
Таблиця 5

MC аналіз продукту
окислювальної деструкції альгінату олігосахариди

Осколочний іон	m/z
$[M+Na]^+$	1113,7
$[M-O+Na]^+$	1097,7
$[M-CH_2O+Na]^+$	1083,7
$[M-O-CH_2O+Na]^+$	1067,6
$[M-2(CH_2O)+Na]^+$	1053,6
$[M-3(CH_2O)-CO_2+Na]^+$	979,6
$[M-4(CH_2O)-CO_2-CO+Na]^+$	921,6

В спектрі MALDI-TOF продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду пік m/z 1113,7 представляє $[M+Na]^+$, що вказує на те, що молекулярна маса продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду складає 1090,7. В порівнянні з альгінатом олігосахариду, що піддавався дії кислотного гідролізу, молекулярна вага збільшена на 16, тобто в молекулі додався один атом кисню, можна вважати, що в процесі виготовлення альгінат олігосахариду був окислений.

Згідно з вищенаведеними результатами аналізів структура продукту окислювальної деструкції альгінату олігосахариду описується формулою (IIa):



5. Оцінка альгінату олігосахариду для лікування хвороби Альцгеймера (AD)

Як приклад для ілюстрації активності використовували 6-мер, відокремлений на Bio-Gel-P6 колонці. Таким чином альгінат олігосахариду згадується як "6-мер" в наступних експериментах.

5.1 Вплив 6-меру на AD у миші, викликану A β ₁₋₄₀

Мишей чоловічої статі лінії Balb/c вагою 18-22г (поставлених Laboratory Centre of Shandon University) зважували і поділяли на 6 груп: контрольна група, модельна група, група, оброблена 6-мером з низькою концентрацією (15мг/кг); група, оброблена 6-мером з середньою концентрацією (30мг/кг), група, оброблена 6-мером з високою концентрацією (60мг/кг) та група, оброблена Huperzin A (HBY з концентрацією 0,2мг/кг). Мишам орально вводили відповідні ліки на 3 день після розподілення на групи. Ліки призначали один раз на день в дозі 0,5мл/20г безперервно до закінчення експерименту. Мишам з контрольної та моде-

льної груп одночасно призначали еквівалентну кількість фізіологічного розчину солі.

На восьмий день після прийому ліків мишам робили ін'єкції зістареного A β ₁₋₄₀ за винятком групи, якій вводили лише наповнювач лікарської форми (без активної речовини) за методом, описаним Jhoo JH та ін. в статті "β-Amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex" [Behavioural Brain Research (2004) 155: 185-196], для створення моделі AD. Розчин зістареного A β ₁₋₄₀ вводили в правий церебральний шлуночок. Результати пробних досліджень з використанням водного лабіринту Моріса показали, що миші, оброблені A β , продемонстрували більш тривалий час затримки між стимулом і реакцією (P<0,05,

P<0,01) порівняно з контрольною та модельною групою, що вказувало на те, що модель AD у мишей створено (Фіг.6). Проте, у перший день дослідження такий збільшений час затримки між стимулом і реакцією скорочувався в усіх групах, що приймала ліки, за винятком групи, що приймала 6-мер у дозі 15мг/кг. А час затримки між стимулом і реакцією в групі, що приймала 6-мер в дозі 60мг/кг, мав статистичну значимість порівняно з часом затримки у модельній групі (P<0,05). На другий і третій день досліджень час затримки між стимулом і реакцією для всіх груп, що отримували ліки, скорочувався, і цей час для групи, що приймала 6-мер у дозі 60мг/кг, та для групи, що приймала НВУ, мав статистичну значимість порівняно з часом затримки у модельній групі (P<0,05).

Таблиця 6

Вплив 6-меру на час затримки між стимулом і реакцією у мишей з AD, викликаною A β ₁₋₄₀, в дослідженнях з водним лабіринтом Моріса ($\chi \pm SE$)

Група	Доза (мг/кг)	n	Час затримки між стимулом і реакцією (сек.)		
			1-ий день	2-ий день	3-ій день
Контрольна	-	12	49,40 \pm 8,39	54,30 \pm 11,39	42,80 \pm 10,04
Модельна	-	14	87,20 \pm 7,58 ^{##}	93,46 \pm 8,67 [#]	97,31 \pm 8,65 ^{##}
6-мер	15	14	90,07 \pm 10,71	83,29 \pm 9,53	72,83 \pm 12,50
	30	14	77,71 \pm 8,69	71,69 \pm 10,11	68,45 \pm 14,46
	60	13	56,92 \pm 9,92 [*]	63,57 \pm 10,54 [*]	62,50 \pm 13,10 [*]
НВУ	0,2	14	76,29 \pm 9,74	64,58 \pm 10,36	63,83 \pm 10,12 [*]

[#]p<0,05, ^{##}p<0,01 порівняно з контрольною групою; ^{*}p<0,05 порівняно з модельною групою.

На четвертий день експерименту з водним лабіринтом Моріса вихідну платформу видаляли і реєстрували відсоток часу перебування мишей у стадії вихідної платформи протягом 60 секунд. Результати показали, що миші в модельній групі проявили значно менший зсув часу затримки між

стимулом і реакцією, ніж в контрольній групі (P<0,05), і зсув часу затримки між стимулом і реакцією значно підвищувався після прийому 6-меру порівняно з модельною групою (P<0,05) (таблиця 7).

Таблиця 7

Вплив 6-меру на пробні дослідження мишей з AD, викликаною A β ₁₋₄₀, в дослідженнях з водним лабіринтом Моріса ($\chi \pm SE$)

Група	Доза (мг/кг)	n	Зсув часу затримки (%)
Контрольна	-	12	29,48 \pm 5,47
Модельна	-	14	11,83 \pm 3,33 [#]
6-мер	15	14	19,67 \pm 5,15
	30	14	22,99 \pm 5,79
	60	13	28,44 \pm 6,08 [*]
НВУ	0,2	14	22,18 \pm 5,93

[#]P<0,05 порівняно з контрольною групою; ^{*}P<0,05 порівняно з модельною групою.

На 25 день після A β ін'єкції мишей в подальшому готували для поетапного тесту на умовну реакцію пасивного уникнення. В цьому завданні кожну мишу поміщали в освітлювану камеру пристрою головою від темної камери, і двері відкривали, забезпечуючи доступ до темної камери. Як тільки миша входила до темної камери, вона

отримувала неминучий електричний удар по ногах (36v) через сітчасту підлогу з нержавіючої сталі. Через 24 години експеримент повторювали аналогічним чином. Час входження кожної миші в темну камеру (поетапна реакція затримки між стимулом і реакцією, максимальний час тестування обмежу-

вався 3 хвилинами) та кількість входів в темну камеру (кількість помилок) реєстрували.

Результати експерименту поетапного тесту на умовну реакцію пасивного уникнення показані на Фіг 5 і 6. В кожній групі було 8 тварин. Результати представлені як середні значення \pm похибки визначення. Символ # означає значну відмінність порівняно з контрольною групою ($P < 0,05$), * означає значну відмінність порівняно з модельною групою ($P < 0,05$). Час поетапної реакції затримки в групі, що отримувала $A\beta_{1-40}$, скорочувався ($P < 0,01$), а кількість помилок збільшувалася ($P < 0,05$) порівняно з кількістю в контрольній групі, що вказувало на успішне створення моделі AD у мишей. Однак, час поетапної реакції затримки помітно продовжувався в групах, що отримувала 30 і 60 мг/кг 6-меру, і в групі, що отримувала НВУ-ліки, а кількість помилок значно зменшувалася в групах, які отримували 6-мер та НВУ, що вказує на те, що 6-мер значно покращує функції навчання та пам'яті у тварин з моделлю AD, викликаною $A\beta_{1-40}$.

Вплив 6-меру на біохімічні показники мозку мишей з AD, викликаною $A\beta_{1-40}$.

Після поведінкового експерименту тваринам відтинали голову. Кору головного мозку та гіпо-

камп зразу ж препарували і після швидкого заморожування рідким азотом протягом години зберігали при -80°C . Визначали за допомогою відповідних наборів активність MDA, SOD, GSH-PX, Na^{+} , K^{+} -ATPase, AchE і ChAT в ділянках головного мозку. Гомогенат кори головного мозку та гіпокампа готували за допомогою насиченого розчину солі з кінцевими концентраціями 10% і 5%. Після центрифугування зі швидкістю 3600 об./хвил. отримували надосадову рідину для вимірювання активності MDA, CuZn-SOD, GSH-PX, $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase, AchE і ChAT. Активність ChAT визначали з використанням способу мічення ізотопами. Інші показники та кількість загальних білків досліджували за допомогою відповідних наборів, що виробляються Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute.

(1) Вплив 6-меру на активність ChAT у мишей з AD

Активність ChAT в корі головного мозку помітно зменшувалася після $A\beta$ порівняно з контрольною групою ($P < 0,05$). Однак, його активність підвищується після лікування 6-мером та НВУ, де лікувальний ефект 30 мг/кг та 60 мг/кг 6-меру та НВУ є статистично значущим (таблиця 8).

Таблиця 8

Вплив 6-меру на активність ChAT в корі головного мозку у мишей з AD, викликаною $A\beta_{1-40}$ ($n=10$, ($\chi \pm \text{SE}$))

Група	Доза (мг/кг)	Активність ChAT (пмоль /мг прот./хвил)
Контрольна	-	92,17 \pm 2,95
Модельна	-	77,26 \pm 4,9 [#]
6-мер	15	90,94 \pm 3,77
	30	99,98 \pm 5,07 ^{**}
	60	94,69 \pm 5,83 [*]
	0,2	100,70 \pm 5,99 [*]
НВУ	0,2	100,70 \pm 5,99 [*]

[#] $P < 0,05$ відносно контрольної групи; ^{*} $P < 0,05$, ^{**} $P < 0,01$ відносно модельної групи.

(2) Вплив 6-меру на активність SOD у мишей з AD

Активність SOD в мозку зменшується після лікування за допомогою $A\beta$, але не є статистично значущим порівняно з контрольною групою. Його

активність значно підвищується як у корі головного мозку, так і в гіпокампі після лікування за допомогою 6-меру в дозі 60 мг/кг, що вказує на те, що механізм впливу 6-меру на AD пов'язаний з покращенням антиоксидантної активності (Таблиця 9).

Таблиця 9

Вплив 6-меру на активність SOD кори головного мозку і гіпокампа у мишей з AD, викликаною $A\beta_{1-40}$ ($n=10$, ($\chi \pm \text{SE}$))

Група	Доза (мг/кг)	Активність SOD (NU/мг прот.)	
		кори головного мозку	гіпокампа
Контрольна	-	53,48 \pm 1,56	66,35 \pm 4,74
Модельна	-	49,99 \pm 2,41	62,24 \pm 4,16
6-мер	15	49,35 \pm 2,27	69,76 \pm 6,12
	30	51,84 \pm 2,07	61,72 \pm 4,27
	60	57,50 \pm 2,51 [*]	79,97 \pm 7,34 [*]
	0,2	48,95 \pm 2,13	69,91 \pm 6,51
НВУ	0,2	48,95 \pm 2,13	69,91 \pm 6,51

^{*} $P < 0,05$ відносно модельної групи.

(3) Вплив 6-меру на вміст MDA у мишей з AD

Вміст MDA в корі головного мозку та гіпокампі мишей не має значної різниці порівняно з контрольною групою. Його вміст зменшується в мозку після лікування за допомогою НВУ та 6-меру в дозі

30мг/кг та 60мг/кг, що вказує на те, що обое з них мають здатність покращувати реакцію на окислення та пошкодження мозку вільними радикалами та захищати мозок від окислювального пошкодження (таблиця 10).

Таблиця 10

Вплив 6-меру на вміст MDA в корі головного мозку і гіпокампі у мишей з AD, викликаню A β ₁₋₄₀ (n=10, ($\chi \pm SE$))

Група	Доза (мг/кг)	Вміст MDA (нмоль/мл)	
		кора головного мозку	гіпокамп
Контрольна	-	2,61 \pm 0,22	4,75 \pm 0,66
Модельна	-	2,18 \pm 0,23	5,17 \pm 0,47
6-мер	15	1,79 \pm 0,15	4,28 \pm 0,82
	30	1,87 \pm 0,18	2,48 \pm 0,43**
	60	1,47 \pm 0,11**	2,18 \pm 0,43**
НВУ	0,2	1,61 \pm 0,13*	2,26 \pm 0,39**

*P<0,05, **P<0,01 відносно модельної групи.

(4) Вплив 6-меру на активність GSH-PX у мишей з AD, викликаню A β ₁₋₄₀

Активність GSH-PX в корі головного мозку і гіпокампі мишей зменшується після використання A β із значною різницею відносно контрольної групи в гіпокампі (p<0,05) Його активність підвищується

в корі головного мозку після лікування із застосуванням 6-меру, причому активність значно відрізняється після лікування альгінатом олігосахариду в дозі 60мг/кг та НВУ (p<0,05) Результати наведено в Таблиці 11.

Таблиця 11

Вплив 6-меру на активність GSH-PX в корі головного мозку і гіпокампі у мишей з AD, викликаню A β ₁₋₄₀ (n=10, ($\chi \pm SE$))

Група	Доза (мг/кг)	GSH-PX (U/мг прот.)	
		кора головного мозку	гіпокамп
Контрольна	-	7,81 \pm 1,20	5,39 \pm 0,67
Модельна	-	6,43 \pm 1,56	3,13 \pm 0,58 [#]
6-мер	15	8,53 \pm 0,86	4,13 \pm 0,58
	30	7,12 \pm 1,10	4,25 \pm 0,54
	60	10,75 \pm 1,80*	4,81 \pm 0,95
НВУ	0,2	8,85 \pm 1,33	5,29 \pm 0,99*

[#]P<0,05 порівняно з контрольною групою; *P<0,05 порівняно з модельною групою.

(5) Вплив 6-меру на активність Na⁺, K⁺-АТРази у мишей з AD

Ферментативна активність Na⁺,K⁺-АТРази в корі головного мозку і гіпокампі значно зменшується після лікування A β порівняно з контрольною групою, що вказує на те, що A β значною мірою впливає на енергетичний метаболізм нейронів в мозку. Однак, його активність значно підвищується

після лікування альгінатом олігосахариду в трьох різних дозах, причому активність значно підвищується в гіпокампі після лікування дозою 60мг/кг порівняно з НВУ, що вказує на те, що покращення рівня енергетичного метаболізму в мозку може бути одним з механізмів захисту альгінатом олігосахариду функції мозку та анти-AD. Результати наведено в таблиці 12.

Таблиця 12

Вплив альгінату
олігосахариди на активність Na⁺,
K⁺-АТРази в корі головного мозку та гіпокампі
у мишей з AD, викликаного Aβ₁₋₄₀ (n=10, (χ±SE))

Група	Доза (мг/кг)	АТРазна активність (мкмоль Рі/мг прот./год.)	
		кора головного мозку	гіпокамп
Контрольна	-	1,06±0,05	2,65±0,38
Модельна	-	0,89±0,06 [#]	1,62±0,17 [#]
6-мер	15	1,08±0,06 [*]	2,10±0,29
	30	1,09±0,08 [*]	2,07±0,23
	60	1,08±0,05	2,52±0,25
НВУ	0,2	0,91±0,05	2,35±0,43

[#]P<0,05 порівняно з контрольною групою; ^{*}P<0,05 порівняно з модельною групою.

5.2 Захисна дія альгінату олігосахариду на нейрон від впливу Aβ in vitro

За методикою, описаною в [Banker GA та ін., Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Res, 1977, 126: 397-425], вирощували початкові нейрони кори мозку миші, експеримент почали після тижня вирощування. Тобто, на восьмий день заміняли культуральну рідину клітин і додавали альгінат олігосахарид (кінцева концентрація 0, 10, 50, 100мг/мл) протягом 24 годин, після чого додавали зістарений Aβ₂₅₋₃₅ (спочатку розчиняли в дистильованій воді з концентрацією 1мг/мл, залишали розчин на 7 днів при температурі 37°C для старіння Aβ₂₅₋₃₅ і зберігали при -20°C до використання) з кінцевою концентрацією 30мкМ. Через 24 години при 37°C додавали 10мкл МТТ з концентрацією 5мг/мл. Через 4 години при 37°C надосадову рідину видаляли і додавали 150мкл ДМСО. Абсорбцію при 570нм (630нм як порівняння) знімали, використовуючи читувач ELISA (Rainbow, TECAN, Австрія).

Результати показали, що після 24 годин інкубації нейронів з 30мкМ зістареного Aβ₂₅₋₃₅, рівень відновленого МТТ помітно знизився і коефіцієнт виживання клітин значно знижувався до 54,5±8,9% (P<0,001), після обробки Aβ₂₅₋₃₅. Дози 10, 50, 100мг/мл альгінату олігосахариду можуть значно збільшувати виживання клітин, оброблених Aβ₂₅₋₃₅, в дозозалежній манері (коефіцієнти виживання складають 72,0±11,2%, 77,1±8,1% і 82,3±11,6%).

Альгінат олігосахариду мав подібну захисну дію на нейронну клітинну лінію SH-SY5Y як первинні нейрони. Дія протягом 48 годин 30мкМ зістарених Aβ₂₅₋₃₅ (Fig.7) і 2мкМ Aβ₁₋₄₀ (Fig.8) на SH-SY5Y клітини може викликати ряд змін, наприклад, пошкодження клітин, зменшення кількості клітин, клітини частково закруглюються і суспендуються. Також зменшується коефіцієнт виживання клітин до 73,3±9,4% і 64,1±2,5%, відповідно. Але застосування 50, 100мг/мл альгінату олігосахариду може помітно інгібувати дію Aβ, що зменшує кількість плаваючих клітин і збільшує коефіцієнт виживання.

З вищезазначених результатів експериментів зробили висновок: ендосоматичний олігосахарид

альгінату може помітно скоротити час затримки між стимулом і реакцією мишей з AD, індукованою ін'єкцією Aβ₁₋₄₀; збільшити кількість проходів цих мишей через платформу та скоротити час досягнення місця платформи, поліпшити функцію навчання і пам'ять таких мишей. Ці in vivo результати, також як і in vivo захисна дія на первинні і нейронні клітини показали, що альгінат олігосахариду має анти-AD активність.

6. Дослідження механізму дії альгінату олігосахариду на AD

6.1 Вплив альгінату олігосахариду на апоптоз SH-SY5Y клітин, індукований Aβ₂₅₋₃₅

SH-SY5Y клітини інкубували в 6-лункових планшетах з густиною 2×10⁵ клітин на лунку. На наступний день клітини обробляли різними концентраціями (0, 50, 100мг/мл) альгінату олігосахариду протягом 24г, після чого додавали 30мкМ зістареного Aβ₂₅₋₃₅ (одержували від Sigma. Co.). Через 48г при 37°C клітини перетравлювали, збирали, промивали, центрифугували при 1200об./хв. і інкубували з 200мл суміші 5мг/мл прорідію йодиду (Nuciope Co.) і 100 У/мл РНази (Nuciope Co.). Потім клітини аналізували, використовуючи поточковий цитометр (BD Co., US), з 8000 клітинами на зразок.

Було виявлено, що SH-SY5Y клітини, стимулювані 30мкМ зістареного Aβ₂₅₋₃₅ протягом 48од., г мають 24,8±1,9% гіподиплоїдних клітин. Однак, попередньо оброблені 50 і 100мг/мл альгінату олігосахариду протягом 24год., значно супресують апоптоз, викликаний зістареним Aβ₂₅₋₃₅, і спостерігається відсоток гіподиплоїдних клітин 10,2±1,3% і 5,1±0,7%, відповідно.

Крім того, виявлено, що альгінат олігосахариду також в значній мірі затримує апоптичний каскад шляхом зворотного перевантаження внутрішньоклітинними іонами кальцію і акумулювання ROS, і шляхом ап-регуляції експресії Bcl-2 і даун-регуляції експресії P53 і Caspase-3 індукованої Aβ. Всі ці фактори забезпечують терапевтичну цінність альгінату олігосахариду при лікуванні AD.

6.2 Молекулярний механізм дії альгінату олігосахариду на анти-нейронну токсичність Aβ

(1) Дія альгінату олігосахариду на утворення фібрил A β ₁₋₄₀

Свіжий A β ₁₋₄₀ інкубували окремо або з альгінатом олігосахариду (кінцева концентрація 10, 50, і 100мкг/мл, відповідно) при 37°C протягом 24г. Після інкубування додавали Th-T і контролювали флуоресцентну інтенсивність при Em=480nm і Ex=480nm.

Результати показали, що альгінат олігосахариду (в дозі 10, 50, 100мкг/мл) може інгібувати акумулювання A β ₁₋₄₀, де інгібувальна дія 100мкг/мл альгінату олігосахариду є найбільш очевидною. Флуоресцентна інтенсивність становить 10,46±0,94, 9,18±1,32 і 7,81±1,38 (p<0,05, 0,05 і 0,001, відповідно), відповідно. Досліджували ту ж саму дію альгінату олігосахариду на формування фібрил A β ₁₋₄₀ з TEM (Fig.9), що вказує, що альгінат олігосахариду може значно інгібувати утворення фібрил A β ₁₋₄₀. Крім того, знайдено, що альгінат олігосахариду проявляє значну інгібувальну дію на утворення фібрил A β ₁₋₄₀, полегшене гепарином з використанням TEM. На Fig.9 A показує результати інкубування A β ₁₋₄₀ окремо протягом 24год.; B показує результати інкубування сумішшю A β ₁₋₄₀ і гепарину протягом 24год.; C показує результати інкубування сумішшю A β ₁₋₄₀ і альгінату олігосахариду протягом 24год.; D показує результати інкубування сумішшю A β ₁₋₄₀, гепарин і альгінат олігосахариду протягом 24год.; E показує результати інкубування A β ₁₋₄₀ окремо протягом 48год.; F показує результати інкубування сумішшю A β ₁₋₄₀ і гепарину протягом 48год.; G показує результати інкубування сумішшю A β ₁₋₄₀ і альгінату олігосахариду протягом 48год.; і H показує результати інкубування сумішшю A β ₁₋₄₀, гепарину і альгінату олігосахариду протягом 48год.

(2) Дія олігосахариду альгінату на дестабільність A β ₁₋₄₀ фібрил.

1мг/мл A β ₁₋₄₀, розчиненого в дистильованій воді, зістарювали при 37°C протягом 7 днів, після чого його витримували з альгінатом олігосахариду протягом 3 днів Зразок мітили ацетатом урану і TEM (JEM 1200EX), що показує, що A β ₁₋₄₀ призводить до утворення довгих сплєтених волокон після старіння протягом 7 днів (Fig.10A). В присутності гепарину протягом ще 24 годин довгі сплєтені волокна стають більш щільними і довшими порівняно з тими, що утворюються за відсутності гепарину (Fig.10B). Особливо, в присутності альгінату олігосахариду протягом додаткових 3 днів довгі і агреговані A β волокна перетворюються у менш нерегулярні короткі волокна (Fig.10C). Це наводить на думку, що альгінат олігосахариду здатний змінювати попередньо утворені A β фібрили, розкриваючи дестабілізуючу дію альгінату олігосахариду на попередньо утворені A β фібрили і таким чином має потенційний терапевтичний вплив.

(3) Дія олігосахариду альгінату на пристосування до A β ₁₋₄₀

CD спектр (J-500A, JASCO, Japan) мономерного A β ₁₋₄₀ (250мкг/мл в TBS (100mM Tris, 50mM NaCl, pH7,4)), інкубованого при 37°C протягом 12год., загалом характеризується β -пластинчастою вторинною структурою (Fig.11A). Наступне витримання мономерного A β ₁₋₄₀ з альгінатом олігосаха-

риду (100мкг/мл) протягом 12год. попереджає β -листоє утворення (Fig.11C). Однак, гепарин значно прискорює конформаційний перехід у β -листову структуру (Fig.11 B).

(4) Взаємодія між альгінатом олігосахариду і A β

SPR методику (BIAcore X, Uppsala, Sweden) використовували для характеризувати взаємодії альгінату олігосахариду і A β . A β ₁₋₄₀ різного ступеню зістарення (зістарювали 0, 0,5, 1, 2, 4, 6 днів при 37°C) in HBS EP буферному розчині (0,01 M HEPES, 150моль/л NaCl, 3,4моль/л EDTA-Na₂, 0,005об.% Tween-20, pH7,4) з 5 концентраціями пропускали через сенсорний чіп з іммобілізованим альгінатом олігосахариду. Швидкість потоку складала 5мкл/хв, а ін'єкований об'єм - 10мкл. Знімали сенсограми зв'язування і сенсорний чіп регенерували, оброблюючи 2M NaCl.

Знайденно, що всі A β ₁₋₄₀ з різним ступенем зістарення можуть зв'язувати альгінат олігосахариду. Спорідненість зв'язування є слабшою для свіжого A β ₁₋₄₀ і альгінату олігосахариду із значенням K_D 6,85E-07M. Спорідненість зв'язування збільшується із збільшенням ступеню зістарення (значення K_D є 1,07E-07, 9,06E-08, 5,43E-08, 2,15E-08, 1,45E-08M, відповідно), і стає, по суті, стабільною після зістарення протягом 2 днів.

Наступні дослідження показали, що альгінат олігосахариду зв'язується з повнодовжинним A β через His13~Lys16, і зв'язується з A β ₂₅₋₃₅ через Ser26~Lys28. Зв'язування альгінату олігосахариду із свіжим A β може сприяти його інгібуванню фібриллогенезу A β . Зв'язування олігосахариду альгінату із зістареним A β може сприяти дестабільності A β фібрил.

Наведені вище дослідження показали, що молекулярні механізми пояснюються тим фактом, що альгінат олігосахариду або затримує фібриллогенетичні процеси і особливо розбирає попередньо утворені A β фібрили. Ці результати вказують на те, що альгінат олігосахариду діє як антагоніст повного A β каскаду, є потенційним агентом по попередженню і лікуванню AD, який забезпечує підтвердження принципу нової стратегії для лікування AD.

7 Дослідження альгінату олігосахариду на моделях діабету

7.1 Захисна дія альгінату олігосахариду на панкреатичні бета-клітини, пошкоджені аміліном in vitro

Панкреатичні бета-клітини людини лінії клітин NIT культивували в DMEM середовищі, що містило 10% SET. Клітини інкубували в 96-лункових планшетах з густиною 1×10⁴клітин/лунку. На наступний день після висівання вони оброблялись різними концентраціями альгінату олігосахариду (кінцева концентрація 0, 10, 50, 100мкг/мл) протягом 24год., після чого додавався зістарений амілін з кінцевою концентрацією 30мкМ. Через 48год. при 37°C, вимірювали виживання клітин за МТТ методом.

Результати показують, що альгінат олігосахариду може збільшувати виживання клітин, пошкоджених аміліном в дозо-залежній манері (Fig.12). Кожна група включала 6 тварин Дані показані як значення ±SE. ## означає статистичну різницю

порівняно з контрольною групою ($p < 0,01$). * і ** означає статистичну різницю порівняно з IAPP обробленою групою ($p < 0,05$ і $p < 0,01$). Дані вказують на те, що альгінат олігосахариду має захисну дію на панкреатичні бета-клітини порівняно з аміліном.

7.2 Дія альгінату олігосахариду на діабет у мишей, викликаний стрептозотоцином (STZ) *in vivo*

Шістдесят самців NIH мишей (вагою 18-22г) випадково розподіляли на контрольну, модельну, оброблену 50, 150, 450мг/кг альгінату олігосахариду і оброблену 5мг/кг диметилгуанідином групи.

Мишам інтраперітонеально ін'єктували 150мг/кг STZ, за винятком контрольної групи, в 1-ий день. Потім мишам давали відповідні лікарські засоби безперервно протягом 10 днів і очні яблука виймали і екстрагували кров на 11-ий день. В крові вимірювали концентрацію глюкози. Концентрації глюкози у кожної тварини, обробленої альгінатом олігосахариду, були значно меншими, ніж у тварин модельної групи, що вказує на те, що альгінат олігосахариду має терапевтичну дію на STZ-викликаний діабет у мишей (Таблиця 13).

Таблиця 13

Вплив альгінату олігосахариди
на концентрацію глюкози в крові мишей, що мають діабет, індукований стрептозотоцином (STZ) ($\chi \pm SD$)

Група	Доза (мг/кг)	Кількість мишей	Концентрація глюкози в крові (мг/дл)
Контрольна	-	10	150,6 \pm 36,8
Модельна	-	10	312,4 \pm 189,2 ^{####}
6-мер	50	10	219,4 \pm 67,8*
	150	10	179,6 \pm 69,8'
	450	10	162,5 \pm 3'
НВУ	5	10	201,6 \pm 58,9'

^{####} $P < 0,05$ відносно контрольної групи; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно модельної групи.

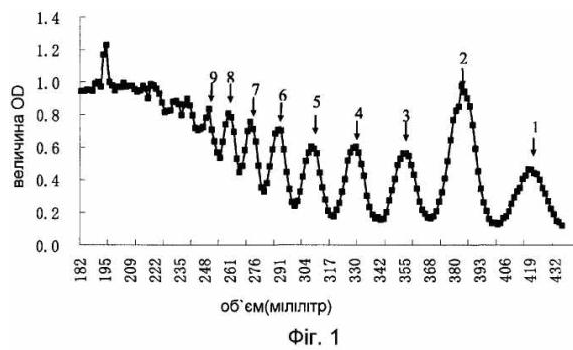
Такі ж експерименти проводили з 2-мером до 22-меру окремо або з їх сумішшю, або з продуктами їх окислювальної деструкції. Результати є подібними до результатів з 6-мером, що вказує на їх потенційну активність для лікування AD та діабету. Фіг.13-16 показують результати впливу суміші продуктів окислювальної деструкції альгінату олігосахариду на мишей з AD, індукованою шляхом ін'єкції A β_{1-40} в мозок. У кожній експериментальній групі було 8 тварин. Результати представлені як середнє значення \pm похибки вимірювання. Символами # та ## позначають статистичну різницю в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$, $p < 0,01$), а символами * та ** - статистичну різницю в порівнянні з модельною групою ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Результати показують, що суміш продуктів окислювальної деструкції олігосахариду може значно покращувати здатність до навчання і запам'ятовування у тварин з AD. На Фіг.17 наведено результати захисної дії суміші продуктів окислювальної деструкції альгінату олігосахариду на бета-клітини підшлункової залози лінії NIT, ушкоджені аміліном (IAPP). Кожна експериментальна група мала 6 тварин. Результати представлені як середнє значення \pm похибки вимірювання. Символ ## позначає

статистичну різницю в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,01$). Символи * та ** позначають статистичну різницю в порівнянні з модельною групою ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Результати показують, що суміш продуктів окислювальної деструкції олігосахариду має значний профілактичний та лікувальний ефект на діабет.

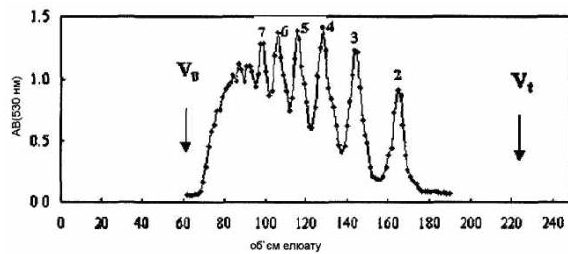
8. Статистична обробка

Результати аналізували з використанням програмного забезпечення статистичної обробки Statview та виражали виражатися як середнє значення \pm похибки вимірювання шляхом дисперсійного аналізу (ANOVA).

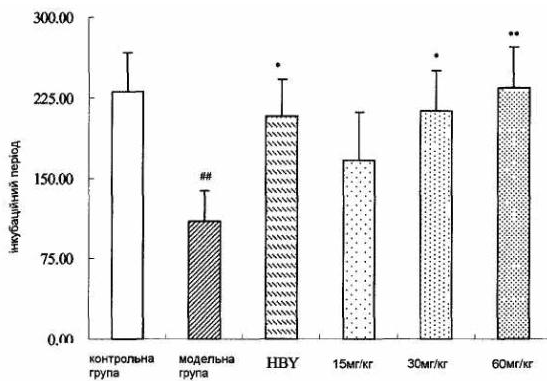
Базуючись на наведених вище результатах, можна одержати фармацевтичну композицію, яка містить ефективну кількість альгінатів олігосахаридів та фармацевтично прийнятні носії. Згадана фармацевтична композиція включає інгібітор утворення білка амілоїду- β фібрил та інгібітор утворення білка амілоїду фібрил острівців підшлункової залози. Альгінат олігосахариду згідно представленого винаходу має важливе значення для одержання лікарських засобів для профілактики та лікування хвороби Альцгеймера та діабетів.



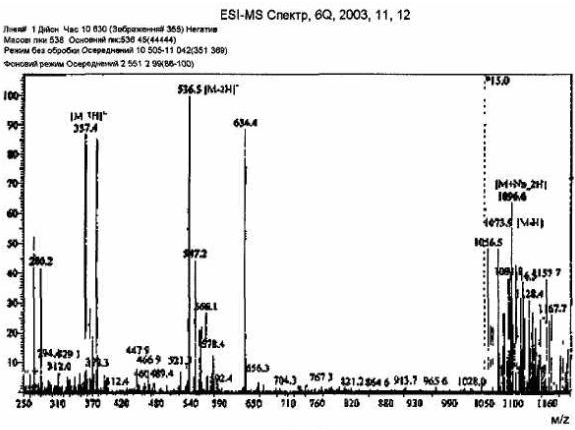
Фіг. 1



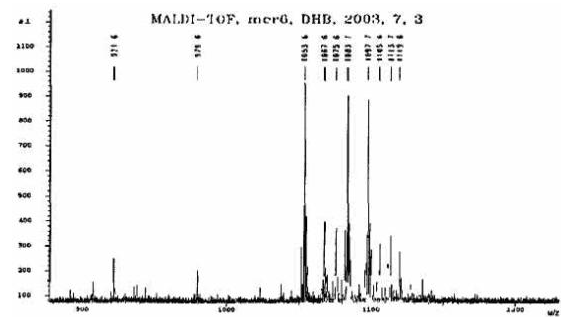
Фіг. 3



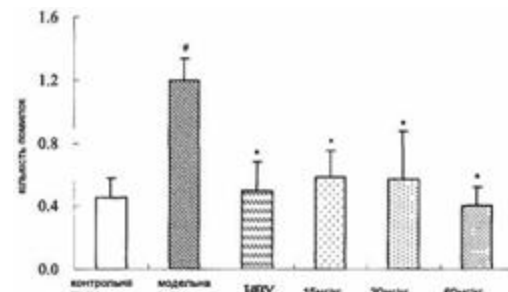
Фіг. 5



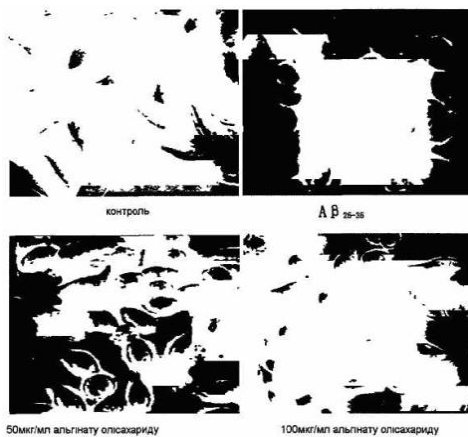
Фіг. 2



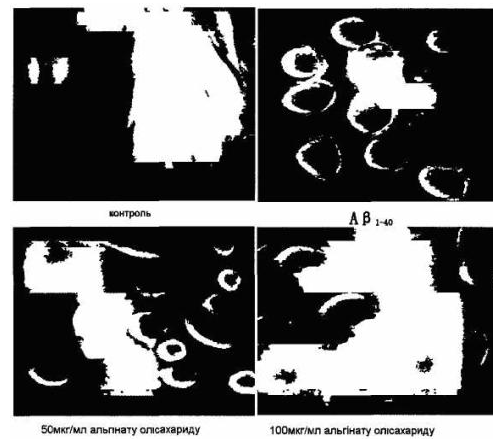
Фіг. 4



Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8

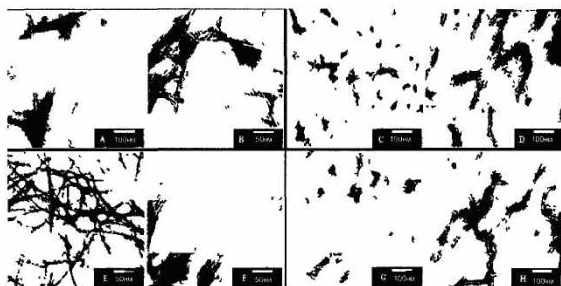


Fig. 9

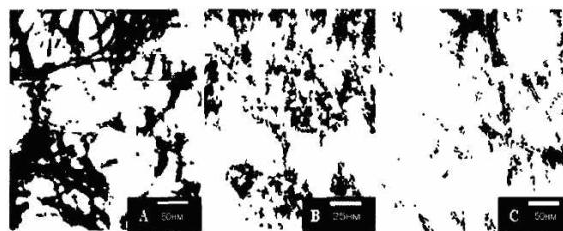


Fig. 10

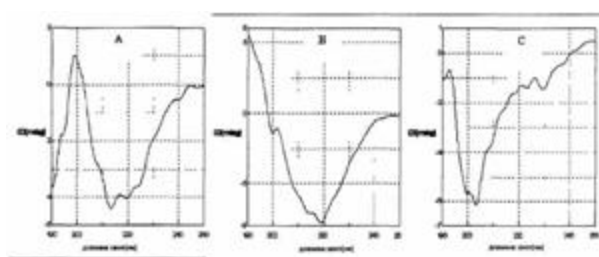


Fig. 11

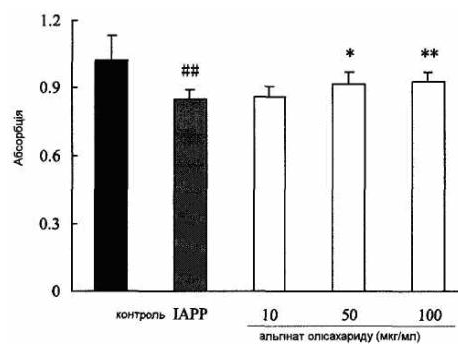


Fig. 12

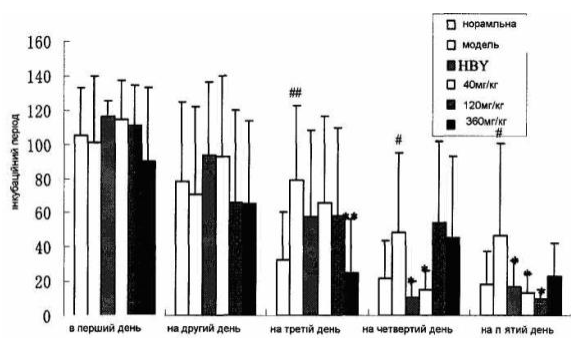


Fig. 13

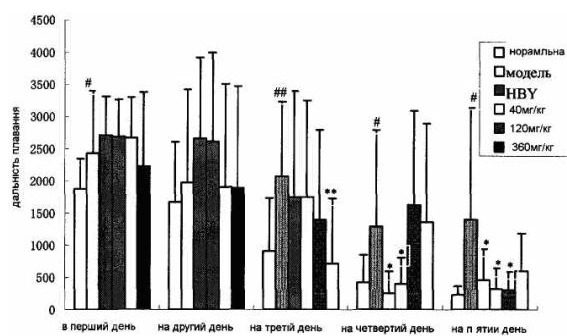


Fig. 14

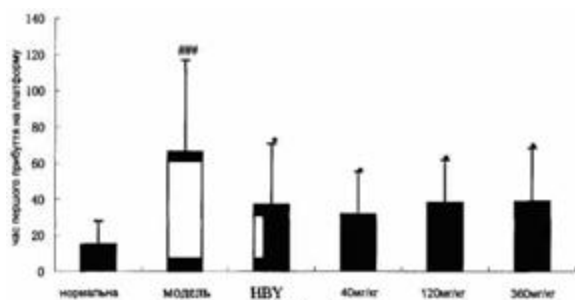


Fig. 15

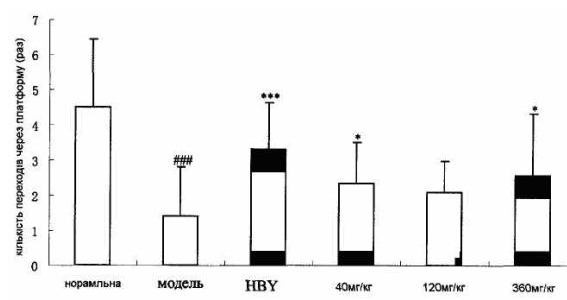
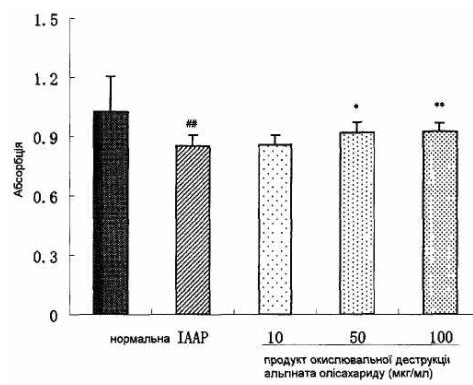


Fig. 16



Фіг. 17