

Винахід відноситься догалузї медицини, а саме фармації, і може бути використаний при створенні нового лікарського засобу з інтерфероніндукуючою активністю для боротьби з інфекційними та іншими хворобами.

В науковій літературі описано фітозасіб, приготований на основі біологічно активних речовин, виділених із листків скумпії звичайної (*Cotinus coggygria*), який здатний стимулювати у мишей утворення інтерферону [1].

Відомий спосіб одержання такого фітопрепарату, основні умови виконання якого включають багаторазову екстракцію етиловим спиртом при співвідношенні 1:15-1:20 з наступним ліофільним висушуванням кінцевого продукту, дозволяє отримати очищений поліфенольний комплекс у вигляді стійкої, впродовж 2 - 2,5 років, хімічної субстанції.

Недоліком даного способу є те, що одержаний рослинний екстракт володіє помірною токсичністю, що не дозволяє розширити діапазон активних доз, які проявляли б виражену інтерфероніндукуючу дію.

В основу винаходу поставлено завдання удосконалити спосіб одержання інтерфероніндукуючого фітозасобу, в якому проводять очистку лікарської рослинної сировини і кінцевого продукту від супутніх речовин, а також багаторазове екстрагування рослинної сировини до її виснаження, чим забезпечується повнота екстракції та вихід очищеного продукту в кількості 23,7 - 26,3% від вихідної сировини, і за рахунок цього кінцевий продукт стає більш стабільним (впродовж 3-3,5 років), менш токсичним і проявляє високу інтерфероніндукуючу активність.

Поставлене завдання вирішується тим, що спосіб одержання інтерфероніндукуючого фітозасобу, яке включає використання висушених листків скумпії звичайної, їх подрібнення, багаторазову екстракцію етиловим спиртом при співвідношенні 1:15 - 1:20, попередню очистку екстракту від супутніх речовин і ліофільне висушування кінцевого продукту, згідно винаходу виділення поліфенольного комплексу здійснюють при кімнатній температурі, проводять додаткову очистку екстракту від ліпофільних речовин і фенолокіслот з наступним видаленням білково-полісахаридного комплексу.

Винахідницький рівень досягається тим, що удосконалений спосіб екстрагування листків скумпії звичайної приводить до одержання кінцевого продукту з вищим виходом очищеного поліфенольного комплексу, є більш хімічно стабільним, менш токсичним і володіє вищою інтерфероніндукуючою активністю.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином.

Листки скумпії звичайної (*Cotinus coggygria*), попередньо висушені та подрібнені нагрубий порошок з діаметром частин 2-5 мм, обробляють хлороформом в апараті Сокслета при температурі кипіння розчинника протягом 15-18 годин до обезбарвлення зливів хлороформу. Висушену лікарську рослинну сировину екстрагували діетиловим ефіром у співвідношенні 1:10 - 1:15 при кімнатній температурі впродовж 30-40 хвилин при періодичному перемішуванні. Екстракцію діетиловим ефіром проводили 3-4 рази.

Очищену таким чином від супутніх речовин (ліпофільні речовини та фенолокіслоти) рослинну сировину висушували і екстрагували поліфенольні сполуки 50-70% етиловим спиртом. Поліфенольні сполуки виділяли етанолом 4-5 разів впродовж 60-90 хвилин при нагріванні та при кімнатній температурі впродовж 3-4 діб у співвідношенні сировина - екстрагент 1:15 - 1:20. Об'єднані екстракти фільтрували і відганяли етанол за допомогою вакууму. Потім екстракт позбавляли білково-полісахаридного комплексу, розводили потрійним об'ємом очищеної води і фільтрували. Фільтрат розливали у флакони на 500мл і проводили ліофільну сушку.

Висушений екстракт представляє собою суму біологічно активних речовин поліфенольного характеру у вигляді пігментного, аморфного порошку світло-жовтого кольору без запаху і терпкого смаку. Вихід кінцевого продукту становить 23,7 - 26,3% . У ліофілізаті виявлені таніди і невелика кількість флавоноїдів. Рослинний ліофілізований засіб умовно позначений "SK".

Спосіб ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1. 100г подрібнених листків скумпії звичайної очищують від ліпофільного комплексу та фенолокіслот послідовною екстракцією хлороформом і діетиловим ефіром. Оброблену рослинну сировину висушували і екстрагували поліфенольні сполуки в круглодонній колбі ємністю 2000мл 50% етиловим спиртом. Екстракцію проводили у співвідношенні сировина - екстрагент 1:20 при температурі кипіння розчинника із зворотнім холодильником протягом 60 хв. Екстракцію повторяли ще тричі. Екстракти об'єднували і відганяли етанол за допомогою вакууму. Потім з екстракту осаджували потрійним об'ємом ацетону білково-полісахаридний комплекс і фільтрували. З фільтрату відганяли ацетон за допомогою роторного випарювача, водний залишок розводили очищеною водою, фільтрували, розливали у флакони на 500мл і проводили ліофільну сушку. Вихід кінцевого продукту, умовно позначеного шифром SK-15, становив 26,3%.

Приклад 2. 100г подрібнених і очищених від супутніх речовин листків скумпії звичайної вносили в круглодонну колбу ємністю 2000мл.

Діючі речовини з лікарської рослинної сировини екстрагували 50% етиловим спиртом у співвідношенні 1:15 при кімнатній температурі впродовж 24 год. з наступним двогодинним змішуванням. Витяг фільтрували і екстракцію повторяли ще 2 рази. Екстракти об'єднували і відганяли етанол за допомогою вакууму. Потім з екстракту видаляли білково-полісахаридний комплекс, як вказано вище, і водний залишок розводили трикратним об'ємом очищеної води та фільтрували. Фільтрат розливали у флакони на 500мл і проводили ліофільну сушку. Вихід кінцевого продукту, умовно позначеного SK-19, становив 24,1%.

Приклад 3. 100г подрібнених і очищених від супутніх речовин листків скумпії звичайної вносили в круглодонну колбу ємністю 2000мл. Біологічно активні речовини з сировини екстрагували 70% етиловим спиртом у співвідношенні 1:20 при кімнатній температурі впродовж 24 год з наступним двогодинним перемішуванням. Екстракцію повторяли ще 3 рази. Екстракти об'єднували і відганяли етанол за допомогою вакууму. Потім екстракт очищали від білково-полісахаридного комплексу, розводили потрійним об'ємом очищеної води і фільтрували. Фільтрат розливали у флакони на 500мл і проводили ліофільну сушку. Вихід кінцевого продукту, умовно позначеного SK-20, становив 23,7%.

Вивчення інтерфероніндукуючої активності одержаних фітозасобів проводили в дослідах на мишах лінії СВА згідно з вимогами і методами, рекомендованими для оцінки індукторів інтерферону [2].

Ліофілізований екстракт вводили тваринам масою 12-14г одноразово доочередно (д/о) в дозах 80, 60 і 40мг/кг. Через 5, 24, 48 год у них проводили забір крові, використавши на кожну експериментальну умову по 4 миші. В одержаних пробах сироваток крові визначали рівень інтерферону мікрометодом в культурі клітин L-929 по затримці цитопатичної дії (ЦПД) тест-вірусу енцефаломіокардиту мишей (ЕМС).

Для порівняльної характеристики і оцінки активності досліджуваних варіантів фітозасобу SK в якості прототипу за способом отримання та характером дії використовували згаданий вище фітопрепарат ТН, який застосовували за оптимальною для нього схемою введення: д/о в дозі 40мг/кг [1].

Гостру токсичність рослинних екстрактів визначали при одноразовому д/о введенні білим мишам масою 10-12г 4-х і більше концентрацій, зростаючих у 2-х разовій прогресії, використовуючи на кожну концентрацію по 6 тварин. За тваринами спостерігали 2 тижні, щоденно здійснюючи облік їх загибелі. Вирахування мінімальної смертельної дози (ЛД50) проводили за методом І.П.Ашмаріна, А.А.Воробйова [3].

Встановлено, що фітоекстракти SK-15, SK-19, SK-20 в максимальній переносимій дозі 80мг/кг індукують у мишей інтерферон в титрах від 2560-5120 од/мл до 10240-20480 од/мл з піком активності через 24год. після введення (табл.). Висока індукція інтерферону (640-1280 - 5120 од/мл) спостерігалась також у відповідь на введення дози 60мг/кг. Значну концентрацію інтерферону (80 - 320 од/мл) реєстрували і при застосуванні вказаних ліофілізатів в дозі 40мг/кг.

В аналогічних умовах експерименту прототипний фітозасіб ТН в максимальній переносимій дозі 40мг/кг викликав інтерфероутворення на рівні 320-640 од/мл. В дозах 60мг/кг і вище даний препарат проявляв токсичний ефект, через що встановити індукцію інтерферону у цих випадках було неможливо. ЛД50/0,2мл для ТН при доочеревинному введенні лабораторним мишам складала 79мг/кг, в той час як для нових його аналогів - препаратів SK-15, SK-19, SK-20 цей показник становив відповідно 113мг/кг, 159мг/кг, 141мг/кг.

Наведені результати вказують на те, що одержані за новою технологією фітозасоби проявляють в 1,4- 2,0 рази меншу токсичність

Таблиця

Порівняльна оцінка інтерфероніндукуючої активності фітозасобів серії SK та ТН

Препарати	Доза в мг/кг	Титри інтерферону в од/мл в крові мишей через:		
		5 год.	24 год.	48 год.
SK-15	80	20	10240-20480	80
	60	10	5120	20
	40	<10	320	<10
SK-19	80	10-20	5120-10240	40
	60	10	1280-2560	10-20
	40	<10	160-320	<10
SK-20	80	<10	2560-5120	20
	60	<10	640-1280	10
	40	<10	80-160	<10
ТН	60	<10	н.д.	н.д.
	40	<10	320-640	20

Примітка: н.д. - не досліджували.

ніж їх попередній аналог ТН, внаслідок чого розширився діапазон їх активних доз, здатних посилити індукцію інтерферону в 6-24 рази.

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що представлений удосконалений спосіб одержання фітозасобу дозволяє отримати новий поліфенольний комплекс сполук, який володіє нижчою (в 1,4-2 рази) гострою токсичністю для білих мишей і значно вищою (в 6 - 24 рази) інтерфероніндукуючою активністю, ніж його прототипний препарат - фітозасіб ТН. Вказані властивості нових фітоекстрактів дозволяють пропонувати вищезгаданий спосіб для одержання ефективного індуктора інтерферону - потенційного противірусного, антибактеріального та протипухлинного препарату для профілактики і лікування багатьох інфекційних та онкологічних хвороб.

Джерела інформації:

1. Пат. 29617 А України, МПК А61К35/78, 39/00. Спосіб одержання протимікробного фітозасобу з інтерфероніндукуючою активністю / М.М.Козловський, І.А.Виноград, Л.В. Бензель. - Оуб. 15.11.2000. Бюл. № 6-П.
2. Чижов Н.П., Ершов Ф.И., Индулен М.К. Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций. - Рига, :Зинатне, 1988.-171 с.
3. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. - Л.: Медгиз, 1962. -180 с.