

Изобретение относится к биологии и медицине, в частности, к выделению из гидробионтов биологически активных веществ антибластомного, антимикробного и нейротропного действия и может быть использовано для получения лекарственных препаратов.

Известен способ получения биологически активного вещества, сказывающего действие, на нервно-мышечную проводимость, тонус мышечной ткани, сердечно-сосудистую систему, интенсивность внешнего дыхания; вызывающего фрагментацию цитоплазмы и кариоплазмы, уменьшающего содержание в ядрах ДНК и, вследствие этого, угнетающего рост лейкемии L-1210 ($ED_{50} = 0,58 \text{ мкг/мл}$), асцитной опухоли у 30% животных (50 мкг/г), саркомы 180, карциномы Эрлиха (Baslow M.H. Marine pharmacology. - Baltimore, 1969. - 273р.), который заключается в дезинтеграции клеток сине-зеленой водоросли *Aphanizomenon flos-aquae* путем лиофилизации, экстракции с последующим ресуспендированием в 0,1N растворе HCl, центрифугировании, хроматографической очистке и высушивании в вакууме.

Активное вещество представляет собой по агрегатному состоянию стеклоподобную гигроскопическую массу, плохо кристаллизующуюся.

Недостатком указанного способа является получение при выделении частично денатурированного продукта и, в конечном итоге, малоочищенного вещества с небольшим спектром биологического действия.

Задачей изобретения является разработка способа получения биологически активного вещества, проявляющего антибластомное, антимикробное и нейротропное действие, в котором, путем изменения технологических операций, достигалась бы возможность исключения денатурации при выделении конечного продукта и, соответственно, получение биологического активного вещества с широким спектром биологического действия.

Поставленная задача решается в способе получения биологически активного вещества; включающем дезинтеграцию клеток микроводоросли, экстракцию, центрифугирование с последующей хроматографической очисткой, элюирование и высушивание, в котором, согласно изобретению, в качестве микроводоросли используют сине-зеленые микроводоросли природного фитопланктона и искусственно культивируемые (в частности *Oscillatoria neglecta* Lemm., *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl), хроматографическую очистку проводят на анионите, элюирование проводят 70% - ным этиловым спиртом, а высушивание осуществляют криосублимацией.

Описанным способом получают кристаллическое вещество, растворимое в воде и органических растворителях (н-бутиловый, этиловый, метиловый спирты, ацетон). В растворенном виде оно выдерживает стерилизацию кипячением и автоклавированием. Продукт гидролиза представляет собой 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагидропирроло-(1,2-С)-пиримидин.

Указанное вещество является фармакологически активным и может

применяться для лечения экспериментального бластомогенеза различного происхождения (эпителиального, соединительно-тканного, лимфоидного), как антимикробное средство с широким спектром действия на различные тест-организмы, как нейротропное средство, особенно при возникновении очагов ирритации.

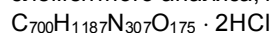
Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Микроводоросли сгущают планктонной сеткой или сепаратором до содержания сухого вещества 12 - 15%, клетки дезинтегрируют ультразвуком или в гомогенизаторе и проводят экстракцию дистиллированной водой в соотношении 1 : 2 по объему. Затем полученную суспензию осветляют центрифугированием и надосадочную жидкость очищают, пропуская ее через активированный анионит. Элюацию проводят 70% - ным раствором этилового спирта, после чего элюент упаривают в вакууме и высушивают криосублимацией.

Полученное химическое вещество имеет температуру плавления $1,2^{\circ}\text{C}$, растворимо в воде, низших спиртах и ацетоне, с минеральными кислотами образует соли, при кристаллизации из метанола или этанола получаются игольчатые кристаллы.

Физико-химические свойства вещества (компонентный состав, эмиссионные спектры) свидетельствуют с его гетерогенности и позволяют отнести его к полисахаридно-полипептидным соединениям.

В связи с гетерогенностью выделенного вещества интерпретация его спектров (ИК, УФ, ЯМР) представляет большие трудности и лишь дает возможность утверждать о наличии в составе выделенного вещества: бензольных циклов; эпоксидных групп; метиленовых групп; остатков аминокислот, тиоцианатных групп. Брутто-формула, полученная по результатам элементного анализа, представляет собой



Мол.м. 16800

Гидролиз выделенного вещества (кислотный, щелочной, протеолитическими ферментами) позволил определить, что в его состав входят:

Белок	56%
Пептиды	4,0%
Валин + метионин	$4,1 \pm 0,41 \text{ мкг}$
Тирозин	$6,3 \pm 0,36 \text{ мкг}$
Пролин	Следы
Аланин	$8,4 \pm 0,73$
Треонин	$14,9 \pm 1,27$
Глутамин	$15,1 \pm 0,92 \text{ мкг}$
Глицин	$9,1 \pm 0,71 \text{ мкг}$
Серин	$5,6 \pm 0,64 \text{ мкг}$
Аспарагин	$5,4 \pm 0,17 \text{ мкг}$
Аргинин	$5,1 \pm 0,32 \text{ мкг}$
Гистидин	$2,4 \pm 0,71 \text{ мкг}$
Лизин	$2,8 \pm 0,23 \text{ мкг}$
Цистеин	$7,1 \pm 0,8 \text{ мкг}$
Дисульфидные связи	0,096 ммоль

Эмиссионные спектры дают возможность утверждать о содержании в выделенном веществе: бензольных циклов; эпокси- CH_2 ; метиленовых групп; радикальных остатков аминокислот; карбоновых соединений; ароматических групп.

Пример 2. В связи с трудоемкостью химической идентификации гетерогенных

органических соединений осуществлен поиск экспресс-методов биологического тестирования на первичных культурах фибропластов человека и животных, перевивных культурах фибробластов неинбредных лабораторных крыс, Ам-8, НЕР-2, HEIA, первичной культуре костного мозга щенка.

Установлено, что культуры клеток злокачественных новообразований человека НЕР-2 и HEIA наиболее чувствительны к выделенному веществу. Для стандартизации выделенного вещества мы предлагаем ED_{50} , вызывающую 50% - ную дегенерацию клеток HEIA через 24 часа от начала воздействия и апластические явления в культуре клеток костного мозга через 48 часов.

Пример 3. Противоопухолевое действие выделенного вещества изучено на 19 видах перевивных опухолей различных гистологических типов (эпителиальных, соединительно-тканых, лимфоидных) и 2 - х видах опухолей, индуцированных метилхолантеном и диметилбензантраценом. Препарат вводили в дозе 0,001мг/кг под кожу, начиная с 5 - го дня после инокуляции клеток опухолей. Исключение составляют мышинные лейкемии, при которых введение препарата начинали со 2 - го дня после инокуляции опухолевых клеток, курс введения 15 дней. Результаты исследований приведены в табл.1.

В результате установлено сильное цитостатическое действие выделенного вещества, проявляющееся в защите 88 - 100% животных с инокулированными новообразованиями от гибели, полном рассасывании малигнизированных клеток, замены их фибробластами, коллагеном, гистоцитами.

Пример 4. Спектр антимикробного действия производных 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагидропирроло-(1,2-С)-пиримидина приведен в табл.2.

Из приведенных данных видно, что бактерицидные концентрации выделенного вещества в отношении тест-микроорганизмов колеблется между 10^{-3} и $10^{-6}\%$, а бактериостатические - 10^{-4} - $10^{-7}\%$.

Широкий спектр действия вещества *in vitro* послужили основанием для испытания его *in vivo* на остроселитической модели мышей, которую получали путем внутрибрюшинного введения 2млрд. взвеси золотистого стафилококка. Установлено, что введение препарата в количестве 0,01мг/мг под кожу хвоста на протяжении 7 дней приводит к полному бактериологическому выздоровлению животных.

Пример 5. Нейротропное действие производных 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагидропирроло-(1,2-С)-пиримидина установлено на нервномышечных препаратах лягушки, изолированной диафрагме крысы, изолированном сердце лягушки, где их действие проявляется уже в концентрации 1 : 1000.

Введение субтоксических до 0,015мг/кг в вену вызывает десинхронизацию ритма ЭЭГ, появление медленных волн, брадикардию, диспепсию с последующей остановкой сердца.

Очевидно благодаря наличию 2 - х атомов третичного азота препарат хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер, блокируя потенциал действия нервных и мышечных клеток.

Это подтверждается при изучении влияния вещества на двигательные рефлексы (рефлексы

растяжения) у животных с мышечной ригидностью, полученной децеребрацией, децереблляцией и временной ишемией спинного мозга.

Учитывая, что миостатическая гиперрефлексия у децереблированных животных или с временной ишемией каудальных отделов спинного мозга возникает вследствие активации мотонейронов, а у децеребрированных - путем включения гамма-системы ретикулярной формации, установлено, что вещество в дозе 0,01мг/кг при внутривенном введении влияет прямым или рефлекторным путем на надсегментарные структуры. Но введение аналептиков рефлекторного действия (цититон, субэхолин) предварительно не изменяет рефлексов растяжения. Это дало возможность уточнить точку приложения полученного вещества при излучении проприорецепции, а именно - образования ретикулярной формации.

В специальных исследованиях на многовариантном станке установлено отсутствие симптомов укачивания у животных при введении выделенного вещества за 30мин до начала эксперимента. Эффект продолжался в течение 3 - 5 дней.

Таблица 1

Спектр антибластомного действия выделенного
тил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагидропи

Название штаммов опухолей	Индекс	Чудесная палочка	10 ⁻⁴
		Синегнойная палочка	10 ⁻⁵
		Протей вульгарный	10 ⁻³
		Палочка Фридендера	10 ⁻⁴
		Дифтерид	10 ⁻⁵
		Bac. Subtilis	10 ⁻⁴
		Bac. mesentericus	10 ⁻⁴
		Bac. megaterium	10 ⁻⁴
		Bac. anthracoides	10 ⁻⁴
		Bac. mycoides	10 ⁻⁴
		Грибки рода Candida	10 ⁻⁶
Карцинома Герена	475,73	99,79	
Карцинома РА	525,39	99,81	
Карцино-саркома Уокера	1417,9	99,93	
Саркома-45	623,48	99,84	
Саркома МТХ	311,92	99,68	
Саркома М-1	8,79	88,63	
Саркома СПб	57,68	98,27	
Саркома Йенсена	879,014	99,89	
Рабдомиосаркома	93,39	98,93	
Гепатома РСМ	36,83	97,29	
Эритромиелоз Швеца			
Саркома Крокера			
Лимфома ЛИО-1			
Саркома 37			
Карцинома Эрлиха			
Меланома Гардинга-Пасси			
Лейкоз Л-IV			
Лейкоз NK/IV			
Карцинома Брауна-Пирс			
		Животные живы	
		Асцитна нет	
		Животные живы, метастазов нет	

Таблица 2

Спектр антимикробного действия производных 8-метил-2-оксо-2,4,5,6-тетрагидропирроло-
(1,2-С)-пиримидина

Название штаммов микроорганизмов	Бактерицидные концентрации, %	Бактериостатические концентрации, %
Стафилококк лимонно-желтый	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Стафилококк белый	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Стафилококк золотистый № 209	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Стрептококк гемолитический	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Стрептококк негемолитический	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Энтерококк	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Тифозная палочка	10	10 ⁻⁶
Шигелла Флекснера	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Шигелла Шига	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Сальмонелла А	10	10
Сальмонелла Б	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Сальмонелла Бреслау	10	10
Сальмонелла Гертнера	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Сальмонелла Моргана	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Сальмонелла Суипестифер	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
Сальмонелла Пилорум	10	10 ⁻⁶
Эшерихин	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷
Вибрион Мечникова	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Вибрион рожи свинной	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵