



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **17614** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61K 36/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНОЇ СУБСТАНЦІЇ З ЧИСТОТІЛУ

1

(21) u200600948

(22) 02.02.2006

(24) 16.10.2006

(46) 16.10.2006, Бюл. №10, 2006р.

(72) Россіхін Василь В'ячеславович, Богдан Микола Андрійович, Количев Михайло Олександрович, Реуцький Микола Іванович

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

2

(57) Спосіб виготовлення біологічно-активної субстанції з чистотілу шляхом відварювання у воді висушеної трави, відцідження відвару, який **відрізняється** тим, що чистотіл відварюють у воді в співвідношенні 1:10 протягом 1 години, відціджений відвар піддають вакуумконденсаційному сушінню при 60°C до сухого залишку 20%-30% вологості.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до фармакологічної практики.

Відомим є спосіб виготовлення настоїв, який здійснюють шляхом термічної обробки водних суспензій вихідної сировини на водяній бані протягом 15 хвилин і наступним після охолодження фільтруванні крізь декілька шарів марлі [Соколов С.Я. Лекарственные растения.-М.: VITA, 1993.-С.185].

Недоліком способу є сильне забруднення приготуваного настою мікроорганізмами і порівняльна слабка короточасова дія на чутливі до препарату чистотілу мікроорганізми. Настій володіє сильною токсичною дією.

Найбільш близьким та обраним за найближчий аналог є спосіб приготування настою чистотілу, при якому рослинну сировину обробляють на водяній бані, яка кипить, протягом 45 хвилин, після охолодження фільтрують і фільтрат обробляють ультразвуком під час занурення в нього працюючого ультразвукового вібратора [Росія, Пат №2085202].

Недоліки способу пов'язані з токсичністю настою чистотілу.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу виготовлення біологічно-активної субстанції з чистотілу, в якому за рахунок зміни характеру обробки відвару досягається зниження токсичності отриманої речовини, яка володіє антипроліферативною та антиканцероматозною дією.

Поставлена задача вирішується в способі виготовлення біологічно-активної субстанції з чистотілу шляхом відварювання у воді висушеної трави,

відцідження відвару, згідно з корисною моделлю, чистотіл відварюють у воді в співвідношенні 1:10 протягом 1 години, відціджений відвар піддають вакуум-конденсаційному сушінню при 60°C до сухого залишку 20%-30% вологості.

За рахунок використання вакуум-конденсаційного сушіння знижується токсичність відвару. Потріба 20%-30% вологості залишку пояснюється тим, що речовина з вологістю більш 30% являє собою текучу суміш, а при вологості менше 20% з'являються неоднорідні шари суміші.

Субстанцію виготовляють наступним чином.

Висушену сировину чистотілу подрібнюють, відварюють у воді в співвідношенні 1:10 протягом 1 години і відціджують відвар. Останній з метою зниження токсичності піддається вакуум-конденсаційному сушінню при 60°C до сухого залишку.

Нами було вивчено протипухлинну дію екстракту чистотілу, виробленого за нашим способом.

Вивчення протипухлинної дії екстракту чистотілу було проведено на моделі перевинної МХ-рабдоміосаркоми мишей лінії BALB/c in vivo (1) і in vitro в системі дифузійних камер (2).

1. Вивчення протипухлинної дії екстракту чистотілу in vivo.

Моделлю пухлинного зростання служила перевинна МХ-рабдоміосаркома (саркома, що індукується метилхолантеном) мишей лінії BALB/c (середня тривалість життя мишей в умовах цієї моделі 28-32 доби). 1млн. пухлинних кліток в 0,3мл культурального середовища (його склад: середовище RPMI-1640, фірма "Sigma" з глютаміном, гентаміцином і 20% ембріо-

(19) **UA** (11) **17614** (13) **U**

нальної телячої сироватки, фірма "Sigma") вводили внутрішньом'язово мишам у задню лапку. На 7 добу після перевивання пухлини (появи пухлинного вузла) тварин розподілили на 3 групи, в кожній з яких було по 20 мишей (дві дослідні і одна контрольна). Мишам дослідних груп екстракт чистотілу вводили внутрішньочеревне в різних дозах; доцільність внутрішньочеревного введення обґрунтовувалася як нашими попередніми дослідженнями з використанням імуномодуляторів, так і даними літератури про те, що локальне введення препарату приводить до вираженого протипухлинного ефекту [Бережная Н.М., Горецкий Б.А. Интерлейкин-2 и злокачественные новообразования. Киев: Наук. думка, 1992, 174с.]. Оскільки в умовах справжньої моделі введення пухлинних кліток здійснювалося внутрішньом'язово в лапку стегна, то внутрішньочеревне введення уявлялося найдоцільнішим для даної моделі. Досліджувану дозу екстракту чистотілу розраховували, ґрунтуючись на даних літератури [Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. За ред. акад. АН УРСР А.М. Гродзинського, Київ, 1989], з розрахунку 1г на 1кг ваги. Оскільки середня вага мишей 20г, то нами були вибрані дві дози - 0,02г на 1 мишу - доза, що повністю відповідає вказаному розрахунку (1-а дослідна група мишей), і 0,03г - доза, що в півтора рази перевищує попередню (2-а дослідна група мишей). Відповідну кількість (дозу) екстракту чистотілу розводили фізіологічним розчином і стерилізували. Екстракт чистотілу мишам вводили в об'ємі 0,2мл, кожний з яких містив або 0,02г, або 0,03г впродовж подальших 14 днів, починаючи з 7 дня після перевивання (появи пухлини). Упродовж усього терміну спостереження щодня вимірювали об'єм пухлини (довжина і ширина пухлинного вузла) і вираховували вагу пухлини за формулою [R.C. McKenzie, A. Oran, C. A. Dinarello, D. N. Sauder. IL-1 receptor antagonist inhibits subcutaneous melanoma B 16 growth in vivo // Anticancer Research 1996. -V.I 6. -№1. -P.437]:

$$\text{Вага (г)} = \text{довжина} \times (\text{ширина})^{2/2}.$$

Під час експерименту вивчали особливості динаміки зростання і максимальну тривалість життя мишей у кожній досліджуваній групі і в контрольній.

Результати досліджень.

На 7 добу після перевивання пухлинних кліток вага пухлини мишей контрольної і дослідних груп була однаковою і складала 0,19±0,1гр.

Починаючи з 11 доби після перевивання пухлинних кліток (5-й день уведення екстракту чистотілу), реєструються відмінності в зростанні пухлини мишей групи №1 у порівнянні з контрольною. Так, у групі № 1 вага пухлини була приблизно в 1,5 рази менша ніж у контрольній і складала 0,23±0,01м. Вага пухлини мишей у контрольній і в дослідній групі №2 (0,03г екстракту чистотілу) була однаковою і складала 0,32±0,01г.

На 14-ту добу після перевивання пухлини (8-й день уведення екстракту чистотілу) спостерігається гальмування в зростанні пухлини мишей груп №1 і №2, яке виявляється в зменшенні розміру пухлини в 1,5 рази порівняно з контрольною (вага пухлини в останній була 0,78±0,1г), і однаковим -

0,43±0,3г в групах №1 і №2). З 18-ї по 21-у добу (закінчення введення екстракту чистотілу) зберігаються ті ж відмінності в динаміці зростання пухлин мишей у контрольній і дослідних групах.

На 23-тю добу спостерігається різке збільшення ваги пухлини мишей у групі №2, проте, не зважаючи на це, продовжують зберігатися відмінності в динаміці зростання пухлини мишей контрольної і дослідної групи №1 (вага пухлини мишей групи №1 приблизно в 2 рази менша, ніж у контрольних).

На 25-ту добу спостерігається різке збільшення пухлини мишей групи №1, хоч і зберігаються відмінності в 1,5 рази у вазі пухлини в порівнянні з контрольною групою (2,8±0,2г і 4,0±0,18г відповідно). У групі мишей №2 пухлина досягає таких же розмірів, як і в контрольній (3,9±0,1г).

На 28-му добу після введення пухлинних кліток мишам спостерігається гальмування швидкості росту пухлини мишей дослідних груп порівнянне з контрольною: у групі мишей №1 вага пухлини склала 3,66±0,3г, а в групі №2 - 4,64±0,2г; у контрольній - 7,73±0,3г.

На 32-гу добу після перевивання спостерігається різке збільшення ваги пухлини в контрольній групі і незначне збільшення ваги пухлини в групі №2. Таким чином, вага пухлини мишей групи №1 була меншою в 2 рази порівняно з вагою пухлини мишей групи №2 і в 4 рази - порівняно з контрольною (3,58±0,2г, 6,67±0,2г, 14,2±0,25г відповідно).

На 34-ту доби зберігаються ті ж закономірності динаміки зростання пухлини мишей контрольних і дослідних груп; максимальна тривалість життя мишей контрольної групи склала 35 діб.

Протягом наступного тижня в динаміці зростання пухлини мишей дослідних груп істотних змін не спостерігалось, оскільки зростання пухлини було незначним. На 42-гу добу вага пухлини мишей групи №1 істотно не змінюється порівняно з попередніми термінами дослідження і складає 3,65±0,25м. Вага пухлини мишей групи №2 - 8,18±1,1г.

Максимальна тривалість життя тварин групи №2 складала 45 діб, що на 10 діб перевищує тривалість життя мишей контрольної групи; це на 28% більше порівняно з контролем. На момент загибелі тварин групи №2 істотних відмінностей у вазі пухлини порівняно з контрольною групою не спостерігалось.

Максимальна тривалість життя тварин групи №1 становила 55 діб, що на 20 діб перевищує тривалість життя мишей контрольної групи, це на 57,1% порівняно з контрольною групою. Необхідно підкреслити, що на відміну від ваги мишей групи №2 вага пухлини мишей групи №1 на момент загибелі тварин відрізнялася від такого в контрольних мишей (пухлини були в 1,5 рази менше).

Таким чином, дослідження протипухлинної активності екстракту чистотілу в системі *in vivo* (модель перевивальної МХ-рабдоміосаркоми) показало, що введення екстракту чистотілу в дозі 0,02г на мишу (терапевтична доза) має перевагу перед дозою 0,03г на мишу, оскільки надає вираженого протипухлинного ефекту, який виявляється в зміні динаміки зростання (вага пухлини) і реальному збільшенні тривалості життя мишей.

2. Вивчення протипухлинного ефекту екстракту чистотілу *in vitro*.

Вивчення протипухлинного ефекту екстракту чистотілу *in vitro* проводили в системі дифузійних камер із використанням пухлинних експлантів та ізолюваних пухлинних кліток при додаванні тих же доз екстракту чистотілу, що і в досліді *in vivo* (0,02г і 0,03г).

Отримання пухлинних біоптатів: з видаленої пухлини стерильно вирізували фрагменти тканини, позбавлені судин і вогнищ некрозу, подрібнювали їх ножицями до розміру не більше 0,2-0,3мм.

Отримання ізолюваних пухлинних кліток: з видаленої пухлини стерильно вирізували фрагменти тканини, позбавлені судин і вогнищ некрозу, подрібнювали їх ножицями до розміру не більше 0,2-0,3мм, і протягом 30-40хв. при 37°C культивували в 0,2% розчині трипсину в середовищі RPMI-1640 (Sigma, USA), при постійному перемішуванні на магнітомішалці. Виділені клітки відмивали триразовим центрифугуванням при 425g в культуральному середовищі і підраховували в камері Горяєва при суправітальному забарвленні трипановим синім.

Вивчення протипухлинної дії екстракту чистотілу: протипухлинну дію визначали за здатністю екстракту чистотілу пригнічувати пухлинне зростання й утворення сфероїдів пухлинними клітками. Сфероїди - упорядковані колонієподібні структури з ознаками спіральної орієнтації; їх можна розглядати як мікро модель пухлинного вузла, вони також відображають основні характеристики даних пухлин. Протипухлинну дію вивчали в дифузійних камерах: 2-3 біоптати або 1млн. пухлинних кліток поміщали в дифузійні камери, що складаються з 2 тефлонових кілець, на які наклеювалися за допомогою клею ВФ-6 мілліпорові фільтри діаметром 0,23мк ("Сінпор-8", Чехія). Дифузійні камери поміщали в 24-лункові планшети, в дослідні зразки додавали екстракт чистотілу в досліджуваних дозах, і культивували протягом 5 діб у середовищі RPMI 1640 (Sigma, USA) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, USA) при температурі 37°C і насиченні повітряного середовища 5% CO². Препарати фіксували 1 годину в спирт-формолі, зафарбовували 20хв. гематоксиліном Караччі, проводили через батарею спиртів висхідної концентрації (500, 700, 960, 1000), прояснювали в ксилолі. Препарати готували в краплі канадського бальзаму на предметному склі, вивчали за допомогою мікроскопа МБІ-6, об.20, 40, ок.10.

Для диференційованого обліку особливостей зростання експлантів пухлин та ізолюваних пухлинних кліток була розроблена 9-бальна система оцінки, яка давала можливість детально охарактеризувати зростання пухлинних кліток у дифузійних камерах і подати дані в графічному зображенні:

1. Відсутність зростання.
2. Незначне зростання.
3. Початкові етапи пухлинного зростання; утворення моношару.
4. Поява моношару низької щільності.
5. Утворення моношару середньої щільності.

6. Початкові етапи сфероїдоформування: конгломерати кліток.

7. Сфероїдоформування (1-2 сфероїди в полі зору).

8. Сфероїдоформування (3-5 сфероїдів у полі зору).

9. Сфероїдоформування (10-12 сфероїдів у полі зору).

Система оцінки також включала 2 показники: А - деструкція пухлини; У - моношар низької щільності.

Мікроскопічне вивчення фільтрів дифузійних камер, на які були поміщені біоптати пухлин мишей та ізолювані пухлинні клітки МХ-рабдоміосаркоми без додавання екстракту чистотілу (контроль) показало, що характерною особливістю зростання *in vitro*, в даному випадку є утворення моношару низької щільності і міграція пухлинних кліток.

Додавання в середовище культивування екстракту чистотілу в дозі 0,02г приводить до значного гальмування пухлинного зростання, що виявляється у відсутності міграції кліток, в деяких випадках спостерігається деструкція пухлинних кліток.

Додавання в середовище культивування екстракту чистотілу в дозі 0,03г також приводить до гальмування пухлинного зростання і міграції пухлинних кліток, проте деструкції в цьому випадку не спостерігалось.

Порівняльна оцінка протипухлинного ефекту екстракту чистотілу в дозою 0,02г і 0,03г показала, що і в системі *in vitro* використання дози 0,02г також має переваги порівняно з дозою 0,03г у вияві протипухлинної дії.

Таким чином, подані дані по вивченню впливу екстракту чистотілу *in vitro* в дифузійних камерах свідчать про те, що екстракт чистотілу володіє значною протипухлинною дією, яка виявляється в деструкції пухлинних кліток за відсутності будь-якої здатності пухлинних кліток до міграції.

У подальшому були проведені експериментальні дослідження, які характеризують безпечність потенційного лікарського засобу екстракту чистотілу, виробленого за нашим способом.

Дослідження мали за мету вивчення небезпечності для експериментальних тварин досліджуваної речовини в умовах короткотривалої дії, тобто визначення гострої токсичності.

Відповідно до мети експериментів були поставлені завдання:

- визначити параметри гострої токсичності при трьох шляхах введення речовини в організм лабораторних тварин;
- отримати дані щодо клінічних проявів інтоксикації;
- визначити видову та статеву чутливість експериментальних тварин щодо дії досліджуваної речовини.

Експерименти виконані відповідно до методичних рекомендацій ["Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів"].

Досліди, проведені на білих нелінійних щурах, білих нелінійних мишах та морських свинках. Тварини знаходилися на стандартному раціоні виварю, який відповідає всім вимогам харчування для

всіх використаних видів. Кожна група складалася з 12 тварин обох статей. При розрахунку доз досліджуваний екстракт чистотілу приймали за 100% речовину. Концентрації розчинів підбирали з урахуванням максимальної кількості рідини, яку допускається вводити за один прийом при різних шляхах надходження в організм [Елизарова О.Н. Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении. - М.: Медицина. 1971. - С.29].

Гостру токсичність для білих щурів вивчали при трьох шляхах введення: внутрішньошлунковому, внутрішньочеревинному, який забезпечує системну дію досліджуваної речовини, та ректальному, який передбачається для клінічного використання.

Першій дослідній групі білих щурів (по 6 тварин кожної статі) масою 210-230г (самці) та 200-210г (самиці) за допомогою металевого зонду одноразово вводили в шлунок 50%-й водний розчин досліджуваної речовини дозою 5000мг/кг, яка є максимальною дозою четвертого класу токсичності (малотоксичні речовини) для внутрішньошлункового введення [Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів: Методичні рекомендації. - Київ. 2000. - 43с.; Заугольников С.Д., Лойт А.О., Иваницкий А.М. Токсиколого-гигиеническая классификация вредных веществ Принципы и методы установления предельно допустимых концентрации вредных веществ в воздухе производственных помещений. - М.: Медицина, 1970. - С.76-83]. Контрольній групі тварин вводили дистильовану воду.

Другій дослідній групі білих щурів (по 6 тварин кожної статі) масою 210-220г (самці) та 200-215г (самиці) вводили внутрішньочеревне 10% розчин екстракту чистотілу в максимальній дозі четвертого класу токсичності для внутрішньочеревного шляху введення [Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів: Методичні рекомендації. - Київ. 2000. - 43с.; Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парантеральных способах введения // Токсикология новых промышленных химических веществ. - М.: Медицина, 1973. - Вып. 13. - С.47-51] - 1000мг/кг. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин.

Третій дослідній групі білих щурів (по 6 тварин кожної статі) масою 220-230г (самці) та 200-220г (самиці) проведено ректальне введення 40% водного розчину досліджуваної речовини в дозі 1000мг/кг. Контрольній групі тварин вводили дистильовану воду.

Видова чутливість до досліджуваної речовини вивчали на білих мишах і на морських свинках. Групі білих мишей (по 6 тварин кожної статі) масою 24-28г (самці) та 24-26г (самиці) та групі морських свинок (по 6 тварин кожної статі) масою 270-290г (самці) та 250-270г (самиці) вводили внутрішньошлунково екстракт чистотілу максимальною дозою четвертого класу токсичності - 5000мг/кг (20% водний розчин білим мишам і 50% водний розчин - морським свинкам). Контрольним групам тварин вводили дистильовану воду.

Тривалість спостережень за станом тварин складала 14 днів. Масу тіла білих щурів визначали

через 3, 7 та 14 діб після введення досліджуваної речовини, ректальну температуру один раз на день. Результати вимірів опрацьовували методами варіаційної статистики за допомогою ЕОМ [Программированная обработка результатов токсиколого-гигиенических экспериментов на микро-ЗВМ типа "Электроника БЗ-34": Методические рекомендации.-Київ, 1987. -22с.].

Внутрішньошлункове введення білим щурам 50% водного розчину екстракту чистотілу в дозою 5000мг/кг маси тіла до загибелі тварин не приводило. Клінічні прояви інтоксикації виражались у деякому пригніченні рухової активності та загальмованості тварин. Слід відмітити, що подібні симптоми спостерігалися при введенні контрольним білим щурам розчинника екстракту чистотілу - дистильованої води в тому ж об'ємі, що і досліджуваної речовини. Через 30-40 хвилин піддослідні та контрольні тварини не відрізнялися від інтактних. Систематична реєстрація показників стану кожної тварини протягом 14 діб не виявила клінічних проявів дії досліджуваної речовини, а також змін маси і температури тіла піддослідних тварин у порівнянні з контрольними.

При внутрішньочеревному введенні білим щурам 10% розчину екстракту чистотілу в дозі 1000мг/кг маси тіла летальний кінець не спостерігався. Клініка інтоксикації проявлялася через 5-10 хвилин загальмованістю, зменшенням спонтанної рухової активності, ускладненням дихання, особливо вдиху повітря, уповільненням частоти дихання до 48-70 ударів за хвилину, постійним скороченням м'язів, які супроводжувалися стійким витягуванням задніх кінцівок. Тривалість порушень дихання спостерігалася на протязі 25-40 хвилин, тонічних судом - 4-4,5 години. Спостереження за тваринами протягом 14 діб не виявило клінічних проявів інтоксикації, змін маси та температури тіла.

Ректальне введення білим щурам 40% водного розчину досліджуваної речовини дозою 1000мг/кг маси тіла до загибелі тварин не приводило. Клінічних ознак отруєння не помічено. Загальний стан і поведінка, маса та температура тіла дослідних тварин протягом 14 діб не відрізнялися від контрольних.

При внутрішньошлунковому введенні 20% водного розчину екстракту чистотілу білим мишам в дозі 5000мг/кг маси тіла та 50% водного розчину досліджуваної речовини морським свинкам дозою 5000мг/кг маси тіла летальний кінець не спостерігався. Із клінічних симптомів виявлене короточасне пригнічення рухової активності, що також відмічалось і в контрольних білих мишей та морських свинок, яким внутрішньошлунково вводили розчинник - дистильовану воду в тих же об'ємах, що і досліджуваної речовини. Протягом всього строку спостереження (14 діб) клінічних ознак інтоксикації не відмічалось, а інтегральні показники стану піддослідних тварин не відрізнялися від контрольних.

У відповідності до мети та завдань роботи вивчена гостра токсичність потенційного лікарського засобу екстракту чистотілу на трьох видах лабораторних тварин (білих щурах, білих мишах та морських свинках) при трьох шляхах надходження в

організм (внутрішньошлунковому, внутрішньочеревному та ректальному).

Результати досліджень показали, що DL50 для білих щурів обох статей при внутрішньошлунковому шляху надходження складає більше 5000мг/кг. при внутрішньочеревному та ректальному шляхах надходження в організм - більше 1000мг/кг. Розрахована на основі даних про ОБ⁵⁰ при надходженні в організм пероральним шляхом, DL50 при внутрішньовенному введенні склала більше 500мг/кг [Экспресные методы определения токсичности и опасности химических веществ / Заугольников С.Д., Кочанов М.М., Лойт А.О., Ставчанский И.И. - Л.: Медицина, 1978. - С.84].

DL50 для білих мишей обох статей та для морських свинок обох статей при внутрішньошлунковому шляху надходження складає більше 5000мг/кг.

Клінічні прояви інтоксикації при внутрішньочеревному шляху надходження в організм білих щу-

рів (ускладнення дихання та тонічні судоми) свідчать про те, що вірогідними мішенями впливу досліджуваної речовини є дихальний центр, ЦНС та нервово-м'язова система.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що за класифікацією речовин за токсичністю [Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів: Методичні рекомендації. -Київ. 2000. - 43с.] екстракт чистотілу належить до малотоксичних речовин (IV клас токсичності) при одноразовому внутрішньошлунковому (для білих щурів, білих мишей та морських свинок) та внутрішньочеревному (для білих щурів) шляхах надходження в організм. Статева та видова чутливість до досліджуваної речовини не виражена.

Таким чином запропонований спосіб виготовлення біологічно-активної субстанції з чистотілу є нетоксичним і ефективним засобом протипухлинної терапії.