



УКРАЇНА

(19) UA (11) 10180 (13) C2

(51) 7 A61K35/23

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ РЕЧОВИНИ, ЩО МАЄ РЕГЕНЕРАТОРНУ ТА МОДУ-
ЛЮЮЧУ ДІЮ

(21) 94052069

(22) 30.05.1994

(24) 15.05.2001

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Кайдашев Ігор Петрович, Катрушов Олек-
сандр Васильович(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІ-
ДАЛЬНІСТЮ "ФАРМАПОЛ"

(56) Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Писарев О.А. // Доклады АН СССР. – 1977. – Т. 233, № 3. – С. 491.

(57) Спосіб одержання біологічно активної речови-
ни, що має регенераторну та модулюючу дію, який
включає зневоднення роздібненого тканинного
матеріалу в органічному розчиннику при темпера-
турі 4°C протягом 12 годин, висушування, кислотну

екстракцію в присутності 0,1% хлориду цинку при температурі 4°C, фільтрацію реакційної суміші, осадження із фільтрату органічним розчинником, обробку одержаного осаду сумішшю ацетону з ефіром та виділення кінцевого продукту, який **від-різняється** тим, що в ролі тканинного матеріалу використовують коркову речовину нирки, як органічний розчинник – суміш ацетону та етанолу у співвідношенні 1:1, екстракцію ведуть протягом 48 годин 0,1%-ною трифторооцтовою кислотою з додатковим введенням 0,1% хлориду магнію, а виділення продукту здійснюють фільтрацією розчиненого в дистильованій воді осаду після обробки ефіром на мембранах, що пропускають молекули з масою менше 10 кД.

Винахід стосується галузі медицини та може бу-
ти використаний у біотехнології добування біологічно
активної речовини (БАР) поліпептидної природи, яка
володіє органоспецифічною регенераторною та моду-
люючою дією для лікування ниркової патології.

В теперішній час гостро стоїть проблема лі-
кування ниркової патології (нефрити, нефрози).

Існуючі препарати для лікування подібної па-
тології не володіють властивістю регенерувати стр-
руктурні елементи нирки.

Найбільш близьким до способу, що опи-
сується, є спосіб одержання біологічно активної
речовини, яка володіє регенераторною та моду-
люючою дією, зокрема тималіну, що складається з
зневодження, роздіблення до розмірів 2x2x2мм
тимусу, попередньо очищеного від жиру, судин та
ін., в ацетоні, у співвідношенні 1:8, при +4°C на
протязі 12 годин, висушування обробленого тимусу,
його екстракцію 3% розчином оцтової кислоти
(рН 4,5) в присутності 0,1% хлориду цинку при
+4°C на протязі 72 годин, фільтрацію реакційної
суміші, осадження із фільтрату ацетоном, взятим в
співвідношенні 1:10 при +4°C на протязі 12 годин,
обробку одержаного осаду сумішшю ацетону з
ефіром, сушіння та ліофілізацію продукту.

Тималін, одержаний за відомим способом
знаходить використання при лікуванні хронічних
гломерулонефритів.

Але, даний препарат не володіє органоспе-
цифічністю при лікуванні патологій конкретних ор-
ганів, зокрема, нирок, а лише корегує неспеци-
фічні порушення в системах імунітету, гомеостазу
та неспецифічної резистентності організму.

В основу винаходу поставлено задачу удос-
коналення способу одержання біологічно активної
речовини, у якому за рахунок використання нового
тканинного матеріалу та умов проведення дій,
одержана речовина володіє органоспецифічною
регенераторною дією на спеціалізовані тканини
нирок, що забезпечує відновлення порушених стр-
uktur та функцій нирок.

Поставлена задача вирішується тим, що у
способі одержання біологічно активної речовини,
що вміщує зневоднення роздібненого тканинного
матеріалу в органічному розчиннику при +4°C на
протязі 12 годин, екстракцію, фільтрацію реакцій-
ної суміші, осадження із фільтрату органічним роз-
чинником, обробку одержаного осаду ефіром з
послідуючим виділенням препарату згідно винахо-
ду, в якості тканинного матеріалу використовують
коркову речовину нирки, в якості органічного роз-
чинника для зневоднення матеріалу та осадження
використовують суміш ацетону та етанолу у спів-
відношенні 1:1, екстракцію ведуть 0,1% трифто-
рооцтовою кислотою з введенням додатково 0,1%
хлориду магнію, а біологічно активну речовину ви-

діляють фільтрацією розчиненого в дистильованій воді осаду після обробки ефіром на мембранах, пропускаючих молекули з масою нижче 10 kD.

Спосіб здійснюється слідуочим чином. Коркова частина тканин нирки роздрібнюється до розмірів 2x2x2 мм, після чого зневоджується у суміші ацетон-етанол (1:1) на протязі 12 годин при +4°C. Зміна співвідношення ацетон-етанол, як в більший, так і в менший бік приводить до зменшення виходу продукту та зниженню його специфічності дії. Після чого проводиться екстракція 0,1% розчином трифтороцтової кислоти з 0,1% хлориду цинку і 0,1% хлориду магнію (pH 2,5). Таким чином, більша реакція реакційної суміші та присутність катіонів магнію забезпечують більшу екстракційну силу суміші. Екстракція триває 48 годин при +4°C при постійному перемішуванні. В цей час 0,1% розчин трифтороцтової кислоти не тільки екстрагує поліпептидні речовини, але й осаджує великі білки, що засорюють екстракт. Після фільтрування реакційної суміші її обробляють сумішшю тією ж

ацетон-етанол при співвідношенні (1:10) при +4°C 12 годин. Осад збирають та відмивають ефіром для видалення залишків трифтороцтової кислоти. Після цього осад розчиняють в дистильованій воді при pH 5,0 та проводять фільтрацію на патронах "Centricon-10", що забезпечує отримання речовин з вагою < 10 kD. Після цього екстракт ниркової тканини ліофілізують з одержанням чистого продукту.

Вивчення фізико-хімічних властивостей речовини продемонструвало наявність позитивної біуретової реакції, що свідчить про її пептидну природу в отриманому екстракті.

Нами методом вискоєфективної рідинної хроматографії з оберненими фазами було порівняно хроматографічний спектр тімаліну та речовини, отриманої за заявляємим способом.

Дослідження виконано на хроматографі SMART tm SYSTEM "Pharmacia" Sweden. Режим дослідження: колонка mRPS C2/C8 – SC 2.1/10; градієнтна подача елюенту:

час, хв	6	26	39,5	54,5	61,5	68,5	78,5	79,5
%, "B"	0	10	20	35	45	50	70	75

розчин "А" – 0,1 трифтороцтова кислота;

розчин "В" – 0,085% трифтороцтова кислота в 80% ацетонітрилі.

Детектування проводили при 214 нм.

На фіг. 1 надано хроматографічний спектр поліпептидів тімусу в препараті "тімалін". Звертає увагу наявність хроматографічних фракцій із значною питомою вагою з часом утримання 15 – 27 – 52 – 56 і 57 хвилин.

На фіг. 2 надано хроматографічний спектр поліпептидної речовини, отриманої запропонованим способом. На відміну від "тімаліну" речовина містить фракції з часом утримання 11 – 19 – 23 – 67 хвилин.

Крім того, було вивчено вміст амінокислот в отриманій речовині.

Таблиця 1

Порівняння вмісту окремих амінокислот у препараті "тімалін" та заявляємій БАР

Назва амінокислот	Амінокислотний склад поліпептидів тімусу, %	Амінокислотний склад поліпептидів нирок, %
Цистеїн	3,4	–
Аспарагін	5,8	2,19
Треонін	5,7	2,43
Серін	5,7	2,05
Глутамін	6,2	3,76
Пролін	10,1	8,16
Гліцин	8,6	8,31
Аланін	10,7	4,97
Валін	8,8	7,62
Метіонін	–	1,17
Ізолейцин	3,9	5,92
Лейцин	6,7	3,29
Тирозін	2,4	3,89
Фенілаланін	3,2	2,92
Гістидін	2,9	3,19
Лізін	7,0	15,33
Аргинін	8,5	8,45
Триптофан	сліди	0,61
Лізін/Аргинін	0,8	1,82

Таблиця 1 демонструє суттєві відміни амінокислотного складу тималіну і отриманої речовини.

Для вивчення її органоспецифічної дії було проведено експерименти з органічною нирковою патологією.

В дослідях не виявлено токсичності препарату.

Експеримент був проведений на 40 білих щурах лінії "Wistar" обох статей, середньої маси 200 г. Експериментальний нефрит Хейманна викликали по методиці [Kment A. et al., 1976]. Про його виникнення судили на основі морфологічних змін в тканинах нирки (гістологічні зрізи фарбували гематоксилин-еозином згідно загальноприйнятим методам). Гістологічні спостереження проводили при об'єктиві 10-кратного збільшення та подальшому мікрофотографуванні.

Смертності тварин не відмічалось.

Для вивчення впливу БАР на стан деяких захисних систем були проведені досліді *in vitro* з кров'ю інтактних морських свинок. У тварин відбирали до 20 мл крові, яку стабілізували 3,8% розчином цитрату натрію. Кров, не змішуючи, поділяли на 6 проб по 10 мл в кожній. Подалі кожна проба була знов поділена на дві частини по 5 мл, з яких одна мала бути контрольною, а друга – дослідною. В контрольні проби (К) вносили по 0,1 мл 0,15 М розчину NaCl, а в дослідні (Д) – по 0,1 мл такого ж розчину, який мав 0,1 мг сухого препарату (з розрахунку 0,02 мг препарату на 1 мл крові). Кров з вказаними домішками інкубували на протязі 30 хвилин при 37°C. В плазмі крові визначали час ре-

кальцифікації, каоліновий, тромбіновий, протромбіновий час, активований частковий тромбіновий час (АЧТЧ), концентрацію ТБК-реагуючих продуктів в еритроцитах до та після інкубації в прооксидантному буферному розчині (при цьому утворюється малонової диальдегід – МДА – показник рівня пероксидації), спонтанний гемоліз еритроцитів (ПРЕ), активність супероксиддисмутази (СОД), згідно загально прийнятим методам. Статистична обробка результатів проводилась по програмі для обчислення критерія Ст'юдента для вибірок з парнозв'язаними варіантами.

Оцінка ефективності впливу БАР базується на дослідних результатах, які подані в таблицях 1–2 та на мікрофото.

Гістологічні дослідження показали, що у щурів другої групи розвиваються ексудативно-проліферативні процеси з вираженими дистрофічними і некротичними змінами канальців нирок, що характеризують підгостре протікання гломерулонефриту (мікрофото 1). У тварин третьої групи під впливом введення поліпептидного препарату гістологічно відмічалось значне покращення (мікрофото 2): більша частина ділянок тканини без видимих змін, збережений малюнок клубочків та ізвитих канальців, але не дивлячись на це зустрічаються ділянки з дистрофією проксимальних канальців.

Після моделювання аутоімунного нефриту Хеймана у щурів спостерігали явні порушення процесів перекисного окислення гемокоагуляції, мікроциркуляторного гемостазу (таблиця 2).

Таблиця 2

Показники зсідання крові і перекисного окислення ліпідів у інтактних щурів та у тварин з нефритом Хеймана з введенням фізіологічного розчину (контроль) та БАР, що заявляється

Показник	Групи тварин		
	1-а інтактні	2-а контрольні	3-я дослідні
Зсідання крові			
Час рекальцифікації плазми, (с)	86±2	125,4±2,4*	97,4±2,2*
Протромбіновий час, (с)	21,5±0,9	22,48±1,10	20,2±1,1
Тромбіновий час, (с)	22,75±0,78	35,8±1,2**	27,7±0,8*
Активований частковий тромбопластиновий час, (с)	23,75±2,00	25,0±2,0	28,0±2,0
Активність антитромбіну, (с)	23,5±0,5	14,8±0,6*	25,2±0,8*
Час фібринолізу, (хв)	237,25±10,30	75,6±3,1*	206,6±8,3*
Тромбоцитарний гемостаз			
Швидкість агрегації тромбоцитів, (град)	62,0±0,62	67,13±0,66***	60,20±0,34***
Ступінь агрегації (Е, мм)	29,87±0,34	30,40±0,34	28,67±0,34**
Час агрегації, (хв)	12,07±0,24	6,53±0,19***	10,27±0,20***
Антиоксидантний статус			
Вміст МДА (кров), (мкмоль/л)	2,39±0,01	2,52±0,02*	2,43±0,07*
Приріст МДА за 1,5 години інкубації, (%)	135	109	130
Вміст церулоплазмина сировотки, (мг/л)	371,5±16,1	518,9±25,3*	584,0±30,0*

Показник	Групи тварин		
	1-а інтактні	2-а контрольні	3-я дослідні
Активність ферментів крові (ОД):			
каталаза	1,18 \pm 0,06	2,44 \pm 0,12**	47 \pm 0,16**
СОД	0,68 \pm 0,02	2,46 \pm 0,09*	1,84 \pm 0,03*
Вміст МДА в тканинах нирки, (мкмоль/кг)	2,57 \pm 0,11	3,57 \pm 0,17**	2,98 \pm 0,15*
Приріст за 1,5 години інкубації, (%)	157	139	149
Активність СОД (нирки), (ОД)	2,01 \pm 0,20	3,35 \pm 0,19*	2,79 \pm 0,15*

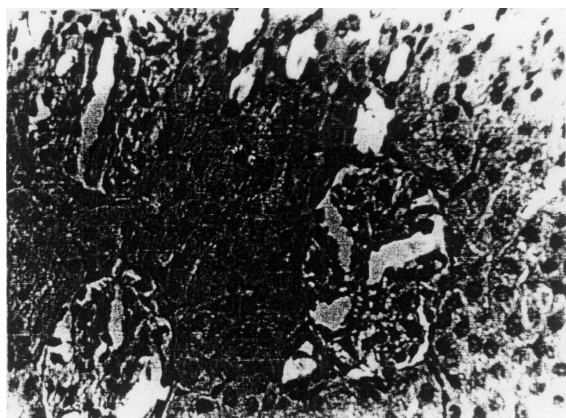
Знайдено збільшення часу рекальцифікації плазми, тромбінового часу, значне зниження активності антитромбіну III, поява в усіх випадках позитивних результатів етанолового і β -нафтолового тестів. Розвиток патологічних процесів в паренхімі нирки як правило приводять до змін фібринолітичних властивостей крові. Як видно з таблиці нефрит Хеймана викликав прискорення еуглобулінового лізису. В 2 групі тварин під впливом ниркової тканини збільшувалась швидкість (кут агрегації) і час агрегації тромбоцитів субстратної плазми. Вміст кінцевого продукту перекисного окислення ліпідів – малонового діальдегіда (МДА) в мембранах еритроцитів і тканинах нирки при розвитку патології підвищувалась. Зросли активності антиоксидантних ферментів каталази та субстратіндуцибельної супероксиддисмутази (СОД), а також концентрація "реактанта гострої фази" – церулоплазміну.

Під дією препарату знижувався вміст активних ТБК-реагуючих продуктів в мембранах еритроцитів, відновлювався приріст МДА за час інкубації. Як представлено в таблиці, активність антиоксидантних ферментів змінювалася різнонаправлено: активність церулоплазміну ще більше підвищувалася, а СОД, хоч і знижувалася в порівнянні з аналогічним показником у щурів 2 групи, але залишалося на високому рівні, активність каталази нез-

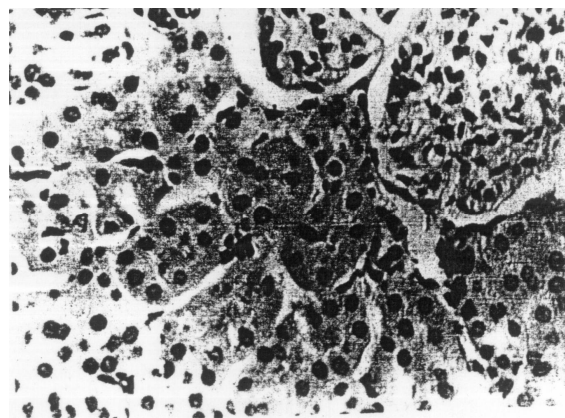
начно підвищувалась, в тканинах нирки активність СОД знижувалась одночасно із зменшенням рівня МДА. Пептиди у тварин з нефритом Хеймана наближали до нормальних значень час рекальцифікації плазми, тромбіновий час, рівень антитромбіну III, час лізису еуглобулінів. Паракоагуляційні тести давали негативні результати. Вплив ниркової тканини на агрегацію тромбоцитів відновлювався – зменшувалась швидкість та збільшувався час агрегації (див. таблицю 2).

Таким чином, індукція нефриту Хеймана викликає гіпокоагуляцію, прискорення фібринолізу з накопиченням в кровотоці патологічних типів фібрину, зниження антиагрегаційної активності ниркової тканини. Вказані зміни були оцінені як прояв синдрому диссемінованого внутрішньосудинного зсідання крові в стадії коагулопатії споживання, ці реакції протікали одночасно з активацією процесів пероксидації на фоні адекватного антиоксидантного захисту.

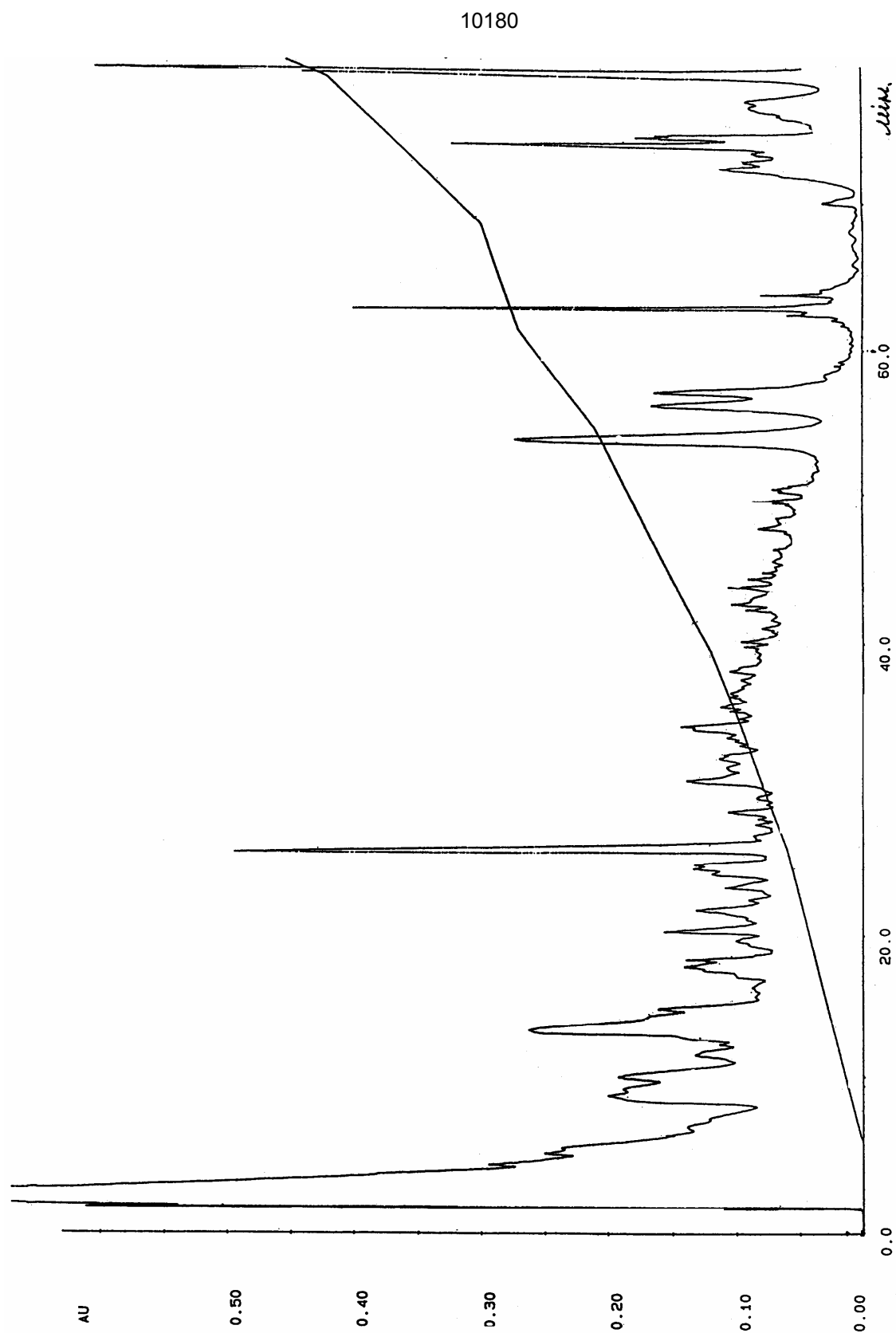
Введення речовини, одержаної даним способом, викликало зниження рівню пероксидації в крові і тканинах, відновлення антиагрегаційної активності нирки, зникнення продуктів паракоагуляції, нормалізацію фібринолізу. Таким чином, БАР проявляє виражену модулюючу дію при гострій нирковій патології.



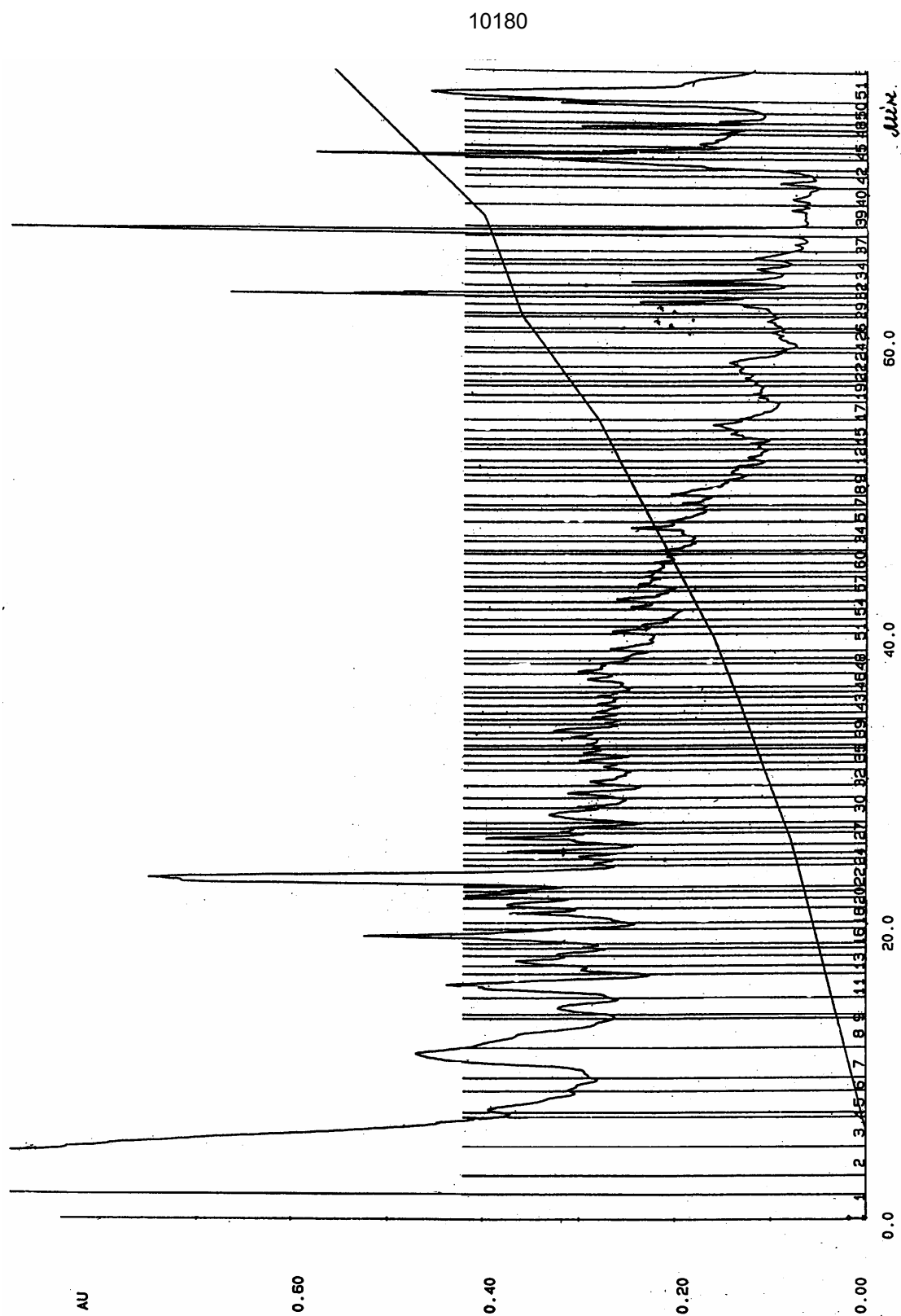
Мікрофото 1



Мікрофото 2



Фіг. 1



Фіг. 2

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03