



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **19993** (13) **U**
(51) **МПК**
A61K 35/74 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ ДОБАВКИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АЛКОГОЛЬНОЇ ТА НАРКОТИЧНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ

1

(21) u200605885

(22) 29.05.2006

(24) 15.01.2007

(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.

(72) Криштаб Тетяна Павлівна, Романовська Вікторія Олександрівна, Карпенко Валерій Іванович, Рокитко Павло Васильович, Таширев Олександр Борисович, Литвинов Валентин Борисович, Стогній Ніна Андріївна, Ковтун Тамара Василівна, Лебедев Дмитро Сергійович, Ісаєнко Володимир Миколайович, Кисла Любов Василівна

(73) НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ УКРАЇНИ ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ.Д.К.ЗАБОЛОННОГО

2

(57) Спосіб одержання біологічно активної добавки для лікування алкогольної та наркотичної залежності, який включає культивування метилотрофного мікроорганізму на живильному середовищі при певній температурі в аеробних умовах з наступним отриманням цільового продукту, який **відрізняється** тим, що як метилотрофний мікроорганізм використовують новий штам *Methylobacterium extorquens* 21Ч, депонований в Українській колекції мікроорганізмів під № В-3362, культивування проводять у живильному середовищі при температурі 30°C і з джерелом вуглецю - метанолом, для отримання кінцевого продукту біомасу висушують.

Корисна модель відноситься до медицини, мікробіології, біотехнології і стосується розробки способу одержання антинаркотичного засобу на основі біомаси нового штаму мікроорганізмів, запропонованого як продуцент біологічно активної добавки (БАД).

Більшість розробок з даної тематики переважно є з рослинної сировини, за приготуванням досить трудомісткі процедури і недостатньо ефективні за дією [1-4].

Існують розробки на основі рецептів старовинної народної медицини а також в сучасному сприйнятті - це біологічні харчові добавки, які складають протиалкогільний комплекс з продуктами харчування [5-11]. Дані добавки тільки пом'якшують токсичну дію етанолу і його метаболітів і можуть використовуватися лише з метою профілактики.

Крім того існують поодинокі відомості про способи із застосуванням мікроорганізмів [12-14]. Це дегідрогенази, виділені з молочнокислих бактерій, які виконують захисну роль від швидкого всмоктування алкоголю в кров і печінку. У міжнародній заявці [13] пропонується ферментативний комплекс, виділений з двох видів мікроорганізмів (дріжджі, бактерії), а саме: алкогольдегідрогенази, альдегіддегідрогенази та інші ферменти, які активні разом з комплексним захистом - протеази та

біополімери формених елементів бактеріальних клітин. Застосування даної розробки обмежується лише її захисною функцією в алкоголізованому організмі за рахунок прискорення метаболізму етанолу. В свою чергу, спосіб виготовлення даного препарату має багатоетапний і дуже складний характер, що вимагає залучення кваліфікованих спеціалістів (біохіміків, ферментологів, мікробіологів).

Прототипом нашої корисної моделі є спосіб отримання антиалкогольного і антинаркотичного засобу, який створено з використанням біомаси та/або продуктів життєдіяльності штаму бактерій *Methylococcus thermophilus* В-3126 (тобто засіб С-3126/29) [14]. Недоліками цього способу є особливі умови культивування, а саме використання даним штамом в якості єдиного вуглецевого субстрату тільки метану, що потребує досить складного технічного обладнання і призводить до подорожчання кінцевого виходу продукту на основі природного вуглеводневого газу. Враховуючи ці обставини, здійснення його виробництва, особливо в даний час, стає практично неприйнятним.

Задачею запропонованої корисної моделі є спрощення та здешевлення способу одержання біологічно активної добавки для лікування алкогольної та наркотичної залежності шляхом використання іншого штаму - *Methylobacterium extorquens*

(13) **U**

(11) **19993**

(19) **UA**

214, для якого джерелом вуглецю і енергії є метанол, тобто рідина, а не газ (метан), чим вигідно відрізняє цей штам від прототипу. Саме ця властивість була застосована у створенні даного засобу.

Технічна задача вирішується тим, що у способі одержання БАД з антиалкогольною та антинаркотичною дією, який включає культивування метилотрофного мікроорганізму на живильному середовищі в аеробних умовах з наступним отриманням цільового продукту, використовують новий штам *Methylobacterium extorquens* 214, депонований в Українській колекції мікроорганізмів під № В-3362, культивування проводять у живильному середовищі при температурі 30°C з джерелом вуглецю - метанолом, а для отримання кінцевого продукту біомасу висушують.

Штам мікроорганізмів, який пропонується для використання у способі.

Видова назва: *Methylobacterium extorquens*

Номер штаму: 214.

Штам ізолювано із природного середовища, із дерново-підзолистого ґрунту (на глибині 0-2 см під виноградом *Vitis* sp., Київ, Україна) в 1995р. Штам зберігається в УМК під № В-3362.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму. Клітини - палички та диплопалички, 0,8-1,0 x 1,5-3,2 мкм. Спори та макрокапсули відсутні. Грамнегативні. Рухливі, мають один полярний джгутик. На агаризованому мінеральному середовищі утворюють пастоподібні опуклі колонії з вологим блиском і рівними краями. Діаметр колоній 2,0 - 4,0 мм.

Колонії рожево-пігментовані. В рідкому середовищі суспензія культури є гомогенною, рожевого кольору. Аероб. Температурний діапазон росту 10-37°C, оптимальна температура росту 30°C. Діапазон pH 6,0-7,5, оптимум pH 6,6. Желатину не розріджує, крохмаль не гідролізує. Позитивний по каталазі, оксидазі, глюкозооксидазі. Облігатний аероб, тест Фогес-Проскауера на здатність рости в анаеробних умовах негативний. Факультативний метилотроф. Як єдине джерело вуглецю і енергії використовує метанол, етанол. Функціонує сериновий цикл асиміляції метанолу. Асимілює також сукцинат, лактат, гліцерин, крохмаль. Ростає на глюкозо-картопляному агарі (ГКА). На м'ясопептоному агарі (МПА) ріст повільний (5-7 діб). Не росте на глюкозі, фруктозі, сахарозі, мальтозі, лактозі, рамнозі, трегалозі, арабінозі, ксиллозі, галактозі, цитраті, сорбіті, дульциті, інозиті, аспартаті,

глутаматі, триптофані. Використовує амонійну та нітратну форми азоту. Ростає активність штаму визначається оптичною густиною культуральної рідини.

Довгострокове зберігання штаму здійснюється на скошеному агаризованому середовищі під шаром вазелінової олії (6 місяців).

Періодичне культивування здійснюється на агаризованих мінеральних середовищах. Середовище Київське (К), грам на літер води (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,5; KH_2PO_4 - 0,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; NaCl - 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,02; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; метанол - 5 мл, водопровідна вода - 0,7 л; дистильована вода - 0,3 л, агар - 20 г. Інокулюм наносять на поверхню твердого середовища. Інкубують при температурі 30°C 48 годин. Періодичне культивування в колбах здійснюється в рідкому середовищі вище наведеного складу (за винятком агару) на качалках протягом 24-36 годин. Безперервне культивування здійснюється у ферментері в режимі хемостату. Розбавлення культуральної рідини здійснюється середовищем такого складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,5; KH_2PO_4 - 1,2; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 1,2; NaCl - 0,9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,9; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,06; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,003; мікроелементи (мкг/л): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 200; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 15; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 105; H_3BO_3 - 15; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 15; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 45.

Джерело вуглецю - метанол (5 мл/л). Температура 30°C, pH 6,7. Концентрація біомаси при засіві - 0,5 г/л. Лімітуючий фактор - азот амонію. Продуктивність синтезу біомаси - до 0,6 г/л за годину (у прототипу - не більше 0,5 г/л за годину).

З одержаної культуральної рідини клітини виділяють центрифугуванням при 5000g, осад суспендіують у воді. Сушку одержаних клітин бактерій здійснюють ліофільно в сублімаційній сушці типу LZ-9,2 при температурі мінус 40°C на вході і плюс 25°C на виході під вакуумом 5-6 Паскаля протягом 28 годин.

Патогенних властивостей не виявлено.

Генетичні особливості: не потребує вітамінів та інших ростових факторів.

Склад біомаси *Methylobacterium extorquens* 214 (В-3362): білок - 40%; амінокислоти - 23,8% (таблиця 1); ліпіди - 5,38%; вуглеводи - 3,7%; мікроелементи: Mg - 1,98%; Ca - 9,44%; Na - 7,59%; K - 7,11%; P - 0,92%; Fe - 0,08%; вітаміни: B₁ - 10,0 мкг/г, B₂ - 33,2 мкг/г, B₁₂ - 2,7 мкг/г, PP - 378,75 мкг/г; каротиноїди - 10,0 мкг/г.

Таблиця 1

Амінокислотний склад біомаси *Methylobacterium extorquens* 214 (В-3362).

Амінокислоти	% від сухої ваги біомаси	% від загального вмісту амінокислот
Лізин	1,425	5,98
Гістидин	0,436	1,83
Аргінін	2,546	10,68
Аспаргінова к-та	1,613	6,77
Треонін	1,096	4,60
Серин	0,865	3,63
Глутамінова к-та	4,100	17,20
Пролін	1,278	5,36

Амінокислотний склад біомаси *Methylobacterium extorquens* 214 (B-3362).

Гліцин	1,445	6,06
Аланін	2,641	11,08
Цистін	0,053	0,22
Валін	1,439	6,04
Метіонін	0,069	0,29
Ізолейцин	0,975	4,09
Лейцин	2,001	8,40
Тирозин	0,790	3,31
Фенілаланін	1,066	4,47
Загальна сума	23,838	

Коли мова йде про алкогольну залежність, слід відмітити, що в основі механізму виникнення і розвитку цього захворювання лежать суттєві порушення метаболізму етанолу, пов'язані з накопиченням токсичного продукту його утворення - ацетальдегіду. Відомо, що ацетальдегід, як клітинна отрута, маючи високу токсичність, уражає печінку, нирки, мозок та інші органи і системи організму. В першу чергу порушується цілісність клітини в результаті деструктивних змін цитоплазматичної мембрани.

Окислення алкоголю в організмі каталізують два основні ферменти: алкогольдегідрогеназа (АДГ), за допомогою якої етанол окислюється до ацетальдегіду, і альдегіддегідрогеназа (АлДГ), яка окислює ацетальдегід до ацетату. Останній метаболізується у трикарбоновому циклі.

В головному мозку існують структури, які беруть участь в регуляції емоційного стану. Вони знаходяться, в основному, в гіпоталамусі, де знаходиться «центр задоволення», діяльність якого пов'язана з виробленням дофаміну (ДА). Потрапляння наркотику в організм сприяє посиленому синтезу дофаміну. З посиленням наркотичного навантаження відбувається перезбудження центру

і виснаження його функціональних можливостей.

Вивчали ефективність дії запропонованої біомаси *Methylobacterium extorquens* 214 (B-3362) на активність ферментів обміну етанолу: алкоголь-та альдегіддегідрогенази, вміст малонового діальдегіду (МДА) в крові і дофаміну в структурах мозку у білих безпородних статевозрелих щурів (самців) масою 250,0 - 280,0г.

Були виділені 2 групи тварин: контрольна та дослідна. Щурам дослідної групи одноразово вводили біомасу 214 (B-3362) внутрішньошлунково в дозі 30,0мг/100г маси, а контрольним тваринам - дистильовану воду. Через 1,5год після введення проводили декапітування (обезголовлювання) тварин.

Активність АДГ- та АлДГ визначали по кількості відновленого нікотинаміддинукліотиду (НАД) з етанолом або ацетальдегідом за допомогою спектрофотометричного методу (15,16). Оцінку інтенсивності процесів пероксидного окислення ліпідів проводили за методом визначення малонового діальдегіду [17]. Вміст ДА в структурах мозку визначали за допомогою методу колонкової хроматографії на сефадексі G-10 [18].

Таблиця 2

Вплив біомаси штаму B-3362 на активність алкоголь- та альдегіддегідрогенази і вміст малонового діальдегіду (МДА) в крові нормальних тварин ($M \pm m$; $n=6-7$).

Групи тварин	Показники		
	АДГ (нмоль НАД/хв/мг)	АлДГ (нмоль НАДН/хв/мг)	МДА (мкМ/л)
Контрольна	0,064 \pm 0,020	0,42 \pm 0,01	5,70 \pm 0,04
Дослідна	0,100 \pm 0,028	0,88 \pm 0,06*	6,20 \pm 0,05

Примітка: *- вірогідність по відношенню до контрольних тварин ($p < 0,05$).

M - постійна величина;

m - перемінна величина;

n - кількість тварин у кожній групі.

Через 1,5год після одноразового введення біомаси тваринам активність АлДГ в крові підвищується в 2 рази відповідно по відношенню до тварин контрольної групи (табл.2), що сприяє посиленню окислення ацетальдегіду, який у великих

концентраціях є дуже токсичною сполукою. Вміст МДА у даних умовах не змінюється.

Вміст дофаміну в різних структурах мозку у тварин, які одержували біомасу, знижується (табл. 3).

Вплив біомаси штаму В-3362 на вміст дофаміну в мочку нормальних тварин ($M \pm m$; $n=6-7$).

Групи тварин	Структури мозку		
	Гіпоталамус	Середній мозок	Нова кора
Контрольна	1,66 \pm 0,06	0,42 \pm 0,01	0,40 \pm 0,01
Дослідна	1,26 \pm 0,04*	0,37 \pm 0,01*	0,32 \pm 0,01*

Примітка: * - вірогідність по відношенню до контрольних тварин ($p < 0,05$).

M - постійна величина;

m - перемінна величина;

n - кількість тварин у кожній групі.

Приклад 1. Ефективність дії запропонованої біомаси *Methylobacterium extorquens* 214 (В-3362) досліджено на моделі гострої і хронічної алкогольної та морфінної інтоксикації у білих безпородних статевозрілих щурів (самців) масою 250,0-280,0г. Вивчення впливу біомаси штаму В-3362 на інтенсивність метаболічних процесів у тварин проводили в порівнянні з прототипом *Methylococcus thermophilus* В-3126 (С-3126/29) [14].

Визначали вплив біомаси штаму В-3362 в порівнянні з 3126/29 на активність ферментів обміну етанолу алкоголь- та альдегіддегідрогенази та вміст малонового діальдегіду в крові щурів при введенні їм субнаркоїтичної дози етанолу. Були

виділені наступні групи: інтактна, контрольна та дослідні. Тваринам контрольної групи одноразово внутрішньочеревно вводили 25% розчин етанолу в дозі 3,6г/кг маси тварин. Тварини дослідних груп за 30хв до введення етанолу одержували біомасу бактерій (В-3362 або С-3126/29) внутрішньошлунково в дозі 30,0мг/100г маси тварин. Інтактним тваринам в еквімолярній кількості вводили фізіологічний розчин. Через 1год після введення етанолу проводили декапітування тварин.

Згідно з даними табл.4 через 1год після одноразового введення етанолу активність АДГ в крові щурів підвищується в 1,6 разів по відношенню до інтактних тварин.

Таблиця 4

Вплив штаму В-3362 і засобу С-3126/29 (прототип) на активність алкоголь- і альдегіддегідрогенази та вміст малонового діальдегіду в крові тварин за умов гострої алкогольної інтоксикації ($M \pm m$; $n=7$).

Групи тварин	Показники			
	АДГ (нмоль НАД/хв/мг)	АлДГ (нмоль НАДН/хв/мг)	АДГ/ АлДГ	МДА (мкМ/л)
Інтактні	0,11 \pm 0,01	0,60 \pm 0,04	1:5,4	6,9 \pm 0,5
Етанол	0,18 \pm 0,02*	0,50 \pm 0,03	1:2,7	7,1 \pm 0,4
Етанол + С-3126/29 (прототип)	0,21 \pm 0,04*	0,43 \pm 0,02*	1:2,1	7,6 \pm 0,2
Етанол + В-3362	0,13 \pm 0,02	0,68 \pm 0,04	1:5,2	6,9 \pm 0,3

Примітка: * - вірогідність по відношенню до контрольних тварин ($p < 0,05$).

M - постійна величина;

m - перемінна величина;

n - кількість тварин у кожній групі.

Введення засобу В-3362 сприяє нормалізації активності АДГ, підвищує активність АлДГ та співвідношення АДГ/АлДГ. Вміст малонового діальдегіду в даних умовах незмінюється (табл. 4).

Таким чином, дія засобу В-3362 на основні ферменти метаболізму етанолу в умовах гострої алкогольної інтоксикації ефективніше, ніж прототипу - засобу С-3126/29.

Приклад 2. Порівняння дії біомаси штаму В-3362 з засобом С-3126/29 (прототип) на інтенсивність деяких метаболічних процесів проводили за умов хронічної алкогольної інтоксикації.

Модель хронічної алкогольної інтоксикації на щурах була розроблена нами в процесі експерименту. Суть моделі полягала в наступному: протя-

гом 10 днів тварини одержували алкоголь. Перші 5 днів алкоголь вводили внутрішньочеревно в розрахунок 2,0г/кг маси тварини, а досліджувані препарати - внутрішньошлунково в дозі 30,0мг/100г маси тварин. Протягом наступних 5 днів тварин утримували в умовах вільного доступу до 25% розчину етанолу, а біомасу бактерій тварини споживали самостійно.

Визначали наступні біохімічні показники: активність алкоголь- і альдегіддегідрогенази та вміст малонового діальдегіду.

Порівняння дії біомаси штаму В-3362 з засобом С-3126/29 (прототип) в умовах хронічної алкогольної інтоксикації підтвердило перевагу ефективності впливу штаму В-3362 на ці ж показники.

Результати наведені у таблиці 5.

Таблиця 5

Вплив біомаси штаму В-3362 і засобу С-3126/29 (прототип)
на активність алкоголь- і альдегіддегідрогенази та вміст малонового
діальдегіду в крові тварин за умов гострої алкогольної інтоксикації ($M \pm m$; $n=7$).

Групи тварин	Показники			
	АДГ (нмоль НАД/хв/мг)	АлДГ (нмоль НАДН/хв/мг)	АДГ/ АлДГ	МДА(мкМ/л)
Інтактні	0,11 \pm 0,01	0,49 \pm 0,03	1:4,5	7,0 \pm 0,3
Етанол	0,26 \pm 0,01*	0,43 \pm 0,04	1:1,7	6,6 \pm 0,5
Етанол + С-3126/29 (прототип)	0,21 \pm 0,03*	0,44 \pm 0,02	1:2,1	5,6 \pm 0,4
Етанол + В-	0,13 \pm 0,01	0,67 \pm 0,05*	1:5,1	5,2 \pm 0,3

Примітка: * - вірогідність по відношенню до контрольних тварин ($p < 0,05$).

М - постійна величина; m - перемінна величина;

n - кількість тварин у кожній групі.

Підвищення активності АлДГ сприяє швидшому метаболізму ацетальдегіду, що, в свою чергу, проявляє детоксикаційну дію і захищає печінку від токсичного пошкодження.

Приклад 3. Відомо, що в основі алкоголізму і наркоманії лежать загальні патогенетичні механізми [19]. Це було підставою для подальшого проведення експериментів з штамом В-3362 на моделі гострої морфінної інтоксикації.

В цих досліджах тварини були розділені на три наступні групи: інтактна, контрольна та дослідна.

Тваринам контрольної групи одноразово внутрішньом'язево вводили 1% розчин морфіну гідрохлориду в дозі 40,0мг/кг маси тіла. Тваринам дослідної групи за 30хв до введення морфіну одноразово вводили біомасу штаму В-3362 через зонд у шлунок в дозі 30,0мг/100г маси тварин. Через 1год після введення морфіну тварин декапітували.

Під впливом морфіну вміст дофаміну в гіпоталамусі у тварин підвищується по відношенню до інтактних тварин та нормалізується у щурів, які одержували біомасу штаму В-3362 (табл. 6).

Таблиця 6

Вплив біомаси штаму В-3362 і засобу С-3126/29 (прототип)
на вміст дофаміну (мкг/г тканини) в мозку щурів за умов гострої морфінної інтоксикації ($M \pm m$; $n=7$)

Групи тварин	Структури мозку		
	Гіпоталамус	Середній мозок	Нова кора
Інтактна	1,66 \pm 0,06	0,42 \pm 0,01	0,42 \pm 0,03
Морфін	2,44 \pm 0,07*	0,40 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01
Морфін + В-3362	1,80 \pm 0,10	0,43 \pm 0,01	0,37 \pm 0,01
Морфін + С-3126/29 (прототип)	2,2 \pm 0,1	0,4 \pm 0,01	0,41 \pm 0,01

Примітка: * - вірогідність по відношенню до контрольних тварин ($p < 0,05$).

М - постійна величина;

m - перемінна величина;

n - кількість тварин у кожній групі.

Наведені приклади демонструють, що за умов гострої та хронічної алкогольної інтоксикації введення біомаси штаму В-3362 підвищує активність ферментів метаболізму етанолу (АДГ, АлДГ, співвідношення АДГ/АлДГ) в сировотці крові, а за умов гострої морфінної інтоксикації нормалізує вміст дофаміну у гіпоталамусі, отже свідчать про здатність біомаси штаму В-3362 позитивно впливати на фізіолого-біохімічні зрушення під впливом алкоголю та морфіну, що більш ефективно порівняно з прототипом.

Запропонований винахід може бути впроваджений у біотехнологічному виробництві біомаси штаму В-3362, саме як продуцента БАД з антиалкогольною та антинаркотичною дією.

Література

1. Патент: 2178707 Россия, МПК⁷ А61К 35/78, заявл. 13.03.00.
2. Патент: 2178706 Россия, МПК⁷ А61К 35/78, заявл. 13.03.00.
3. Рожанец В.В. Зверобой: применение в психиатрии и наркологии // Наркология. - 2003. - №7. - С.40-46
4. Рожанец В.В., Нужный В.П. Биологически активная добавка к пище «Наркофит» // Наркология. - 2003ю - №10. - 34-39
5. Патент: CN1640301-2005, МПК А23L1/16;
6. Патент: CN16Q2943-2005, МПК А61Р25/32;
7. Патент: CN1582990-2005, МПК А61Р25/32;
8. Патент: CN1582780-2005, МПК А23L1/48;

9. Патент: CN1640431-2005, МПК А61К9/00;
10. Патент: US2002168433-2002, МПК А23L1/30В;
11. Патент: CN1341449-2002, МПК А61Р25/32.
12. Патент: CN1377586-2002, МПК А23С9/123
13. Міжнародна заявка: WO9639174 - 1996
14. Малашенко Ю.Р., Синицький В.М., Соколов ГГ., Криштаб Т.П., Романовська В.О. Патент 32473 України. А61К35/74. Засіб від алкогольної та наркотичної залежності. Опубл. 15.12.2000 - Бюл. №7
15. Skursky L., Kowaz I. and Stachova M. A sensitive photometrie assay for alcohol dehydrogenase activity in blood Serum // *Analyt Biochem.* - 1979.- V. 99.- P. 65-71
16. Харченко Н.К., Синицький В.Н. Альдегиддегидрогеназная активність сыворотки крови при разных концентрациях ацетальдегида // *Укр. био-*

хим. журн.- 1993.- Т.65, №5.- С.53-58.

17. Стальская И.Д., Гаришвили Т.Т. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии.-М.: Медицина, 1977.- С. 66-68.

18. Earley G.J. and Leonard B.E. Isolation and assay of noradrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine and several metabolites from brain, tissue using disposable Bio-Rad column packed with sephadex G-10 // *J. of Pharmac. Methods.*- 1978.-V. 1.- P.67-79.

19. Анохина И.П., Коган Б.М., Маньковская И.В. и др. Общность патогенетических механизмов алкоголизма и наркомании и пути поиска средств для лечения этих заболеваний // *Фармакол. и токсикол.* - 1990. -Т.53, №4. -С.4-9.