



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68651** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61K 31/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 08792**
(22) Дата подання заявки: **12.07.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.04.2012**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.04.2012, Бюл.№ 7**

(72) Винахідник(и):
**Ярош Олександр Кузьмич (UA),
Козир Віталій Анатолійович (UA),
Солеймані Алігударзі Марина Василівна (UA),
Барчина Олена Ігорівна (UA),
Єфімцева Тетяна Костянтинівна (UA),
Цуркан Олександр Олександрович (UA),
Ковальчук Тетяна Василівна (UA),
Бурмака Олександр Васильович (UA)**
(73) Власник(и):
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН
УКРАЇНИ",
вул. Ежена Потье, 14, м. Київ, 03057 (UA)**
(74) Представник:
**Шаповаленко Світлана Лазарівна,
реєстр. №0**

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ СУХОГО ЕКСТРАКТУ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ ЯК ЗАСОБУ, ЩО ПРОЯВЛЯЄ
АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧНУ ТА АНТИТРОМБОТИЧНУ ДІЮ**

(57) Реферат:

Застосування сухого екстракту конюшини лучної, як засобу, що проявляє антиатеросклеротичну та антитромботичну дію.

UA 68651 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до біологічно активних речовин, що можуть використовуватися для лікування та профілактики атеросклерозу та підвищеного тромбоутворення.

Атеросклероз, особливо у людей похилого віку, характеризується основною тріадою, яка проявляється погіршенням пам'яті та когнітивних функцій ЦНС, погіршенням серцево-судинних функцій (стенокардія, атеросклероз коронарних артерій, інфаркт міокарда) та реологічних властивостей крові (дисліпідемія, гіперліпідемія, атероматоз магістральних судин, підвищене згущення крові та тромбоутворення, інсульти ішемічний та геморагічний), які сьогодні є основною причиною смертності та інвалідності населення розвинутих країн світу.

Конюшина лучна та її галенові фармацевтичні форми здавна використовувалися в народній медицині як відхаркувальний, сечогінний, потогінний, протизапальний та бактерицидний засіб [1]. Результати сучасних науково-експериментальних досліджень виявили у складних фітокомпозиціях, куди входить як складова екстракт конюшини, ефективність при багатьох захворюваннях, в тому числі і порушеннях серцево-судинної системи, головними з яких є атеросклероз і його наслідки у вигляді інфарктів міокарда та мозкових інсультів.

Відомо, що квітки конюшини лучної широко використовують як харчові добавки при серцево-судинних захворюваннях, в тому числі і при атеросклерозі з нормальним тиском, який супроводжується головним болем та шумом у вухах [1].

Однак, до складу квіток і трави конюшини входить дуже велика кількість активних компонентів, які до цього часу експериментально не досліджувалися, а вони можуть виявляти різну біологічну активність і фармакологічні властивості, в тому числі корисні і при захворюваннях крові, фармакологічні властивості, в тому числі корисні і при захворюваннях крові, серцево-судинної системи та порушеннях ліпідного обміну [3], та застосовуватись як антиатеросклеротичні та антитромботичні засоби.

В основу корисної моделі поставлено задачу: визначення здатності пригнічення гемостазу, зменшення тромбоутворюючих властивостей крові та антигіперліпідемічних властивостей сухого екстракту квіток конюшини лучної (ЕКЛ) в умовах тритонові моделі гіперліпідемії. Даний екстракт розроблений в ДУ Інститут фармакології та токсикології НАМН України і містить суму ізофлавоноїдів: формонетин, біоханін А, геністеїн та даїдзеїн [3].

Приклади конкретного виконання

Спосіб отримання засобу складається з екстракції з подрібненої сировини (ступінь подрібнення часток до розміру не більше 7 мм) квіток конюшини лучної 70 % водним розчином спирту етилового. Встановлене оптимальне співвідношення між масою сировини та об'ємом екстрагенту, яке складає 1:20, а час екстракції - 45 хв. при температурі 50 °С одноразово.

Отриману витяжку відстоюють при температурі 10 °С протягом 3-4 діб, фільтрують через скляний фільтр ПОР 100 та піддають випаровуванню вакуумно-ротаційним випарювачем при температурі не вище 60 °С до густої маси. Надалі масу піддають вакуумному сушінню при тій же температурі до повного висушування і одержання сухого порошку зеленувато-коричневого кольору, гіркуватого смаку. Вихід сухого екстракту становить біля 6 %.

Рослинний екстракт конюшини лучної стандартизують за вмістом основних активних сполук - ізофлавоноїдів: формонетину, даїдзеїну, біоханіну А та геністеїну, загальний вміст яких повинен бути не менше 8,0 %-12,0 %. В екстракті фракції ізофлавоноїдів повинні вміщуватися в таких співвідношеннях: формонетину - 57,86 %; даїдзеїну - 2,94 %; біоханіну А - 36,34 % та геністеїну - 6,84 % [3].

Виготовлений в будь-якій лікарській формі сухий екстракт конюшини лучної виявляє широкі біологічні властивості, зокрема відновлювати функціональні властивості серцево-судинної системи та реологічні показники крові, які суттєво порушуються при атеросклеротичних змінах та гіперліпідемії, особливо у людей похилого віку. Це дає змогу використовувати засоби, що вміщують сухий екстракт конюшини лучної для лікування та профілактики підвищених тромбоутворюючих властивостей крові та атеросклеротичних порушень з гіперліпідемією, викликаною ліпопротеїдами низької (ЛПНЩ) та дуже низької щільності (ЛПДНЩ), які є причиною захворювань, що супроводжуються синдромом підвищеної в'язкості крові (ішемічна хвороба серця, судинні захворювання головного мозку, атеросклероз, тромбофлебіти, тромбози, порушення кровообігу в кінцівках та ін.).

Новим в запропонованій корисній моделі є те, що вперше пропонується сухий спиртовий екстракт зі стандартизованим вмістом активних компонентів і сполук, що дає прогнозований результат при його використанні як з профілактичною, так і лікувальною метою.

Приклад 1. Вплив сухого екстракту конюшини лучної на показники часу тромбоутворення у тварин.

- Введення лабораторним тваринам (мишам білим нелінійним) екстракту конюшини лучної в дозі 50 мг/кг маси тварин викликає позитивні зміни реологічних показників крові, зокрема часу утворення тромбу - терміну в секундах від початку взяття крові до утворення згустка [2]. Сухий екстракт конюшини лучної викликав нормалізацію реологічних показників крові, порушених розвитком атеросклеротичних змін і формуванням тромбу завдяки попередньому введенню атерогенного фактора тритону WR-1339 в дозі 500-750 мг/кг маси внутрішньочеревинно. Отримані дані наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Зміна часу утворення згустка крові (с) під впливом екстракту конюшини лучної в умовах модельованого атеросклерозу, викликаного тритоном WR-1339

Показник	Швидкість утворення згустка, с				
	Контроль	Тритон WR-1339 500 мг/кг	Тритон WR-1339 500 мг/кг + ЕКЛ 50 мг/кг	Тритон WR-1339 750 мг/кг	Тритон WR-1339 750 мг/кг + ЕКЛ 50 мг/кг
M	98,0	63,5	97,6	35,0	76,7
±m	15,5	3,4	36,6	15,8	24,3
%	100,0	-35,2*	-0,4*	-64,3*	-21,7*
%		100,0	+53,7**	-55,1**	+119,1**

*- рівень достовірності різниці вище $P < 0,05$ в порівнянні з показниками в контрольній групі;

Примітка: ** - рівень достовірності різниці вище $P < 0,05$ в порівнянні з показниками в групі тварин, що отримували тритон WR-1339.

- Наведені дані свідчать, що реологічні властивості крові в умовах розвитку атеросклеротичних змін суттєво погіршуються. Зокрема, значно скорочується час утворення згустку, що є одним з важливих факторів згущення крові та формування тромбів в судинах мозку, серця, нирок і т.д., які часто стають початком розвитку інсультів та інфарктів зі смертельними ускладненнями та інвалідизацією.
- Введення на такому фоні стандартизованого екстракту конюшини лучної сприяло зменшенню тромбоутворюючої активності крові, викликаній атерогенним фактором (тритон WR-1339), та подовженню терміну, необхідного для утворення згустка в умовах введення тритону в дозі 500 мг/кг з $63,5 \pm 3,4$ секунд до $97,6 \pm 36,6$ с, а на фоні введення тритону в дозі 750 мг/кг маси тварин - з $35,0 \pm 15,8$ с до $76,7 \pm 24,3$ с, тобто більше ніж вдвічі.
- Приклад 2. Вплив сухого екстракту конюшини лучної на тромбоутворення у тварин різної статі в умовах гіперхолестеринемії.
- В умовах формування гіперхолестеринемії та атеросклеротичних змін в судинах тварин виявилися тендерні відмінності в реакціях на атерогенний фактор та лікувальні властивості сухого екстракту конюшини лучної. Отримані результати в наступній серії експериментів демонструються в таблиці 2.

Таблиця 2

Динаміка змін тривалості періоду тромбоутворення крові в секундах у мишей різної статі при дії сухого екстракту конюшини лучної в умовах модельованого атеросклерозу

№ п/п	Серія дослідів	Самці M±m, с	%	Самиці M±m, с	%
1	2	3	4	5	6
1	Контроль	82,0±28,5	0	114,0±62,4	39,0%
2	Тритон WR-1339 500 мг/кг	71,0±4,2	-13,41	56,0±2,6	-50,88
3	Тритон WR-1339 750 мг/кг	24,3±0,6*	-70,37	45,7±30,9	-59,91
4	Тритон WR-1339 500 мг/кг + ЕКЛ 50 мг/кг	69,5±46,0*	-15,24*	125,7±27,2**	+10,26*
			-2,11**		+124,46**
5	Тритон WR-1339 750 мг/кг + ЕКЛ 50 мг/кг	58,7±17,0	-28,41*	94,7±31,5	-16,93*
			+141,56**		+107,22**

* - $p < 0,05$ в порівнянні з показниками тварин контрольної групи

** - $p < 0,05$ в порівнянні з показниками тварин з модельованим атеросклерозом.

- Наведені результати свідчать, що статева різниця в тривалості тромбоутворення характеризувалася первинною різницею в швидкості тромбоутворення у самців і самиць при формуванні атеросклеротичних змін. У вихідному стані формування тромбів відбувалося швидше у самців, ніж у самиць в середньому на 39,0 %. В умовах дії атерогенного фактора і формуванні середньої тяжкості реологічних змін (тритон WR-1339 500 мг/кг) різниця була

недостовірною між самцями і самицями. В умовах тяжкого атеросклерозу, викликаного введенням тритону в дозі 750 мг/кг, різко збільшувалися тенденції до згущення крові і тромбоутворення, про що свідчить значне скорочення терміну формування згустка як у самців, так і у самиць, однак у останніх час на утворення тромбу був майже вдвічі більшим, ніж у самців (відповідно $24,3 \pm 0,6$ с та $45,7 \pm 30,9$ с).

Таким чином, ефективність екстракту конюшини лучної по відновленню реологічних властивостей крові, порушених при гіперхолестеринемії, була вищою у самиць, ніж у самців.

Приклад 3. Вплив сухого екстракту конюшини лучної на ліпідний спектр та формування атеросклеротичних змін в ліпідних фракціях крові щурів.

Дисліпідемію з розвитком атеросклеротичних змін моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення детергенту тритону WR-1339 (Sigma, США) в дозах 500 мг/кг і 750 мг/кг [4]. Через 23 години вводився перорально в дозі 50 мг/кг екстракт квіток конюшини. Ще через 1 год. відбиралися проби змішаної (артеріальної та венозної) крові для дослідження на біохімічному аналізаторі Prestige 24і. Визначався вміст загального холестерину (ЗХ), холестерину ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) та тригліцеридів (ТГ).

Таблиця 3

Зміна рівня фракцій ліпідів крові щурів при дії екстракту конюшини лучної в умовах тритонкової моделі атеросклерозу

Серія дослідів	Заг. холестерин, мМ/л	ЛПНЩ, мМ/л	Тригліцериди, мМ/л	ЛПВЩ, мМ/л
Контроль	$1,37 \pm 0,09$	$0,13 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,13$	$0,53 \pm 0,02$
Тритон, 500 мг/кг	$14,17 \pm 0,46^*$	$2,02 \pm 0,16^*$	$19,77 \pm 0,41^*$	$2,34 \pm 0,28^*$
% (до контролю)	+934	+1454	+1938	+342
Тритон, 750 мг/кг	$13,52 \pm 0,68^*$	$3,05 \pm 0,72^*$	$20,62 \pm 0,11^*$	$1,86 \pm 0,17^*$
% (до контролю)	+887	+2246	+2025	+251
Тритон, 500 мг/кг + ЕКЛ 50 мг/кг	$14,05 \pm 0,34$	$0,63 \pm 0,12^{**}$	$19,03 \pm 0,42$	$2,57 \pm 0,26$
% (до контролю) %	+926	+385	+1862	+384
(до тритону)	-1	-220	-4	+9
Тритон, 750 мг/кг + ЕКЛ 50 мг/кг	$13,58 \pm 0,61$	$1,74 \pm 0,40^{**}$	$20,08 \pm 0,33$	$1,67 \pm 0,35$
% (до контролю) %	+891	+1238	+1970	+215
(до тритону)	+0,4	-43	-3	-10

* - $p < 0,05$ в порівнянні з показниками тварин контрольної групи;

Примітка: ** - $p < 0,05$ в порівнянні з показниками тварин з модельованим атеросклерозом.

З результатів таблиці видно, що стандартизований екстракт конюшини лучної (СЕКЛ), введений перорально в дозі 50 мг/кг маси тварин, зменшував зростання ЛПНЩ майже на 70 %, з $2,02 \pm 0,16$ мМ/л (при середній тяжкості атеросклерозу, викликаного введенням тритону в дозі 500 мг/кг) до $0,63 \pm 0,12$ мМ/л. Дещо меншою була ефективність СЕКЛ при високому ступеню атеросклеротичних змін (тритон WR-1339 750 мг/кг), оскільки в цих умовах зростання фракції ЛПНЩ зменшувалися в середньому тільки на 42,9 % (з $3,05 \pm 0,72$ після введення тритону до $1,74 \pm 0,4$ мМ/л після одночасного введення тритону (в/ч) і перорального - СЕКЛ в дозі 50 мг/кг).

Викладені результати вказують на відносно вибіркового впливу сухого екстракту конюшини лучної і його переважну ефективність в зниженні значного підвищення ліпопротеїдів низької щільності викликаних введенням тритону.

Отже, сухий екстракт конюшини лучної в умовах модельованого атеросклерозу і гіперліпідемії сприяв зниженню підвищеного вмісту атерогенної фракції холестерину - ліпопротеїдів низької щільності.

Таким чином, сухий екстракт квіток конюшини лучної викazuje ефективну протидію підвищенню тромбоутворюючої здатності крові, особливо у самців, та зростанню гіперліпідемії, переважно за рахунок ліпопротеїдів низької щільності.

Джерела інформації:

1. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. Ред. А. М. Гродзинський. - К.: Українська енциклопедія, 1992. - С. 211-212.

2. Методичні вказівки до практикуму з фізіології людини і тварин для студентів біологічних факультетів вищих навчальних закладів/Укл. М. Ю. Макарчук, В. О. Цибенко та ін. - Київ: Фітосоціоцентр, 2003. - 4 с.

5 3. Патент України № 54477 «Спосіб ідентифікації квіток конюшини лучної та сухого екстракту квіток конюшини лучної». Автори: Цуркан О. О., Ковальчук Т. В., Бурмака О. В. - Бюл. № 21, 2010.

4. Schurr P. E., Schulz J. R., Parkincon T. N. Triton-induced hyperlipidemia in rats as an animal model for screening hyperlipidemic drugs//Lipids. - 1972. - V.7, № 1. - P. 68-72.

10

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Застосування сухого екстракту конюшини лучної як засобу, що проявляє антиатеросклеротичну та антитромботичну дію.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601