



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **69652**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 35/14 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 12006**

(22) Дата подання заявки: **12.10.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.05.2012**

(46) Публікація відомостей **10.05.2012, Бюл.№ 9**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Гулевський Олександр Кирилович (UA),
Моїсєєва Наталія Миколаївна (UA),
Абакумова Олена Сергіївна (UA),
Щенявський Іван Йосипович (UA),
Нікольченко Андрій Юрійович (UA),
Горіна Ольга Леонідівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І
КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015
(UA)**

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ФРАКЦІЇ ІЗ КОРДОВОЇ КРОВІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

(57) Реферат:

Спосіб отримання низькомолекулярної фракції із кордової крові великої рогатої худоби включає дефібринування та гемоліз крові з наступною ультрафільтрацією. Дефібринування проводять після гемолізу шляхом інкубації крові при 50 °С протягом 50 хв., гемоліз здійснюють шляхом заморожування крові до -80 °С, а перед ультрафільтрацією додатково проводять передфільтрацію.

UA 69652 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології, стосується процесу отримання біологічно активної низькомолекулярної фракції (до 5 кДа) із кордової крові великої рогатої худоби, і може бути використана в медицині і ветеринарії з метою стимуляції процесів регенерації.

Відомий спосіб отримання низькомолекулярної фракції з ембріональної тканини великої рогатої худоби [1]. Спосіб включає заморожування до -80°C і розморожування ембріонів, подрібнення м'яких ембріональних тканин, їх гомогенізацію в дисперсійному середовищі на основі апірогенної дистильованої води до руйнування клітинних елементів та елементів волокнистих тканин, центрифугування для відділення клітинних елементів та елементів волокнистих тканин, фракціонування супернатанта ультрафільтрацією з виділенням цільового продукту з молекулярною масою до 5 кДа та одночасну стерилізацію.

Недоліком цього способу є етична проблема використання та забору вихідного біологічного матеріалу. До того ж спосіб передбачає складні та багатоступеневі етапи підготовки біологічного матеріалу до етапу ультрафільтрації.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб отримання низькомолекулярної фракції з молекулярною вагою компонентів до 5 кДа із крові телят [2]. Згідно зі способом, спочатку здійснюють механічне дефібринування крові телят. Потім дефібриновану кров гемолізують шляхом обробки 2 % консервуючим розчином, що містить метиловий ефір 4-гідроксibenзойної кислоти та пропіловий ефір 4-гідроксibenзойної кислоти. Далі гемолізовану кров телят піддають процедурі безперервної чотириступеневої мембранної ультрафільтрації з використанням ультрафільтраційної мембрани, яка відтинає речовини з молекулярною масою більше 8 кДа. Одержаний ультрафільтрат концентрують до 1,10-1,15 г/мл шляхом електродіалізу отриманого розчину за допомогою електродіалізних мембран, які мають прохідність до 300 Да.

Недоліком цього способу є те, що він не дозволяє отримувати низькомолекулярну фракцію з високою біологічною активністю. Це пов'язано з втратою біологічно активних речовин після механічного дефібринування крові і багатоетапних процесів концентрування і фільтрації її після гемолізу. Крім того, кров телят містить невисоку концентрацію біологічно активних речовин.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб отримання низькомолекулярної фракції кордової крові, який би забезпечив можливість підвищити її біологічну активність.

Ця задача вирішується тим, що в відомому способі отримання низькомолекулярної фракції із крові телят, що включає дефібринування та гемоліз крові з наступною ультрафільтрацією, згідно з корисною моделлю, дефібринування крові проводять після гемолізу шляхом інкубації крові при 50°C протягом 50 хв., гемоліз здійснюють шляхом заморожування крові до -80°C , а перед ультрафільтрацією додатково проводять передфільтрацію.

Проведення дефібринування після гемолізу і зміна методу його проведення дозволяє знизити втрату еритромаси і, отже, втрату біологічно активних речовин. Здійснення гемолізу шляхом заморожування без використання консервуючого розчину та введення етапу передфільтрації дає можливість виключити додаткові етапи ультрафільтрації та концентрування, які призводять до зниження біологічної активності фракції. Крім того, кордова кров великої рогатої худоби містить більш високу концентрацію біологічно активних речовин у порівнянні з кров'ю телят.

Спосіб отримання низькомолекулярної фракції (до 5 кДа) із кордової крові великої рогатої худоби (ФКК) включає, згідно з корисною моделлю, наступні етапи: гемоліз, дефібринування крові, передфільтрацію та ультрафільтрацію.

Після забору кордову кров піддають заморожуванню до -80°C і відтаванню при 37°C . Гемолізовану кров дефібрінують шляхом інкубації крові при 50°C протягом 50 хв. Далі гемолізат піддають передфільтрації та ультрафільтрації.

Приклад.

Після забору кордову кров корів заморожували до -80°C і відтавали при 37°C . Гемолізовану кров дефібрінували шляхом інкубації крові при 50°C протягом 50 хв. Отриманий гемолізат піддавали передфільтрації з застосуванням глибинного фільтра Sartopure GF2 (0,62 мкм), який затримує молекули з молекулярною масою понад 100 кДа. Виділення низькомолекулярної фракції до 5 кДа здійснювали методом ультрафільтрації за допомогою ультрафільтраційного обладнання фірми «Sartorius» (Німеччина) в тангенціальному потоці з мембранним модулем Vivaflow-200, який відтинає речовини з молекулярною масою більше ніж 5 кДа. Цей метод поєднує в собі достатньо високу ефективність фільтрації й можливість фільтрувати великі об'єми (від 50 мл до кількох літрів), а також одночасно є і методом стерилізації отриманої фракції за рахунок виключення бактеріального її зараження при розливі та укупорці в стерильних умовах. Отриманий розчин, звільнений від білків та високомолекулярних речовин,

мав концентрацію сухої речовини 10 мг/мл. Отриману фракцію зберігали в ліофілізованому стані.

Паралельно отримували низькомолекулярну фракцію із крові молочних телят (ФТ) способом за прототипом.

5 Біологічну активність ФКК у порівнянні з прототипом оцінювали на моделі термічного опіку шкіри ШВ ступеня у щурів [3]; на моделі аспіринової виразки шлунка у щурів [4]; за тестом на толерантність до глюкози у щурів [4]. Введення піддослідним щурам ФКК значно прискорювало відновлення і нормалізацію експериментальних показників у порівнянні з прототипом (табл. 1-5).

10 На моделі термічного опіку шкіри ШВ ступеня у щурів вивчали ранозагоючу дію ФКК на 21 добу експерименту за площею опікових ран (табл. 1) і біохімічними показниками (табл. 2). З табл. 1 видно, що в/м введення експериментальним щурам ФКК у дозі 1,7 мг/мл прискорює зменшення площі опіку: після введення ФКК площа рани становила $0,03 \pm 0,016 \text{ см}^2$ у порівнянні з контролем $1,04 \pm 0,16 \text{ см}^2$ і прототипом $0,3 \pm 0,1 \text{ см}^2$. Підвищена внаслідок опіку до $291,6 \pm 17,5$ О/л активність лужної фосфатази (ЛФ) ефективніше знижувалася після введення ФКК: до $168,3 \pm 12,2$ О/л у порівнянні з прототипом - до $200,0 \pm 2,0$ О/л і контролем $291,6 \pm 17,5$ О/л (табл. 2). Вміст ТБК-реагуючих продуктів (ТБКРП) після введення ФКК складав $8,5 \pm 0,16$ мкмоль/л у порівнянні з прототипом $9,3 \pm 0,6$ мкмоль/л і контролем $11,6 \pm 1,0$ мкмоль/л (табл. 2).

20 На моделі аспіринової виразки шлунка у щурів вивчали противиразкову активність ФКК на 12 добу експерименту за площею виразкового ураження (табл. 3) і біохімічними показниками (табл. 4). З табл. 3 видно, що введення експериментальним щурам ФКК в/м у дозі 1,7 мг/мл на 12 добу прискорює зменшення площі виразкової поверхні, яка становила після введення ФКК $0,3 \pm 0,19$ балів у порівнянні з контрольною групою $1,8 \pm 0,15$ балів і прототипом $1,0 \pm 0,24$ балів. Зниження підвищеної внаслідок виразкоутворення до $489,5 \pm 11,0$ О/л активності ЛФ після введення ФКК становило $390,2 \pm 9,8$ О/л, прототипу - $448,2 \pm 3,2$ О/л у порівнянні з контролем $489,5 \pm 11,0$ О/л (табл. 4). Введення ФКК приводило до більш ефективного зниження вмісту ТБКРП: $23,4 \pm 0,4$ мкмоль/л у порівнянні з прототипом $25,0 \pm 0,2$ мкмоль/л, з контролем $27,9 \pm 0,7$ мкмоль/л (табл. 4).

30 Вивчення цукрознижуючої активності низькомолекулярної фракції до 5 кДа кордової крові проводили за тестом на толерантність до глюкози (ТТГ) (табл. 5). В контрольній групі вміст глюкози в периферичній крові в 2,5 разів перевищував норму. Введення низькомолекулярної фракції з крові молочних телят (прототип) призводило до зниження рівня глюкози на 25,0 % у порівнянні з контролем. Введення ФКК призводило до значно більшого зниження рівня глюкози: на 37,2 % від контрольної величини (табл. 5).

35 Таким чином, значне прискорення відновлення та нормалізації експериментальних показників у піддослідних щурів після введення ФКК у порівнянні з ФТ свідчить про високу біологічну активність фракції кордової крові, одержуваної заявленим способом.

Таблиця 1

Ранозагоююча активність низькомолекулярної фракції кордової крові та крові телят на моделі термічного опіку шкіри

	Середня площа рани, см^2	Перевищення прототипу, %
Після формування моделі		
	$7,4 \pm 0,20$	
21 доба експерименту		
Контроль	$1,04 \pm 0,16$	
ФТ	$0,3 \pm 0,1$	
ФКК	$0,03 \pm 0,016$	90

Таблиця 2

Біохімічні показники крові експериментальних щурів після введення низькомолекулярної фракції кордової крові та крові телят на моделі термічного опіку шкіри

	Активність ЛФ, О/л	Перевищення прототипу, %	Вміст ТБКАП, мкмоль/л	Перевищення прототипу, %
Норма	160,0±5,0		8,6±0,4	
Контроль	291,6±17,5		11,6±1,0	
ФКК	168,3±12,2	15,9	8,5±0,16	8,6
ФТ	200,0±2,0		9,3±0,6	

Таблиця 3

Противираzkова активність низькомолекулярної фракції кордової крові та крові телят

	Кількість тварин з виразковими ушкодженнями в групі, %	Середня площа виразок, бали	Виразковий індекс	Противираzkова активність, %	Перевищення прототипу, %
Після формування моделі					
	100	2,5±0,20	2,5	-	
12 доба експерименту					
Контроль	100	1,8±0,15	1,8		
ФТ	83	1,0±0,24	0,8	42,86	
ФКК	33	0,3±0,19	0,1	92,86	70

Таблиця 4

Біохімічні показники крові експериментальних щурів після введення низькомолекулярної фракції кордової крові та крові телят на моделі аспіринової виразки шлунка

	Активність ЛФ, О/л	Перевищення прототипу, %	Вміст ТБКАП, мкмоль/л	Перевищення прототипу, %
Норма	350,4±5,0		19,7±0,9	
Контроль	489,5±11,0		27,9±0,7	
ФКК	390,2±9,8	12,9	23,4±0,4	6,4
ФТ	448,2±3,2		25,0±0,2	

Таблиця 5

Цукрознижуюча активність низькомолекулярної фракції кордової крові та крові телят за тестом на толерантність до глюкози

	Рівень глюкози, ммоль/л	Перевищення прототипу, %
Норма	3,94±0,23	
Контроль	10,09±0,27	
ФТ	7,54±0,43	
ФКК	6,34±0,38	15,9

5

Джерела інформації.

1. Пат. 35631, Україна. МПК А61К 35/48, А61К 35/54, А61К 38/02, 2001. Спосіб виготовлення біологічно активних препаратів з ембріональних тканин.

2. Заявка 06/495956 США. МПК А61К 35/14, В01Д 61/14, В01Д 61/58, В01Д 13/00, 1986.

10 Процес виробництва агентів, стимулюючих клітки.

3. Хакимов З.З., Наджимутдинов К.Н., Мавлянов І.Р. Фармакодинамика лекарственных веществ, метаболизирующихся в печени, при ожоговой травме у крыс // Фармакология и токсикология. - 1985. - № 2. - С. 103-106.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод, рекомендації / [За ред. О.В. Стефанова]. - К.: Авіценна, 2001. - С. 325-326, 396-408.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб отримання низькомолекулярної фракції із кордової крові великої рогатої худоби, що включає дефібринування та гемоліз крові з наступною ультрафільтрацією, який **відрізняється** тим, що дефібринування проводять після гемолізу шляхом інкубації крові при 50 °С протягом 50 хв., гемоліз здійснюють шляхом заморожування крові до -80 °С, а перед ультрафільтрацією

10

додатково проводять передфільтрацію.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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