



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105593** (13) **C2**  
(51) МПК (2014.01)  
**A61K 36/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2013 06572</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>27.05.2013</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>26.05.2014</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: <b>25.11.2013, Бюл.№ 22</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.05.2014, Бюл.№ 10</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Тернинко Інна Іванівна (UA), Немятих Оксана Дмитрівна (UA), Онищенко Уляна Євгенівна (UA), Лазарчук Оксана Олександрівна (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>Тернинко Інна Іванівна,</b> вул. Українська, 9/32, м. Луганськ, 91000 (UA), <b>Немятих Оксана Дмитрівна,</b> кв. Ленінського комсомолу, 8/50, м. Луганськ, 91006 (UA), <b>Онищенко Уляна Євгенівна,</b> вул. 15-А лінія, 23/12, м. Луганськ, 91016 (UA), <b>Лазарчук Оксана Олександрівна,</b> пров. Шкільний, 2/1, м. Червонопартизанськ, Луганська обл., 94830 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Wang Zhen-yu. Impact of anthocyanin from <i>Malva sylvestris</i> on plasma lipids and free radical. Journal of Forestry Research 08/2005; 16(3):228-232. US 20060233898 A1, 19.10.2006. FR 2814070 A1, 22.03.2002. US 20100040707 A1, 18.02.2010 . US 20060088615 A1, 27.04.2006. KR 20070095657 A, 01.10.2007. KR 20110016536 A, 18.02.2011.</p>
--	---

## (54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ З АНТИОКСИДАНТНОЮ ДІЄЮ, СТВОРЕНИЙ НА ОСНОВІ ЛИСТЯ MALVA SYLVESTRIS

### (57) Реферат:

Винахід належить до медицини та хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема до одержання лікарського засобу з антиоксидантною дією, що є густим екстрактом з листя мальви лісової - *Folia Malva sylvestris*, зібраного у фазі до цвітіння рослини, який отримують шляхом екстрагування сировини 40 % етанолом при співвідношенні сировина:екстракт 1:10 протягом 12 год. при кімнатній температурі з подальшим упарюванням одержаного сумарного екстракту та сушінням.

UA 105593 C2



Винахід належить до медицини та хіміко-фармацевтичної промисловості. Зокрема, до створення, виробництва та використання лікувально-профілактичних засобів на основі лікарської рослинної сировини (ЛРС).

Враховуючи той факт, що одну з центральних ланок ґенезу численних патологічних станів відіграє ініціація процесів генерації вільних радикалів з подальшою інтенсифікацією перекисного окиснення фосфоліпідів біомембран і пригніченням механізмів антиоксидантного захисту, створення лікарських засобів (ЛЗ), що мають здатність коригувати окисно-відновний гомеостаз, а також враховують особливості будови, функціонування та регуляції органів і систем, сьогодні представляється обґрунтованим та вельми перспективним.

В площині даних міркувань особливий інтерес представляють препарати рослинного походження, які вигідно відрізняються від синтетичних аналогів біологічною спорідненістю до клітин організму та м'якою дією.

Багаторічний досвід вивчення лікарських рослин показав, що препарати, розроблені на їх основі проявляють виражені лікувальні властивості на фоні низької токсичності, а багатовекторність складу забезпечує реалізацію широкого спектра фармакологічних ефектів рослинних препаратів. У зв'язку з цим, пошук ЛРС, що має достатню сировинну базу в Україні, залишається актуальним завданням для вітчизняної фармації.

На сьогодні досить перспективною лікарською рослиною є мальва лісова (*Malva sylvestris* L.) - рослина з родини Мальвових (Malvaceae). Вона відома своїми відхаркувальними, ранозагоювальними, протизапальними, діуретичними, обволікаючими та ін. властивостями [14, 15, 17]. Ця рослина привертає увагу фітохіміків та фітотерапевтів як перспективне джерело для створення нових ЛЗ, що підтверджується наявністю на фармацевтичному ринку України імпортованих ЛЗ, зокрема, «Бронхіаліс-плюс», до складу якого входить рідкий екстракт листя мальви лісової, «Гербіон сироп подорожника», що містить водний екстракт квіток мальви, а також «Ангінал», до складу якого входить сухий екстракт квіток мальви лісової.

Попередніми дослідженнями нами встановлено, що листя мальви лісової вміщують у собі різні групи біологічно-активних речовин (БАР) полівалентної дії (таблиця 1).

Існує достатня кількість ЛЗ з антиоксидантною дією [5-8, 10], але до причин, що перешкоджають у прототипі та аналогах одержання бажаного результату, якого досягають в заявленому засобі, слід віднести те, що більшість з них містять етиловий спирт, що заздалегідь обмежує їх використання, зокрема в педіатричній та геронтологічній практиці.

Задача винаходу - експериментально дослідити та довести антиоксидантну активність густого екстракту з листя мальви лісової з метою подальшого використання як засобу з антиоксидантною дією.

Поставлена задача вирішується тим, що в засобі, який пропонується використовувється густий екстракт з листя мальви лісової, отриманий шляхом двократної екстракції рослинної сировини, зібраної у фазі до цвітіння рослини, 40 % етанолом при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 12 годин при кімнатній температурі з подальшим відгоном екстрагенту, упарюванням одержаного сумарного екстракту та сушінням. Дані параметри були визначені експериментально і забезпечують терапевтичну ефективність лікарського засобу [9].

Як референтний препарат було вибрано кверцетин виробництва ЗАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (№ реєстрації UA/0119/01/01 від 27.11.2008 до 27.11.2013). Дозу для тварин розраховували за методом Ю.П. Риболовлева і співавт. з використанням коефіцієнтів видової стійкості, виходячи з добової дози препарату для людини [11].

Досліди *in vivo* проводили на безпородних статевозрілих щурах обох статей масою 180-200 г відповідно до методичних рекомендацій, затверджених ДФЦ МОЗ України, а також інструктивно-методичних матеріалів в рамках норм GLP з дотриманням правил роботи з лабораторними тваринами згідно вимог «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» [16, 19, 20].

Експериментальною моделлю було вибрано патологічний процес, що розвивається у тварин на тлі підгострого токсичного гепатиту внаслідок ушкодження паренхіми печінки при комбінованому введенні тетрахлорметану та етанолу [2].

Тварин було поділено на шість груп. Першу склали інтактні групи, другу - контрольні, яким вводили гепатотоксини протягом 4 діб за наступною схемою: 50 % олійний розчин тетрахлорметану підшкірно в дозі 0,4 мл/100 г маси; через три години - внутрішньошлунково 40 % етанол в дозі 1,3 мл/100 г маси. Тваринам 3,4,5 груп (дослідні) за 1 годину до потрапляння гепатотоксичних отрут протягом всього періоду формування підгострого ураження печінки та через 24 години з моменту закінчення моделювання патології, внутрішньошлунково протягом 3 діб вводили густий екстракт з листя мальви у дозі 5 мг/100 г, 10 мг/100 г та 20 мг/100 г

відповідно. Референта група тварин отримувала кверцетин у дозі 10 мг/100 г за аналогічною схемою.

Стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги визначали через 4 доби у сироватці крові з моменту останнього введення гепатотоксинів. Інтенсивність протікання перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) визначали за вмістом первинних та кінцевих продуктів - дієнових кон'югатів (ДК) та ТБК - реактантів відповідно [12, 13].

Про стан антиоксидантної системи судили за активністю основних компонентів ферментативної ланки - каталази [3] та глутатіону відновленого [18].

Ступінь забезпеченості організму тварин ендогенними антиоксидантами у досліджуваних умовах експерименту аналізували за показником стану перекисної резистентності еритроцитів (ПРЕ) [4].

Результати дослідження статистично оброблені (ДФУ, стаття «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» розділ 4 «Метрологічна характеристика середнього результату») [1].

Отримані результати вказують, що в модельованих умовах експерименту відмічається різка активація процесів утворення та накопичення продуктів ліпопероксидації, що проявляється у зростанні вмісту ДК та ТБК-реактантів (таблиця 2). Як видно з таблиці, в контрольній групі тварин рівень первинних продуктів ліпідпереокичення, що мають у своїй структурі подвійні ненасичені зв'язки, різко (на 33 %) підвищується в порівнянні з інтактною серією тварин, в той час як у референтній та дослідних групах величина даного показника вірогідно нижче значень, отриманих у контрольних щурів. Звертає на себе увагу та обставина, що в крові на фоні введення референтного та дослідного препаратів рівень ДК навіть дещо нижче подібного в інтактній серії.

Відносно динаміки накопичення ТБК-реактантів у експериментальних тварин також відмічається подібна динаміка: порівняно високий рівень в контрольній групі на фоні істотного зменшення значень рівня кінцевих продуктів ПОЛ в референтній та дослідних серіях, що вказує на виражену здатність досліджуваного засобу попереджати накопичення первинних та кінцевих продуктів ПОЛ.

Результати щодо вивчення стану прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в площині рівня та активності основних компонентів антиоксидантної системи представлені в таблиці 3.

Отримані експериментальні дані свідчать, що в контрольній групі тварин спостерігається достовірне зниження активності каталази ( $p < 0,01$ ) у сироватці крові порівняно з інтактними тваринами. Введення ж досліджуваного засобу реалізується збереженням активності ферменту на рівні референтного лікарського засобу, що проявляється зростанням величини показника в дослідних серіях на 59-64 %.

Дослідження впливу досліджуваного засобу на рівень основного компоненту неферментативної ланки антиоксидантної системи - глутатіону відновленого дозволяє стверджувати про здатність густого екстракту коригувати вміст глутатіону в бік збільшення рівня останнього у дослідних тварин за досліджуваних умов експерименту.

Вивчення ПРЕ, як інтегрального показника прооксидантно-антиоксидантної рівноваги на фоні досліджуваної патології вказує на різке (більш, ніж у 3 рази) збільшення відсотку гемолізованих еритроцитів в контрольній серії, що в свою чергу, свідчить про зниження стійкості мембран на фоні накопичення продуктів ліпопереокичення в сироватці крові.

Як видно з таблиці 4, введення досліджуваного густого екстракту проявляється істотним (понад 60 %) пригнічення гемолізу в дослідних групах тварин порівняно до контролю, що вказує на забезпеченість організму ендогенними антиоксидантами на рівні інтактних щурів.

Переваги запропонованого засобу:

1. Доступність сировини, що зумовлена достатньою сировинною базою мальви лісової в Україні.

2. Комплекс БАР, зокрема, фенольні сполуки, амінокислоти, органічні та жирні кислоти, полісахариди, макро- та мікроелементи, леткі сполуки та ін., що забезпечує полівалентну дію.

3. Можливість виробництва ЛЗ, що буде доступним за ціною для усіх категорій населення.

4. Виражена антиоксидантна активність на фоні прийнятного профілю безпечності застосування у пацієнтів усіх вікових груп.

Висновки:

1. Результати комплексних досліджень *in vivo* свідчать про виражену здатність густого екстракту з листя мальви лісової зменшувати інтенсивність процесів ПОЛ, що реалізується попередженням накопичення первинних та кінцевих продуктів ліпідпереокичення.

2. Антиоксидантні властивості густого екстракту обумовлені також впливом на основні компоненти антиоксидантної системи, а саме: активність каталази на рівень глутатіону відновленого.

Таблиця 1

Хімічний склад листя мальви лісової

Флавоноїди, %	Кумарини, %	Полісахариди, %	Жирні кислоти, %	Органічні кислоти, %	Амінокислоти, %	Поліфенольні сполуки, %	Гідроксикоричні кислоти, %	Леткі сполуки, %	Вміст К, мг/100 г	Вміст Са, мг/100 г	Вміст Mg, мг/100 г	Каротиноїди, мг/г	Хлорофіли, мг/г
2,97	0,06	15,48	59,34	4,43	16,00	8,50	2,13	0,17	5010,00	1435,00	500,00	12,34	20,71

5

Таблиця 2

Вплив екстракту мальви лісової на динаміку накопичення продуктів ПОЛ сироватці крові тварин (n = 6)

Група тварин	Статистичний показник	ДК (ммоль/л)	ТБК-реактанти (нмоль/л)
Інтактна	$M \pm m$	$0,92 \pm 0,04$	$99,78 \pm 11,51$
Контрольна патологія	$M \pm m$ $p_1$	$1,22 \pm 0,005$ <0,001	$170,51 \pm 3,49$ <0,01
Дослідна (5 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$1,02 \pm 0,08$ <0,05	$94,23 \pm 8,73$ <0,001
Дослідна (10 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$0,99 \pm 0,07$ <0,05	$94,65 \pm 9,12$ <0,001
Дослідна (20 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$0,80 \pm 0,03$ < 0,001	$98,72 \pm 3,55$ <0,001
Референтна (кверцетин - 10 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$0,84 \pm 0,07$ <0,01	$113,67 \pm 6,63$ <0,001

Примітка;  $p_1$  - дано у порівнянні з інтактною групою;  $p_2$  - дано у порівнянні з контрольною патологією;

Таблиця 3

Вплив екстракту мальви лісової на динаміку активності та рівня основних компонентів антиоксидантної системи у сироватці крові тварин (n = 6)

Група тварин	Статистичний показник	Каталаза (кат/л)	Глутатіон (мкмоль/л)
Інтактна	$M \pm m$	$77,70 \pm 6,03$	$48,00 \pm 5,53$
Контрольна патологія	$M \pm m$ $p_1$	$46,84 \pm 4,41$ <0,01	$9,33 \pm 1,31$ <0,001
Дослідна (5 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$75,70 \pm 4,05$ <0,01	$48,70 \pm 3,48$ <0,001
Дослідна (10 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$74,37 \pm 5,78$ <0,01	$49,30 \pm 5,56$ <0,001
Дослідна (20 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$76,81 \pm 5,19$ <0,01	$46,40 \pm 1,74$ <0,001
Референтна (кверцетин - 10 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$73,48 \pm 3,06$ <0,01	$48,40 \pm 2,84$ <0,001

Примітка:  $p_1$  - дано у порівнянні з інтактною групою;  $p_2$  - дано у порівнянні з контрольною патологією

Таблиця 4

Вплив екстракту мальви лісової на перекисну резистентність мембран еритроцитів у тварин (n = 6)

Група тварин	Статистичний показник	ПРЕ (% гемолізу)
Інтактна	$M \pm m$	$17,37 \pm 1,15$
Контрольна патологія	$M \pm m$ $P_1$	$55,31 \pm 2,89$ <0,001
Дослідна (5 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$20,93 \pm 1,29$ <0,001
Дослідна (10 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$20,46 \pm 3,27$ <0,001
Дослідна (20 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$19,82 \pm 2,02$ <0,001
Референтна (кверцетин - 10 мг/100 г)	$M \pm m$ $p_2$	$20,90 \pm 1,58$ <0,001

Примітка:  $p_1$  - дано у порівнянні з інтактною групою;  $p_2$  - дано у порівнянні з контрольною патологією

#### Література:

1. Державна фармакопея України / Держане підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІПЕГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. член-кор. АМН України Стефанова О.В. - К.: Видавничий дім «Авіцена», 2001. - 528 с.
3. Корольок М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Корольок, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 16-18.
4. Методы исследования в профпатологии / Под ред. О.Г. Архиповой. - М.: Медицина, 1988. - 208 с.
5. Патент № 4656, Україна, МПК А61К 36/28. Застосування настоянки арніки гірської як засобу оксидантно - антиоксидантного гомеостазу / Мецищен І.Ф., Яремій І.М. заявник і патентовласник Буковинська державна медична академія МОЗ України. - № 20040705684; заявл. 12.07.2004, опубл. 17.01.2005, Бюл. № 1.
6. Патент № 4655, Україна, МПК А61К 36/882. Застосування настойки перстачу прямостоячого як антиоксидантного засобу / Мецищен І.Ф., Тефтьєва Н.Б., Яремій І.М. заявник і патентовласник Буковинська державна медична академія МОЗ України. - № 20040705650; заявл. 12.07.2004, опубл. 17.01.2005, Бюл. № 1.
7. Патент № 69017А, Україна, МПК А61К 36/41. Застосування екстракту родіоли рідкого як антиоксидантного засобу / Давидова Н.В., Мецищен І.Ф., Григор'єва Н.П. та ін. заявник та патентовласник Буковинська державна медична академія МОЗ України. - № 20031110697; заявл. 26.11.2003, опубл. 16.08.2004, Бюл. № 8.
8. Патент № 85291, Україна, МПК А61К 36/35. Лікувально-профілактичний засіб гепатопротекторної, протизапальної та антиоксидантної дії / Кабанов В.О., Вельма В.В., Миткова О.Ю. та ін. заявник та патентовласник НФаУ. - № u200704412: заявл. 20.04.2007, опубл. 12.01.2009, Бюл. № 1.
9. Патент № 78784, Україна, МПК А61К 36/00. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією із листя мальви лісової / Тернинко І.І., Онищенко У.Є., Бурцева О.В. заявник та патентовласник ДЗ «ЛугДМУ» - № u201213234: заявл. 20.11.2012, опубл. 25.03.2013, Бюл. № 6.
10. Патент № 41772, Україна, МПК А61К 36/736. Спосіб одержання засобу з протизапальною та антиоксидантною дією / Кисличенко В.С., Упир Л.В., Пузак О.А. та ін. заявник та патентоволодар НФаУ. - № u200814477: заявл. 15.12.2008, опубл. 10.06.2009, Бюл. № 11.
11. Рыболовлев Ю.П. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю.П. Рыболовлева, Р.С. Рыболовлев // Доклады АН СССР. - 1979. - Т. 247. - Т. 6. - 1513-1516.
12. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот / И.Д. Стальная, Г.Г. Гаршвили // Современные методы в биохимии: Под ред. Ореховича В.И. - М.: Медицина, 1977. - С. 64-65.

13. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Г.Г. Гаршвили // Современные методы в биохимии: Под ред. Ореховича В.И., - М.: Медицина, 1977. - С. 57-59.
14. Тернинко І.І. Актуальність фармакогностичного вивчення мальви лісової як перспективного джерела нових лікарських засобів /І.І. Тернинко, У.Є. Онищенко// Український журнал клінічної та лабораторної медицини. - 2011. - Т. 6. - № 1. - С. 37-41
15. Abdollah Ghasemi. Wound Healing Activity of Extracts of *Malva sylvestris* and *Stachys lavandulifolia* /Abdollah Ghasemi, Pirbalouti, Abed Koohpyeh // International Journal of Biology. - 2011. - Vol.3. - N.1. - p. 174-179.
16. Adapting to technical progress the Principles of Good Laboratory Practice as specified in Council Directive 87/18/EEC on the harmonization of laws, regulations and administrative provisions relations relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances. Commission Directive 1999/11/ES // Official Journal of the European Communities. - 1999. - Vol. 77. - P. 8-21.
17. Patricia Fontes ESTEVES. Antinociceptive Activity of *Malva sylvestris* L. / Patricia Fontes ESTEVES, Alice SATO, Maria A. ESQUIBEL [etc.] // Latin American Journal of Pharmacy. - 2009. - N. 28(3). - p. - 454-456.
18. Sedluck J. Estimation of total proteinsound and nonpro-teine sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent / J. Sedluck, H. Lindsay // Analyt. Biochem. - 1969. - Vol. 25. - P. 192-205.
19. Stiles T. The revised OESD principles of Good Laboratory Practice: a reflection upon the impact of the proposed changes on pre-clinical safety testing. Part 1. Scope, definition of terms, responsibilities / T. Stiles // Quality Assurance J. - 1997. - Vol. 2. - P. 13-18.
20. Stiles T. The revised OESD principles of Good Laboratory Practice: a reflection upon the impact of the proposed changes on pre-clinical safety testing. Part 2. Scope, definition of terms, responsibilities / T. Stiles // Quality Assurance J. - 1997. - Vol. 2. - P. 49-53.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- Лікарський засіб з антиоксидантною дією, який **відрізняється** тим, що є густим екстрактом з листя мальви лісової - *Folia Malva sylvestris*, зібраного у фазі до цвітіння рослини, який отримують шляхом екстрагування сировини 40 % етанолом при співвідношенні сировина:екстракт 1:10 протягом 12 год. при кімнатній температурі з подальшим упарюванням одержаного сумарного екстракту та сушінням.

---

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