



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **50190** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 36/185
A61K 35/66
A61P 31/00
A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО ЗАСОБУ З ІМУНОМОДУЛЮЮЧОЮ ДІЄЮ, АКТИВНОГО У ВІДНОШЕННІ ВІРУСУ ГРИПУ

1

2

(21) u200913077

(22) 15.12.2009

(24) 25.05.2010

(46) 25.05.2010, Бюл.№ 10, 2010 р.

(72) ІЩЕНКО МАРИНА ВОЛОДИМИРІВНА, СЯТИ-
НЯ МИХАЙЛО ЛУКОВИЧ

(73) ІЩЕНКО МАРИНА ВОЛОДИМИРІВНА, СЯТИ-
НЯ МИХАЙЛО ЛУКОВИЧ

(57) 1. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з імуномодулюючою дією, активного у відношенні вірусу грипу, який включає постадійну екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини липового дерева екстрагентом у вигляді водно-спиртового розчину, який **відрізняється** тим, що екстракцію діючих речовин екстрагентом здійснюють з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи у масовому співвідношенні до екстрагенту 1:10, при цьому як екстрагент на кожній стадії екстракції застосовують водний розчин спирту етилового однієї і тієї ж концентрації з об'ємною частиною спирту етилового 50 %, крім того кожну стадію екстракції здійснюють протягом 85-95 хвилин при температурі 90 °С і одержані на кожній стадії екстракції витяжки діючих речовин з квіток липи об'єднують, після чого об'єднаний об'єм витяжок діючих речовин з квіток липи фільтрують.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кінцевий продукт виготовляють у вигляді водно-спиртової настойки квіток липи.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що екстракцію водним спиртовим розчином діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи здійснюють не менш, ніж в три стадії.

4. Спосіб за п. 1 або за п. 2, який **відрізняється** тим, що екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді квіток липи серцелистої.

5. Спосіб за п. 1 або за п. 2, який **відрізняється** тим, що екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді квіток липи широколистої.

6. Спосіб за п. 1 або за п. 2, який **відрізняється** тим, що екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді суміші квіток липи серцелистої та квіток липи широколистої у масовому співвідношенні між ними від 1 : 1 до 1 : 5 відповідно.

.

Корисна модель відноситься до фармації та медицини, а саме до способу одержання лікувально-профілактичного засобу рослинного походження з імуномодулюючою дією, активного у відношенні вірусу грипу, при цьому таким способом одержують готовий продукт у формі водно-спиртової настойки.

Важливе місце у сучасній комплексній терапії широкого переліку захворювань посідають імунокоректори - препарати, які нормалізують діяльність дисфункціонуючої імунної системи в цілому або окремих її компонентів.

Імуномодулятори діють лише на змінений імунітет, знижуючи підвищенні та підвищуючи знижені показники імунної системи.

Актуальними є також протигрипозні засоби. Постійне оновлення їх арсеналу є важливим з огляду на появу внаслідок мутацій нових штамів вірусу грипу.

Звичайно для одержання імуномодулюючого та протигрипозного ефекту призначають декілька засобів, що, як правило, супроводжується сумациєю їх негативної дії на організм. Перелік засобів, що проявляють комплексну

(13) **U**

(11) **50190**

(19) **UA**

імуномодельючу та протигрипозну активність, вкрай обмежений і представлений переважно препаратами синтетичного походження з небажаною побічною дією.

Тому перспективним є створення технологій одержання засобів рослинного походження з підвищеною комплексною імуномодельючою та протигрипозною дією, які є практично нетоксичними, не мають негативних побічних ефектів не викликають звикання, придатні до тривалого вживання.

Відомий спосіб одержання екстрактивних речовин, який передбачає екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини липового дерева екстрагентом у вигляді водно - спиртового розчину (Патент Російської Федерації № 2213570, м.кл. А61К 35/78, А61Р 1/16, публ.10.10.2003, бюл. № 10 [1]). Однак такий спосіб достатньо складний для промислової реалізації, він передбачає значну кількість технологічних дій, в тому числі попередню екстракцію водою, крім того як вихідну рослинну сировину застосовують листя липи, що не дозволяє одержати засіб, який би мав підвищену імуномодельючу дію, протигрипозну активність, був гарантовано нетоксичним, не мав протипоказань та негативних побічних ефектів.

Найбільш близьким до запропонованого способу є спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з імуномодельючою дією у відношенні вірусу грипу, який передбачає постадійну екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини липового дерева екстрагентом у вигляді водно - спиртового розчину (Деклараційний патент України на корисну модель "Спосіб комплексної переробки суцвіть липи" № 36485, м. кл. А61К 36/73, публ. 27.10.2008, бюл. № 20 [2]). Цей спосіб є сучасною розробкою, але він складний за технологією і не дозволяє одержати засіб, який би мав підвищену імуномодельючу дію, протигрипозну активність, був гарантовано нетоксичним, не мав протипоказань та негативних побічних ефектів.

Жоден з одержаних за відомим способом комплексів не визначений, як такий, що має виражену імуномодельючу дію або активний у відношенні вірусу грипу. Крім того, фенольний комплекс одержують у вигляді сухого екстракту, який може розглядатися як біологічно активна субстанція, але не може бути використаний безпосередньо як лікарський засіб, а склад біологічно активних речовин фенольного комплексу, одержаного спиртового екстракту зі шроту, суттєво відрізняється від екстракту, одержаного відповідно до запропонованого способу з цільної сировини - квіток липи.

Завданням корисної моделі є створення удосконаленого способу одержання лікувально-профілактичного засобу з імуномодельючою дією, активного у відношенні вірусу грипу, який би за рахунок нової сукупності дій, технологічних параметрів, кількісних характеристик процесу, дозволив одержати лікувально-профілактичний засіб з підвищеною імуномодельючою дією, активний у відношенні вірусу грипу та гарантовано нетоксичний. не мав протипоказань та негативних

побічних ефектів; крім того запропонований спосіб дозволив би поширити асортимент технологій одержання фармацевтичної продукції спрямованого характеру дії, що особливо важливо в період епідемії грипу.

Поставлене завдання вирішується тим, що спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з імуномодельючою дією, активного у відношенні вірусу грипу передбачає постадійну екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини липового дерева екстрагентом у вигляді водно - спиртового розчину. Згідно корисної моделі, екстракцію діючих речовин екстрагентом здійснюють з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи у масовому співвідношенні до екстрагенту 1 : 10, при цьому як екстрагент на кожній стадії екстракції застосовують водний розчин спирту етилового однієї і тієї ж концентрації з об'ємною частиною спирту етилового 50 %, крім того кожну стадію екстракції здійснюють на протязі 85-95 хвилин при температурі 90 °С, і одержані на кожній стадії екстракції витяги діючих речовин з квіток липи об'єднують, після чого об'єднаний об'єм витягів діючих речовин з квіток липи фільтрують.

Для уточнення, для окремих, особливих умов, випадків виконання запропонований спосіб додатково характеризується наступними ознаками.

Кінцевий продукт виготовляють у вигляді водно-спиртової настоянки квіток липи.

Екстракцію водним спиртовим розчином діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи здійснюють не менш ніж в 3 (три) стадії.

Екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді квіток липи серцелистої.

Екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді квіток липи широколистої.

Екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді суміші квіток липи серцелистої та квіток липи широколистої у масовому співвідношенні між ними від 1 : 1 до 1 : 5.

Сукупність усіх ознак запропонованого способу, в тому числі його нові ознаки дозволяють досягти технічного результату - одержати засіб, який має підвищену імуномодельючу дію та протигрипозну дію, є гарантовано нетоксичним, не має протипоказань та негативних побічних ефектів, крім того - дозволяє поширити асортимент технологій фармацевтичної продукції спрямованого характеру дії, що особливо важливо для застосування в період епідемії грипу.

За рахунок нових ознак, а саме екстракції діючих речовин екстрагентом з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи у масовому співвідношенні до екстрагенту 1 : 10, застосування як екстрагенту на кожній стадії екстракції

водяного розчину спирту етилового однієї і тієї ж концентрації з об'ємною частиною спирту етилового 50 %, здійснення кожної стадії екстракції на протязі 85-95 хвилин при температурі 90 °С, об'єднання одержаних на кожній стадії екстракції витягів діючих речовин з квітів липи наступної фільтрації об'єднаного об'єму витягів дозволяє одержати засіб, який має підвищену імуномодельючу дію та протигрипозну дію, є гарантовано нетоксичним, не має протипоказань та негативних побічних ефектів, а також поширити асортимент технологій фармацевтичної продукції спрямованого характеру дії.

Технічний результат посилюється завдяки наступним додатковим ознакам, які уточнюють його основні ознаки, характеризують запропонований спосіб для окремих умов його застосування..

Виготовлення кінцевого продукту у вигляді у вигляді водно-спиртової настоянки квіток липи дозволяє забезпечити зручність у його застосуванні.

Екстракція водним спиртовим розчином діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи не менш ніж в 3 (три) стадії гарантує повноту вилучення діючих речовин.

Одержання відповідно до запропонованого способу засобу з необхідною кількістю екстрагованих з квіток липи діючих речовин, завдяки виготовленню з вихідної лікарської сировини, а саме - з квіток липи та з водного розчину спирту етилового, взятих у масовому співвідношенні між ними 1:10 відповідно дозволяє максимально підвищити достовірну імуномодельючу дію одержаного засобу, його активність у відношенні вірусу грипу.

Застосування як екстракту з рослинної лікарської сировини діючих речовин, які екстраговані з квіток липи серцелистої або з квіток липи широколистої, або з їх суміші дозволяє поширити та варіювати у діапазоні підвищення спрямованої дії одержаного засобу.

Саме запропоновані величини кількісних характеристик запропонованого способу відповідно до формули корисної моделі дозволяють досягти технічного результату при застосуванні запропонованого засобу, одержаного запропонованим способом: за межами таких значень технічний результат не досягається, при цьому запропоновані величини кількісних характеристик способу повинні відповідати правилам, встановленим для фармацевтичних засобів. Всі параметри заявленого способу підтверджені результатами проведених досліджень.

Промислова здатність запропонованого способу характеризується наступними прикладами.

Приклад 1.

Відповідно до формули корисної моделі запропонований спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з імуномодулюючою дією, активного у відношенні вірусу грипу здійснюють наступним чином.

Постадійну екстракцію діючих речовин екстрагентом здійснюють з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи у масовому співвідношенні до екстрагенту 1 : 10. Як екстрагент на кожній стадії екстракції застосовують водний розчин

спирту етилового однієї і тієї ж концентрації з об'ємною частиною спирту етилового 50 %.. Кожну стадію екстракції здійснюють на протязі 90 хвилин при температурі 90°С, а одержані на кожній стадії екстракції витяги діючих речовин з квіток липи об'єднують, після чого об'єднаний об'єм витягів діючих речовин з квіток липи фільтрують.

Кінцевий продукт виготовляють у вигляді водно-спиртової настоянки квіток липи.

Екстракцію водним спиртовим розчином діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи здійснюють в 3 (три) стадії.

Екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді квіток липи серцелистої.

Запропонований спосіб здійснюють наступним чином. 5 кг подрібнених та просіяних крізь сито № 2800 квіток липи серцелистої - вихідної лікарської рослинної сировини завантажують в екстрактор, потім заливають екстрагент -39,2 л 50 % - ного водного розчину етилового спирту (з урахуванням коефіцієнту поглинання екстрагенту). Екстракцію здійснюють протягом 90 хвилин при температурі 90 °С. Одержаний екстракт зливають в окрему приймальну ємність. Після чого здійснюють ще дві послідовні екстракції; в екстрагусму рослинну лікарську сировину, з якої проведено перша екстракція, додають порціями по 16,7 л 50 % - ний для кожної наступної екстракції водний розчин спирту етилового. Отримані після другої та третьої екстракції екстракти в обсязі 47 д об'єднують, фільтрують, відстоюють, потім знов фільтрують. Загальне кількісне співвідношення вихідної лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи та водного розчину спирту етилового складає 1 : 10 відповідно.

Експериментальне доведено, що для вичерпної екстракції з сировини комплексу біологічно активних речовин із заданим спектром фармакологічної дії доцільно одну порцію сировини піддавати екстракції 3 рази новими порціями екстрагенту при запропонованому сумарному співвідношенні сировини до екстрагенту. Об'єднання одержаних екстрактів забезпечує збільшення кількісного виходу та якості готового продукту при зменшенні витрат вихідної сировини за рахунок її вичерпної екстракції.

Приклад 2. Здійснюють як приклад 1, але екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді квіток липи широколистої, а екстракцію на кожній стадії здійснюють протягом 85 хвилин.

Приклад 3. Здійснюють як приклад 1. але екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді суміші квіток серцелистої та квіток липи широколистої у масовому співвідношенні між ними 1 : 1, а екстракцію на кожній стадії здійснюють протягом 85 хвилин.

Приклад 4. Здійснюють як приклад 4, але екстракцію діючих речовин з лікарської рослинної сировини у вигляді квіток липи водним спиртовим розчином здійснюють з вихідної лікарської сировини у вигляді суміші квіток серцелистої та липи широколистої у масовому співвідношенні між ними 1:5.

Одержаний за прикладами 1, 2, 3, 4 кінцевий продукт є водно-спиртовою настоякою квіток липи серцелистої або липи широколистої, або їх суміші - темно коричнева рідина з приємним специфічним ніжним квітковим запахом і смаком. Готовий продукт містить, мас. %: екстраговані з квіток липи діючі речовини - 7,2 - 7,85. в тому числі суму окис-

лювальних фенолів не менше ніж 5,75 %; водний розчин спирту етилового з об'ємною частиною спирту етилового 50 % - решта.

Експериментальним шляхом як екстрагент було вибрано спирт етиловий в оптимальній концентрації за здатністю вичерпно екстрагувати біологічно активні речовини з квіток липи, крім того, він належить до найпоширеніших екстрагентів, які використовуються у фітохімічних виробництвах. Ефективність екстрагенту у різних концентраціях оцінювали за наступними критеріями: вміст екстрактивних речовин (ЕР) та сума окислювальних фенолів (СОФ). Дані експерименту наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика експериментальних даних, які характеризують оптимальний вибір екстрагенту, який застосовують відповідно до запропонованого способу

№ з/п	Вид екстрагенту	Вихід ЕР, %		Вихід СОФ, %	
		З квіток липи серцелистої	З квіток липи широколистої	З квіток липи серцелистої	З квіток липи широколистої
1	2	3	4	5	6
1	вода	30,10±1,64	21,01±0,92	2,18±0,10	1,86±0,12
2	10 % спирт етиловий	26,72±1,21	25,70±1,24	3,33±0,13	3,13±0,18
3	20 % спирт етиловий	26,63±1,28	26,25±1,20	3,64±0,17	3,31±0,19
4	30 % спирт етиловий	28,72±1,70	27,74±1,26	7,56±0,28	7,24±0,39
5	40 % спирт етиловий	29,91±1,32	33,86±1,60	7,47±0,31	7,61±0,40
6	50 % спирт етиловий	29,89±1,42	30,09±1,84	8,30±0,28	8,62±0,47
7	60 % спирт етиловий	29,92±1,25	30,00±1,70	8,10±0,30	8,46±0,49
8	70 % спирт етиловий	28,58±1,36	27,41±1,64	7,46±0,31	7,23±0,37
9	80 % спирт етиловий	27,73±1,18	31,12±1,46	5,83±0,29	6,10±0,35
10	96 % спирт етиловий	21,96±1,18	20,87±1,15	3,34±0,12	3,54±0,20

Примітка: 1) результати є середніми 5-х визначень;

2) графа "2" таблиці 1 - водний розчин спирту етилового з об'ємною частиною спирту етилового (%).

За даними таблиці 1 використання в якості екстрагенту спирту етилового 50 % концентрації найоптимальніше з точки зору вмісту як екстрактивних речовин, так і суми окислювальних фенолів.

Також експериментальним шляхом було визначено співвідношення "сировина-екстрагент" та оптимальний температурний режим екстракції. При цьому критерієм оцінки служили вихід екстрактивних речовин та суми окислювальних фенолів. Дані наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Вибір співвідношення сировина-екстрагент та оптимального температурного режиму екстракції

№ з/п	Співвідношення сировина-екстрагент	Темпера тура процесу	Вихід, %	
			ЕР	СОФ
1.	1:5	25 °C	16,40	4,35
2.	1:5	90 °C	17,73	5,55
3.	1:10	25 °C	21,79	4,36
4.	1:10	90 °C	23,71	7,55
5.	1:15	25 °C	20,43	5,25
6.	1:15	90 °C	25,76	7,75
7.	1:20	25 °C	21,02	3,99
8.	1:20	90 °C	27,93	7,53

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

Дані таблиці 2 свідчать, що оптимальним є співвідношення сировини до екстрагенту як 1:10. Зменшення співвідношення призводить до різкого зниження вмісту як екстрактивних речовин, так і суми окислювальних фенолів у настоянках, крім того погіршується процес екстракції до повного поглинання екстрагенту сировиною. Збільшення співвідношення економічно недоцільне внаслідок незначного збільшення вмісту речовин, що екстра-

гуються, при надмірних витратах екстрагенту. Оптимальним температурним режимом екстракції є нагрівання до 90 °С.

Вибір оптимального часового режиму екстракції було зроблено експериментальним шляхом. Вміст екстрактивних речовин та суми окислювальних фенолів у настоянках, одержаних при різному співвідношенні сировини до екстрагенту наведені у табл. 3.

Таблиця 3

Вибір оптимального часового режиму екстракції			
№ п/п	Температурний режим екстракції	Вихід, %	
		ЕР	СОФ
1	30 хвилин	22,95	5,56
2	60 хвилин	22,49	5,06
3	90 хвилин (85-95) ?	27,18	5,75
4	120 хвилин	23,71	7,55
5	180 хвилин	24,86	6,68

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

Як свідчать дані табл. 3 оптимальним часовим режимом є екстракція протягом 90(85-95)? хвилин. При зменшенні терміну екстракції вихід екстрактивних речовин та суми окислювальних фенолів менший, а збільшення терміну призводить до меншого вилучення екстрактивних речовин та додаткових затрат, що є недоцільним.

Приклад 5.

Активність засобу, одержаного відповідно до запропонованого способу, у відношенні вірусу грипу оцінювали за стандарними критеріями: визначали показники маси легенів дослідних тварин та кратність її наростання як показника інтенсивності грипозної пневмонії [3] та визначали титри вірусу у легенях заражених тварин у реакції РГА [4].

Результати дослідів наведені у табл. 4.

Таблиця 4

Вплив засобу, одержаного запропонованим способом, на перебіг грипозної інфекції у мишей лінії Balb/c на 7-му добу інфекційного процесу

Група тварин	Вага тварин, г	Маса легенів, мг	Питома маса легенів, $\times 10^{-3}$	Кратність наростання маси легенів	Стан легенів
Інтактний контроль	20,3 \pm 0,3	276,7 \pm 9,5	13,6 \pm 0,3	-	норма
Контроль інфікування	17,0 \pm 1,1*	385,7 \pm 17,3*	22,8 \pm 0,6*	1,7 \pm 0,05	зливні пневмонії
Настойка квіток липи	21,2 \pm 1,5	384,8 \pm 22,1*	18,2 \pm 0,6'1'/**	1,4 \pm 0,05**	дрібно вогнищеві пневмонії

Примітка:

*- $p < 0,05$ в порівнянні з інтактним контролем;

** - $p < 0,05$ в порівнянні з контролем інфікування.

У легенях інфікованих мишей контрольної групи спостерігали зливні пневмонії, індекс кратності наростання легенів склав 1,7. У групі мишей, що одержували настойку квіток липи виявлені загалом дрібновогнищеві пневмонії, індекс кратності наростання маси легенів - 1,4 ($p < 0,05$).

З літературних джерел відомо, що через 7 діб після інфікування вірус починає зникати з легенів, тому визначення його титрів проводили саме в цей період. Результати визначення титрів вірусу грипу A/PR₈/34 у легенях мишей Balb/c на 7 добу після інфікування представлено у таблиці 5.

Таблиця 5

Визначення титру вірусу грипу в легенях мишей Balb/c на 7 добу після інфікування

Група тварин	Кількість тварин, у яких виділено вірус в легенях	Титр вірусу грипу в легенях, Ig ₂
Контроль інфікування	4/4	2,0±0,4
Засіб, одержаний запропонованим способом - настойка квіток липи	0/4	0±0**

Примітка: ** - $p < 0,05$ в порівнянні з контролем інфікування.

Як видно з таблиці 5 на 7 добу інфекційного процесу вірус було виділено у 100 % (4/4) мишей контрольної групи, титр вірусу у легеневої тканині склав $2,0 \pm 0,4$. В групі мишей, що одержували настойку квіток липи вірусу грипу не виявлено.

Дані досліджу свідчать про достовірну активність настоек квіток липи у відношенні до вірусу грипу.

Приклад 6. Вплив настоек квіток липи на гуморальний імунітет вивчали у дослідках по визначенню титру антитіл до вірусу грипу (антигемаглютининів) у сироватці крові за допомогою стандартної реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) [4] та визначенню титрів гемолізину у сироватці крові дослідних тварин [5]. Наявність гемолізину визначали через 4 доби після введення еритроцитів барана у дозі 5×10^8 кл внутрішньочеревне одноразово в об'ємі 0,2 мл на тварину. Через 4 доби після імунізації у тварин збирали кров і готували сироватку. У подальшому сироватку дослідних мишей декомплементували шляхом нагрівання протягом 30 хвилин при 56°C . Після цього готували ряд послідовних розведень (1:10, 1:20, 1:40, 1:80 і т.д.) у пластикових панелях у об'ємі 0,2 мл, додавали 0,1 мл 1 % завису еритроцитів барана і протягом 30 хвилин інкубували при 37°C . До суміші додавали комплемент мурчака, який розводили фізіологічним розчином 1:10. Суміш перемішували і інкубували при 37°C протягом 1 години. Найбільше розведення сироватки, яке спричинило гемоліз еритроцитів, визначили як титр гемолізину.

Для виявлення кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці використали метод локального гемолізу у гелі (метод Ерне) [6]. Кількість АУК у селезінці визначали через 4 доби після введення тест-антигену (5×10^8 еритроцитів барана). Мишей забивали під ефірним наркозом, із селезінки готували суспензію клітин у розчині Хенкса (рН 7,0-7,2). 2 % агар розплавляли і додавали до нього однаковий об'єм двократного концентрату розчину Хенкса із феноловим червоним. Одну частину одержаного 1 % агару розливали по чашках Петрі (4-5 мл на чашку). До другої частини 1 % агару (розплавленому і охолоджену до 40°C) додавали еритроцити барана із розрахунку 1×10^8 кл/мл і 0,1 мл суспензії клітин селезінки ($0,5 \times 10^6$), перемішували і розливали по поверхні застиглому агару у чашках. Після інкубації протягом 1 години при 37°C до чашок додавали по 2 мл комплекменту мурчака у розведенні 1:5. Кількість макроскопічних зон гемолізу еритроцитів навколо окремих АУК визначали після 30-хвилинної інкубації при 37°C . Число продуцентів антитіл підраховували у розрахунку на 1×10^6 спленоцитів та на орган.

Вплив настоек квіток липи на гуморальну ланку імунітету визначали за здатністю спленоцитів селезінки мишей до формування антитілоутворюючих клітин до еритроцитів барана та величиною титрів гемаглютининів та гемолізину у сироватці крові. Дані досліджу наведені у таблиці 6.

Таблиця 6

Вплив засобу, одержаного запропонованим способом, на окремі показники гуморального імунітету мишей лінії Balb/c. Термін спостереження - 7 доба після інфікування			
Показники	Інтактний контроль	Після зараження вірусом грипу	
		Контроль полікований	Засіб, одержаний запропонованим способом - настойка квіток липи
Титри гемаглютининів, log ₂	3,32±0,41	5,32±0,41*	8,82±0,50**
Титри гемолізину, log ₂	11,57±0,48	5,82±0,29*	11,07±0,48/**
Кількість клітин селезінки, $\times 10^6$	191,2±8;3	48,2±3,3*	167,5±6,6/**
АУК селезінки на 10^6	112,0±2,6	87,2±2,6*	161,3±8,1/**
АУК селезінки на орган	21442,5±1176,8	4222,5±404,3*	27970,0±1745,7/**

Примітка:

* - $p < 0,05$ в порівнянні з інтактним контролем;**- $p < 0,05$ в порівнянні з контролем інфікування.

Як видно з таблиці 6 у нелікованих тварин на 7 добу після зараження вірусом грипу спостерігали практично повне пригнічення імунної відповіді на ксеногенні еритроцити. З літературних джерел відомо, що зменшення числа АУК є наслідком імунодепресивної дії вірусу грипу на клітини імунної системи, які приймають участь у формуванні первинної гуморальної відповіді, в результаті чого кількість клітин здатних вступати у бласттрансформаційні процеси різко знижені.

В цей же термін, у випадку вживання імунізованими тваринами настойки квіток липи спостерігали достовірне відновлення відповіді на еритроцити барана. У цих тварин зареєстровано підвищення АУК у 6,6 рази.

В зв'язку з тим, що при сублетальній інфекції через 7 діб вірус починає зникати, це співпадає з появою гуморальних антитіл. Тому було перевірено наявність титру гемаглютининів та гемолізів у сироватці крові дослідних тварин саме на цей термін спостереження. Як показали дослідження (табл. 6) у лікованих тварин зареєстровано збільшення титрів гемаглютининів на 65,7 % та гемолізів на 90,2 %, у порівнянні з інфікованими тваринами, які не вживали настойки квіток липи.

Проведені дослідження свідчать про імуномодельючу дію лікувально профілактичного засобу, одержаного запропонованим способом, а саме про його позитивний вплив на весь комплекс гуморальних; і клітинних реакцій протівірусного імунітету.

В результаті здійснення корисної моделі одержують лікувально-профілактичний засіб у формі настойки квіток липи і вираженою імуномодельючою дією, активний у відношенні вірусу грипу. Одержаний засіб практично нетоксичний, позбавлений алергенної дії. Він може бути застосований безпосередньо як лікувально-профілактичний засіб або як діюча речовина лікарських засобів у різних лікарських формах для

профілактики і лікування грипу -і а інших гострих респіраторних захворювань, що потребують зміцнення імунної системи.

Запропонований спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з імуномодельючою дією, активного у відношенні вірусу грипу і виконаного у формі настойки квіток липи є простим у виконанні, передбачає застосування екстрагенту, дозволено для використання у хіміко-фармацевтичному виробництві, екологічно

безпечний і може бути здійснений у промислових умовах з використанням стандартного обладнання. Запропонований спосіб дозволяє також поширити асортимент технологій одержання фармацевтичної продукції спрямованого характеру дії, що особливо важливо в періоди епідемій грипу.

Джерела інформації:

1. Патент Російської Федерації № 2213570, м.кл. А61К 35/78, А61Р 1/16, публ. 10.10.2003, бюл. № 10.

2. Деклараційний патент на корисну модель 36485, Україна, м.кл. А61К36/73 (2008.01), заявл.21.05.2008, опубл. 27.10.2008, Бюл. № 20 - ПРОТОТИП.

3. Савцова З.Д. Повышение эффективности противогриппозной вакцинации с помощью левamisола. / З.Д.Савцова, Э.В.Гюллинг, В.В.Павлишин // Вопросы вирусологии. 1984; 2: 248-250.

4. Практическая вирусология / Под ред. В.Н.Сюрина. // Москва: Колос, 1970: 352.

5. McGregor D.D. The antibody response of rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct / D.D.McGregor, J.L.Govans // J. Exp. Med. 1963.118(2); 303-320.

6. Певницкий Л.А. Исследование действия аналогов оснований нуклеиновых кислот на иммуногенез методом Эрне. / Л.А. Певницкий, В.В. Соловьев, Л.Н. Фонталин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1965. 9(8): 86-89.