



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60504 (13) A

(51) 7 A61K35/56

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) БІОПОЛІМЕР З ТКАНИН МОЛЮСКІВ, СПОСІБ ЙОГО ВИДІЛЕННЯ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

1

2

(21) 2002108573

(22) 29 10 2002

(24) 15 10 2003

(46) 15 10 2003, Бюл. № 10, 2003 р.

(72) Білутська Ольга Євгенівна, Овсянникова Та-
тяна Миколаївна, Губанова Аннемарі Глебівна,
Сапахова Неля Ільдусівна, Гудима Борис
Іполитович, Борисова Людмила Петрівна(73) ПІВДЕННИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ
ІНСТИТУТ МОРСЬКОГО РИБНОГО ГОСПОДАР-
СТВА ТА ОКЕАНОГРАФІЇ(57) 1 Біополімер з тканин молюсків, який містить
азотистий компонент, який відрізняється тим, що
біополімер характеризується масовою часткою (в
% на суху речовину) вуглеводів - 58,0-59,0,
мінеральних речовин - 2,1-2,9, азотистих речовин -5,1-5,5, ліпідів - 0,3-1,1, та має біологічну ак-
тивність антиоксидантну, цукрознижувальну, гепа-
топротекторну та тиреотропну2 Спосіб виділення біополімеру, що включає фе-
рментативний гідроліз сировини, очищення та
концентрування гідролізату, який відрізняється
тим, що як вихідну сировину використовують тка-
нини молюсків - мідії, рапани та ампулярії, гідроліз
здійснюють з використанням амілолітичних та про-
теолітичних ферментів, концентруванням гідролі-
заторів до 34,0-36,0 % вмісту сухих речовин, а ви-
ділення біополімеру - спиртоосадженням за
природними значеннями рН 6,4-6,6 та кінцевої
концентрації спирту в суміші, що обстежується,
73,0-75,0%

Винахід відноситься до біотехнології та може
бути використано для одержання препаратів, в т ч
біодобавок лікувального та профілактичного при-
значення з тканин молюсків, наприклад, мідій, ра-
пани та ампулярії

Відомо спосіб вилучення та обробки мукополі-
сахаридів (або глікозаміногліканів - за новою класи-
фікацією), глікопротеїнів (Гп) та супутніх рече-
вин [2] з тканин та органів тварин або людини,
бактеріальних клітин, рослин (в т ч морських во-
доростей) або рідин біологічного походження (на-
приклад, молочної сироватки)

Спосіб передбачає подрібнення об'єкта, що
досліджується, та обробку його в буферному вод-
ному рідкому середовищі при рН 7,5-8,5, темпера-
турі 15-80°C протягом 1-12 годин з подальшим
автоклавуванням при температурі 100-110°C про-
тягом 0,5-3 годин, сепарацією, фільтрацією та, за
необхідності, концентрацією екстрактів Для екст-
ракції використовують буферний розчин дезокси-
хоплату-натрію або трис (гідроксиметил) аміноета-
ну або N-трис (гідроксиметил) гліцидин

Одержані екстракти придатні для ліофільного
сушіння, а також для подальшого виділення з них
глікозаміногліканів та Гп Недолік способу полягає

в застосуванні для екстракції речовин, що не до-
пускаються до використання в харчових виробниц-
твах [3]

Зазначений спосіб можливо віднести до ана-
логу способу, що заявляється Найбільш близьким
до способу, що заявляється, можливо віднести
препарат з тканин морських гідробіонтів "Орбтар"
та спосіб його одержання [1] Препарат являє со-
бою білковий гідролізат з тканин молюсків, одер-
жаний шляхом кислотного гідролізу подрібненої
сировини при 100-110°C протягом 15-24 годин,
нейтралізацією гідролізату до рН 4,5-6,0 та по-
дальшою обробкою його не модульованим
фізичним полем протягом 1-30 хв Одержаний
препарат містить 25-30% сухих речовин, рН 4,5-6,0
та 0,8-1,0 % азоту аміногруп

Недолік способу полягає в жорстких умовах
кислотного гідролізу (100-110°C, 15-24 год), прак-
тично знешкоджуючих вуглеводний компонент,
властивий молюскам і, який більшою мірою визна-
чає біологічну активність препарату з молюсків

Для нас найбільший інтерес представляють
нативні сполуки білкових комплексів глікозаміног-
ліканів та Гп, що легко дисоціюють, які входять у
склад багатфункціональних біомолекул і склада-

(13) A

(11) 60504

(19) UA

ють предмет винаходу В основу винаходу покладено такі завдання

- поширити спектр об'єктів, що використовуються для виділення білкових комплексів глікозаміногліканів та глікопротеїнів (далі по тексті - біополімерів БП),

- забезпечити умови для виділення БП, що дозволяють зберегти їх специфічну біологічну активність,

- скоротити тривалість процесу гідролізу, знизивши при цьому витрати електроенергії та реактивів

Покладені завдання досягаються тим, що заявлений БП відрізняється специфічністю складу та містить вуглеводний компонент, азотисті та мінеральні речовини, а також ліпіди в визначених процентних співвідношеннях, він має специфічну біологічну активність, а спосіб одержання здійснюють таким чином, що як вихідну сировину використовують тканини молюсків - міді, рапани, ампулярі, які піддають специфічному м'якому короткотривалому ферментативному гідролізу з подальшим спиртоосадженням БП з гідролізатів з 34-36% вмістом сухих речовин та їх ліофілічним сушінням

Суттєві відмінні ознаки винаходу, що заявляється, полягають в

- використанні тканин міді, рапани та ампулярі як джерела

одержання БП,

- способі та умовах гідролізу сировини,

- особливостях умов виділення БП,

- складі виділеного БП,

- специфічній біологічній активності БП

Істотність умов виділення БП, що заявляється, обґрунтовується нижченаведеними прикладами

Приклад 1-26

Подрібнені молюски піддають ступінчастому гідролізу під впливом амілолітичних ферментів (α-амілаз) при гідромодулі 1:2, t 59-60°C, pH 5,4-5,6 протягом 40 хв, потім під впливом протеолітичних ферментів (протосубтиліну нейтрального) при 55-57°C, природних значеннях pH протягом ще 40 хв,

одержаний гідролізат очищують центрифугуванням (2000 об/хв, 10 хв), концентрують до

вмісту сухих речовин (СР) - 10,0-20,0-30, 40, 50, 60 та 65%

Кожний з одержаних гідролізатів поділяють на 4 аликвотні частини, до кожної з яких додають при перемішуванні етиловий спирт у співвідношенні гідролізат : спирт - 1:1, 1:1,5, 1:2,0, 1:3,0. Суміш витримують при кімнатній температурі та перемішуванні протягом 1 години, потім на холоді не менше 2 годин, після чого водно-спиртову суміш зливають декантацією. Масу, що залишилася, збезводнюють центрифугуванням, одержаний осад БП знов розчиняють у невеликій кількості води та знов пересаджують за вказаними вище умовами та спрямовують на ліофілічне сушіння

Результати прикладів наведено в таблицях 1 та 2

З даних табл. 1, 2 виходить, що максимальна маса БП, вилученого з гідролізатів з різноманітним вмістом СР, змінюється в межах (70,1-74,7)% та забезпечується (71,4-75,6)% концентрацією спирту в суміші гідролізат : спирт (приклади 4, 8, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 24). З даних цих же табл. 1 та 2 виходить, що визначальним моментом в процесі вилучення БП є не співвідношення гідролізат : спирт (1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3), а концентрація спирту в суміші гідролізат

: спирт. Наприклад, при значній обводненості вихідного гідролізату необхідна концентрація спирту (>70%) досягається в суміші при співвідношенні 1:3 (приклади 4, 8, 12), в міру того, як збільшується вміст СР в вихідному гідролізаті, ця ж концентрація спирту в суміші досягається співвідношенням гідролізат : спирт - 1:2 (приклади 11, 15, 19 та ін.) і навіть 1:0,1,5 (приклади 18, 22, 25)

Оптимальною концентрацією спирту в суміші гідролізат : спирт, що забезпечує максимальне вилучення БП, прийнято концентрацію спирту (73,0-75,0) %. Збільшення концентрації спирту в суміші > 75,0 % не є доцільним, тому що практично не впливає на масу комплексу, що виділяється, зменшення концентрації спирту < 73,0% також недоцільне через зниження маси комплексу, що виділяється

Таблиця 1

Дані з впливу маси СР гідролізату та використовованого співвідношення гідролізат : спирт на масу БП*, що виділяється, за природними значеннями pH 6,4-6,6

Приклади п/п	Вміст СР в гідролізаті, %	Співвідношення гідролізат : спирт			
		1:1	1:1,5	1:2	1:3
		Маса біополімеру (мБП), г $\frac{\text{спирт}}{\text{сухої речовини}}$			
1	2	3	4	5	6
1-4	10,1	^{1**} $\frac{16,10}{4,85}$	² $\frac{22,50}{5,75}$	³ $\frac{21,90}{6,57}$	⁴ $\frac{17,90}{7,21}$
5-8	20,3	⁵ $\frac{37,40}{10,07}$	⁶ $\frac{42,20}{12,58}$	⁷ $\frac{41,90}{13,48}$	⁸ $\frac{42,50}{14,98}$
9-12	30,5	⁹ $\frac{42,10}{17,31}$	¹⁰ $\frac{39,60}{19,38}$	¹¹ $\frac{42,40}{21,75}$	¹² $\frac{41,08}{22,73}$
13-16	40,3	¹³ $\frac{42,90}{23,28}$	¹⁴ $\frac{45,30}{26,84}$	¹⁵ $\frac{47,70}{29,42}$	¹⁶ $\frac{45,10}{29,38}$

17-20	50,1	¹⁷ $\frac{52,20}{30,15}$	¹⁸ $\frac{58,70}{35,10}$	¹⁹ $\frac{62,40}{37,27}$	²⁰ $\frac{60,10}{36,95}$
21-23	60,0	²¹ $\frac{66,60}{39,78}$	²² $\frac{84,30}{43,32}$	²¹ $\frac{71,50}{44,58}$	—
24-26	65,2	²⁴ $\frac{72,40}{43,23}$	²⁵ $\frac{77,40}{47,65}$	²⁶ $\frac{77,32}{47,17}$	

* - у всіх прикладах маса вихідного гідролізату, що був взятий на спиртоосадження, складала 100 г,

** - номер прикладу

Таблиця 2

Залежність маси біополімеру, що виділяється, від концентрації спирту і маси СР в вихідному гідролізаті¹ за природними значеннями рН 6,4-6,6

Приклади п/п	Вміст СР в гідролізаті, %	Співвідношення гідролізат : спирт							
		1 1		1 1,5		1 2		1 3	
		[Сп] ²⁾	мБП ³⁾	[Сп]	мБП	[Сп]	мБП	[Сп]	мБП
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1-4	10,10	^{1*} 50,0	48,0	² 60,0	57,0	⁵ 66,2	65,0	⁴ 72,6	71,4
5-8	20,3	⁵ 53,0	49,6	⁶ 62,6	61,9	⁷ 68,6	66,4	⁸ 73,8	73,8
9-12	30,5	⁹ 56,5	56,7	¹⁰ 65,5	63,6	¹¹ 71,4	71,3	¹² 75,2	74,5
13-16	40,3	¹³ 60,0	57,7	¹⁴ 68,6	66,6	¹⁵ 73,7	73,0	¹⁶ 78,0	72,9
17-20	50,1	¹⁷ 64,0	60,2	¹⁸ 72,2	70,1	¹⁹ 75,6	74,7	²⁰ 80,0	-
21-23	60,0	²¹ 68,5	66,3	²² 73,3	72,2	²³ 78,1	74,3	-	-
24-26	65,2	²⁴ 62,0	66,3	²⁵ 75,1	73,1	²⁶ 80,7	72,4	-	-

¹⁾ у всіх прикладах маса гідролізату, взятого на спиртоосадження, складала 100г,

²⁾ - [Сп] - концентрація спирту в водно-спиртовій суміші, %,

³⁾ - мБП - маса біополімеру, % від вмісту СР гідролізату

Вплив активного середовища (рН) на масу БП, що виділяється, встановлювали в експериментах, результати яких наведено у прикладах 27-35

Приклади 27-35

Умови гідролізу тканин мідій аналогічні умовам, прийнятим в попередніх прикладах. Концентрації очищених гідролізатів здійснюють до 32,0-35,0-38,0% вмісту СР, одержані об'єми гідролізатів поділяють на 3 аликвотні частини. До кожної частини гідролізату додають спирт у кон-

центраціях, що забезпечують одержання 74,0% концентрації спирту в суміші гідролізат : спирт. В прикладах 27-30-33 - осадження БП здійснюють при рН 4,5-4,6, що досягалося використанням спирту, підкисленого соляною кислотою, а в прикладах 29-31-35 - при значеннях рН 7,0-7,2, які досягаються за допомогою ацетату натрію 0,1М концентрації, а в прикладах 28, 31 та 34 зберігали природні значення рН 6,4-6,6

Результати наведено в таблиці 3

Таблиця 3

Вплив активної реакції середовища (рН) на масу БП, що виділяється при постійній концентрації спирту, що дорівнює 74,0%

Приклади п/п	Вміст СР в вихідному гідролізаті, %	Активна реакція середовища		
		рН 4,5-4,6	рН 6,4-6,6*	рН 7,0-7,2
		Маса біополімеру		
		$\frac{\text{г сирої речовини}}{\text{сухої}}$ - % від вмісту СР гідролізату		
1	2	3	4	5
27-29	31,0-33,1	²⁷ $\frac{33,4}{19,8}$ - 56,6	²⁸ $\frac{44,3}{25,6}$ - 73,1	²⁹ $\frac{40,0}{25,3}$ - 72,6
30-32	34,2-36,0	³⁰ $\frac{35,6}{21,3}$ - 52,6	³¹ $\frac{48,9}{30,}$ - 74,1	³² $\frac{45,5}{28,9}$ - 73,5
33-35	37,2-39,0	³³ $\frac{40,2}{25,9}$ - 57,6	³⁴ $\frac{51,5}{33,7}$ - 74,6	³⁵ $\frac{50,5}{31,86}$ - 74,1

* - природні значення рН гідролізату

Оптимальним прийнято варіант з природними значеннями активної реакції середовища рН 6,4-6,6

Зміна рН, як в кисле (приклади 27, 30, 33), а також в слабко-лужне середовище (приклади 29, 31, 35) не дозволяє збільшити масу біополімеру, що виділяється

Таким чином, наведені приклади 1-35, свідчать про те, що оптимальні умови виділення біополімеру з тканин молюсків передбачають гідроліз

останніх з використанням амілолітичних (при t 59-60°C, t-40 хв, рН 5,4-5,6) та протеолітичних (при t 55-57°C, t-40 хв) ферментів, очищення одержаних гідролізатів центрифугуванням (2000 об/хв), концентрування їх до (34,0-36,0)% вмісту СР та виділення БП з гідролізатів за природними значеннями рН 6,4-6,6 та (73,0-75,0)% концентрації спирту в суміші гідролізат-спирт з подальшим переосадженням БП за вказаними вище умовами та його ліофільним сушінням

Таблиця 4

Дані про хімічний склад біополімерів з тканини молюсків

Об'єкт дослідження	Масова частка БП % від маси СР сировини	Хімічний склад, % на абсолютно суху речовину							
		Моносахаридний склад					Азот загальний	Мінер речовини	Ліпіди
		Уронові к-ти ¹⁾	Гексозаміни ¹⁾²⁾	гексози ²⁾	Сіалові к-ти ²⁾	Пентози ²⁾			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Біополімер з тканини мідії	40,0±2,0	18,4±0,6	12,3±0,3	13,6±0,3	9,5±0,2	5,2±0,2	5,1±0,4	2,9±0,3	1,1±0,4
-рапани	27,0±1,7	17,7±0,5	13,1±0,4	12,5±0,2	9,7±0,2	4,9±0,3	5,5±0,2	5,0±0,5	0,3±0,1
-ампулярії	29,3±1,5	17,9±0,5	12,9±0,3	13,1±0,3	9,4±0,2	5,1±0,3	5,4±0,2	4,7±0,5	0,3±0,2

¹⁾ - обов'язковий компонент полімерного ланцюга глікозаміногліканів,

²⁾ - обов'язкові компоненти олігомерного ланцюга глікопротеїнів

В таблиці 4 наведено хімічний склад біополімерів, виділених з тканини мідії, рапани та ампулярії

З даних табл. 4 видно, що вуглеводний компонент у складі БП переважає та складає в середньому 58,4% від маси СР. Вуглеводний склад БП різноманітний: в його складі ідентифіковано гексози, сіалові кислоти, пентози, гексозаміни та уронові кислоти. Наявність останніх (гексозамінів і уронових кислот) характерно для полімерних ланцюгів глікозаміногліканів, а гексоз, сіалових кислот,

пентоз і гексозамінів - для олігомерних ланцюгів глікопротеїнів. Одержані дані свідчать про те, що для тканин молюсків характерна наявність БП, які являють собою білкові комплекси глікопротеїнів та глікозаміногліканів, котрі є важливим компонентом складного міжклітинного матриксу молюсків.

Дані з амінокислотного (АК) складу БП наведено в табл. 5. Наведені дані свідчать про повноцінність АК складу білкового компонента біополімеру.

Таблиця 5

Амінокислотний склад білкового (пептидного) компонента БП з тканини молюсків

Назва амінокислот	Масова частка АК, г на 100 г натуральної речовини БП з тканини молюсків		
	з мідії	з рапани	з ампулярії
1	2	3	4
Незамінні АК			
Лізин	1,35/7,40	0,92/5,12	0,87/5,06
Гістидин	0,34/1,87	0,45/2,50	0,44/2,56
Треонін	0,83/4,58	0,94/5,21	0,78/4,54
Валін	0,61/3,34	0,93/5,15	0,84/4,89
Фенілаланін	0,63/3,46	0,75/4,17	0,69/4,02
Метіонін	0,43/2,35	0,34/1,91	0,45/2,62
Ізолейцин	0,47/2,57	0,77/4,30	0,69/4,01
Лейцин	1,14/6,29	1,58/8,80	1,28/7,45
Триптофан	0,37/2,03	0,31/1,74	0,39/2,27
Сумарний вміст АК	6,17/33,89	6,99/38,80	6,43/37,44
Замінні АК			
Аргінін	1,45/7,98	0,99/5,50	1,27/7,39
Аспарагінова кислота	1,69/10,42	1,77/9,80	1,70/9,90
Серин	0,87/4,77	0,92/5,11	0,80/4,66
Глутамінова кислота	3,29/18,10	2,83/15,70	2,95/17,18

Продовження таблиці 5

Гліцин	1,26/7,04	0,83/4,61	0,83/4,83
Аланін	0,97/5,31	0,87/4,82	0,85/4,95
Тирозин	0,62/3,40	0,64/3,53	0,61/3,55
Пролін	0,98/5,37	1,1/6,13	0,97/5,65
Цистеїн	0,25/1,10	0,23/1,27	0,18/1,05
Таурин	0,15/2,67	0,63/3,51	0,58/3,38
Сумарний вміст АК	11,68/62,12	10,81/59,98	10,74/62,54

Мінеральний склад БП, наведений в табл. 6, свідчить про присутність більшості життєво важливих елементів, а також про екологічну чистоту

досліджуваного комплексу — важкі метали присутні у кількостях значно менших за тих, що допускаються граничнодопустимими концентраціями

Таблиця 6

Мінеральний склад біополімерів з молюсків

Об'єкт досліджень	Масова частка мінеральних речовин на сиру речовину					
Біополімери з	Макроелементи, г/кг					
	Ca	Na	Mg	K	P	
міді	4,80	6,30	0,59	1,95	2,70	-
рапани	2,13	4,27	0,55	2,31	1,85	-
ампуляри	2,00	3,92	0,45	2,03	2,15	-
	Мікроелементи, мг/кг					
	Fe	Mn	Ba	Cr	Ni	Co
міді	25,45	1,23	0,76	1,38	5,76	0,32
рапани	14,67	0,56	0,27	0,21	1,76	0,12
ампуляри	16,32	0,65	0,44	0,74	2,09	0,08
	Важкі метали, мг/кг					
	Hg	As	Pb	Cu	Zn	Cd
міді	0,04	2,41	0,03	6,14	9,45	0,31
рапани	0,03	2,68	0,02	1,79	5,94	0,19
ампуляри	0,03	2,17	0,03	1,94	4,44	0,15

Ліпідний склад БП наведено в табл. 7. Слід відзначити, що для ліпідів БП з тканини рапани та ампуляри характерно високий вміст насичених жирних кислот (НЖК), а з тканини міді — поліненасичених жирних кислот (ПНЖК). Останні визначають біологічну активність ліпідів, тому ліпіди біополімерів з тканини міді мають значно більшу (в 5 разів) біологічну активність, що виражена в од. вітаміну F, ніж з тканини рапани та ампуляри.

Біополімер з тканин молюсків, що заявляється, є розчинним у воді, в фізрозчині зі створенням колоїдних розчинів, він термостабільний, його водний розчин витримує температуру 95-100°C протягом 45-50 хв, є полярним, характеризується

негативними значеннями окислювально-відновного потенціалу (що свідчить про антиоксидантні властивості) та величиною антиоксидантної активності, що визначається хемолюмінесцентним методом в присутності пероксидисульфату Na, при pH 12,0, змінюється в межах 15,2-15,8.

Біополімер характеризується максимумами в області УФ-спектру поглинання при λ 220, 260 нм. Гель-хроматографія БП на сефадексі G-50 дозволила виявити в його складі 3 комплекси з максимумом поглинання в УФ-області при λ 200, 250 нм, λ 220 та 250 нм, λ 210, 260 нм, що свідчить про його гетерогенність.

Таблиця 7

Ліпідний склад біополімерів з молюсків

Об'єкт до- сліджень	Вміст ліпідів, % наСР	Масова частка, %								Біологічна ак- тивність ліпідів (вітамін F), од/г жиру
		НЖК	18 1	ПНЖК						
				18 2	18 3	20 4	22 5 10 5	22 6	всього	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ліпіди мідій	1,1	20,0	37,3	8,6	5,7	7,7	6,8	2,5	38,3	19,4
Ліпіди ра- пани ¹⁾	0,3	51,5	35,1	2,9	0,4	0,7	0,9	4 1	9,0	3,9
Ліпіди ам- пуляри	0,3	50,1	36,7	2,2	1,8	0,4	0,5	3,3	8,2	2,8

1) - у рапани та ампуляри в загальних ліпідах домінують (до 67%) не ліпіди

Таблиця 8

Динаміка глікемії під час тесту толерантності до глюкози у щурів, які вживали БП, метформін та placebo водночас з ін'єкціями дексаметазону ($X \pm sx$)

Характер впливу	Доза, г/кг	п/п	Базальний рівень, ммоль/л	Глікемія крові (ммоль/л) через хв після введення глюкози			Інтегральна глікемія, ммоль/л
				30	60	120	
1	2	3	4	5	6	7	8
Інтактний контроль	-	5	4,28±0,28	6,93±0,44	5,86±0,41 ²⁾	4,56±0,12 ²⁾	21,63±1,21 ²⁾
Дексаметазон + placebo	-	5	4,52±0,57	17,86±0,32 ¹⁾	11,90±0,17 ¹⁾	10,70±0,30 ¹⁾	44,13±1,16 ¹⁾
Дексаметазон + метформін	0,2	5	3,70±0,42	8,61±1,06 ²⁾	6,64±0,55 ²⁾	4,78±0,27 ²⁾	23,73±2,13 ²⁾
Дексаметазон + БП з міді	0,4	5	4,36±0,22	7,80±0,32	6,34±0,62 ²⁾	4,9±0,59 ²⁾	23,4±2,11 ²⁾

Примітка

1) - достовірність відмін у порівнянні з інтактним контролем, $P < 0,05$,

2) - достовірність відмін у порівнянні з інсуліннезалежним цукровим діабетом + placebo $P < 0,05$

Таблиця 9

Динаміка глікемії у щурів з ІНЗЦД при одноразовому введенні препарату ($X \pm sx$)

Характер впливу	п	Базальна глікемія, ммоль/л	Після перорального введення препарату через годин					
			2		4		6	
			ммоль/л	% зниження	ммоль/л	% зниження	ммоль/л	% зниження
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Інтактний контроль	5	4,08±0,04 ²⁾	3,89±0,02 ²⁾	4,70±0,80	3,70±0,04 ¹⁾	8,82±0,89	3,62±0,02 ²⁾	11,04±1,28
ІНЗЦД+	5	8,82±0,35 ¹⁾	8,44±0,33 ¹⁾	4,38±0,60	7,97±0,28 ¹⁾	9,64±0,88	7,66±0,28 ¹⁾	13,1±1,70
ІНЗЦД+препарат (0,4 г/кг)	5	8,94±0,61 ¹⁾	7,47±0,59 ¹⁾	16,44±0,85 ¹⁾	6,22±0,52 ¹⁾²⁾	30,6±2,67 ¹⁾	6,01±0,46 ¹⁾²⁾	32,9±1,6 ¹⁾²⁾

Примітка

1) - достовірність відмін у порівнянні з інтактним контролем, $P < 0,05$,

2) - достовірність відмін у порівнянні з ІНЗЦД + placebo, $P < 0,05$

Таблиця 10

Вплив біополімеру з міді на активність АлАТ та АсАТ в сироватці крові у щурів

$\Pi = 9$

Назва ферменту	Активність ферментів, мкмоль пірувата в 1 мл сироватки за 1 годину інкубації			
	групи щурів			
	контроль (1)	контроль БП (2)	гіпертермія (3)	гіпертермія + БП (4)
1	2	3	4	5
АлАТ	0,51±0,01	0,54±0,16	1,06±0,16	0,82±0,13
АсАТ	4,50±0,80	4,24±0,75	7,13±2,24*	2,90±0,48**

* - достовірно відносно гр 1,

** - достовірно відносно гр 3

Таблиця 13

Гормональний скрінг крові вагітних жінок імуноферментним методом

$\Pi = 12$

№ пп	П / П, вік	Терміни вагітності, тижні	ТТГ, нмоль х л'		Т4, нмоль х л'		Т3, нмоль х л'	
			До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
			Норма 0,3-5,5		Норма 0,8-2,1		Норма 5,0-13,0	
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Продовження таблиці 13

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Х-ра Е В, 24	12-13	0,10	0,25	6,8-7,4	3,2-3,8	22,0-26,5	5,0-12,0
2	Х-ра Т К, 30	27-28	0,15	0,90	5,7-6,2	2,8-3,2	32,0-34,0	5,3-12,5
3	Х-ра Г Н, 22	11-12	0,13	0,35	6,2-6,1	3,3-3,6	42,0-46,6	6,0-12,0
4	Х-ра Т С, 23	36-37	0,10	0,40	5,4-4,9	2,9-3,4	38,0-40,1	6,3-6,1
5	Х-ра Ю С, 20	27-28	0,25	2,20	7,3-7,1	3,2-3,6	37,0-39,0	7,5-7,4
6	Х-ра Т П, 19	12-13	0,13	1,80	6,4-6,2	3,2-3,3	24,0-27,0	10,5-9,7
7	Х-ра Г П, 21	11-12	0,20	0,45	7,6-6,8	3,4-3,8	36,0-38,0	5,5-11,5
8	Х-ра Б Е, 25	18-19	0,10	0,50	6,3-7,2	3,5-3,8	32,0-35,0	5,1-9,5
9	Х-ра Г А, 23	25-27	0,12	0,52	6,2-6,3	3,1-2,9	18,0-19,5	6,4-7,2
10	Х-ра И П, 35	27-28	0,24	0,75	7,3-7,9	3,4-3,3	34,0-36,1	6,5-7,2
11	Х-ра Л П, 32	18-20	0,15	0,85	5,4-4,9	2,8-3,1	23,4-27,0	5,1-9,4
12	Х-ра Т Н, 28	28-29	0,17	1,50	7,1-6,8	3,4-3,5	37,0-39,0	7,5-7,4
Середні показники			0,14±0,08	0,82±0,22	6,5±1,1	3,3±1,2	32,5-14,3	8,1±3,2

Оцінку біологічної активності біополімеру здійснювали за величиною його цукрознижувачою здатності, а також гепатопротекторних, антиоксидантних і тиреотропних властивостей

1 Цукрознижувачі властивості БП з міді вивчали в інституті проблем ендокринної патології ім. В.Л. Данилевського (м. Харків) в умовах експерименту на 35 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 250-300 г

1.1 Вивчення можливого превентивного ефекту БП з тканини міді на розвиток толерантності до глюкози проводили на моделі інсулінової резистентності, індукованої дексаметазоном

Проведеними дослідженнями показано, що двотижневе введення тваринам БП з міді дози 0,4 г/кг маси тіла гальмує розвиток толерантності до глюкози, індукований дексаметазоном. Підтвердженням цього є показники інтегральної глікемії, котрі під впливом БП знижувалися майже вдвічі та наближалися до значень, що спостерігалися у інтактного контролю (табл. 8). Слід відмітити, що за ступенем вираженості гіпоглікемічної дії речовина, що вивчається в цій серії експериментів, не поступалася препаратом порівняння метформіну

1.2 Оцінка цукрознижувачих властивостей БП була здійснена на моделі стрептозотоцинового діабету з попереднім введенням нікотинамідю, який захищає панкреатичні р-клітини від тотальної деструкції цитостатиком і дозволяють зберегти 40 % інсулінопродукуючого апарату підшлункової залози

Проведені експерименти показали, що через дві години перорального застосування БП в дозі 0,4 г/кг маси тіла рівень глюкози в крові діабетичних щурів було знижено на 16,44 %, досягав максимального падіння через 4 години (30,6 %), яке зберігалося до 6 годин від початку експерименту. Слід відзначити, що вміст цукру в крові тварин, що одержували БП, через 2 та 4 години достовірно знижувалося у порівнянні з діабетичною групою, обробленою плацебо, хоча й не досягало рівня глюкози, що спостерігався в

інтактному контролі (табл. 9)

Таким чином, профілактичне 14-денне застосування БП подібно метформіну запобігає розвитку порушень толерантності до глюкози, індукованих дексаметазоном, крім того, БП оказує помірний цукрознижувачий ефект при одноразовому введенні у тварин з відносною інсуліновою недостатністю (модель інсулінового діабету)

2 Вивчення гепатопротекторних і антиоксидантних властивостей БП проводили на кафедрі молекулярної біофізики Національного університету України ім. Каразіна (м. Харків)

Дослідження щодо впливу БП з міді на зміни метаболізму печінки щурів здійснювали на 36 щурах лінії Вістар, поділених на 4 групи

1 контроль, що одержували воду внутрішньочеревним зондуванням,

2 контроль + БП,

3 гіпертермія, 35°C, 1 год, 14 днів, що одержували воду,

4 гіпертермія + БП

Біополімер вводили 1 раз на день орально в дозі 0,4 г/кг маси тіла

В таблиці 10 показано вплив БП з міді на цілісність мембран гепатоцитів печінки експериментальних щурів, про які судили з активності двох ферментів – аланіна-трансаферази (АлАТ) та аспаратно-трансаферази (АсАТ)

Дані табл. 10 свідчать про збільшення активності АсАТ і АлАТ в сироватці щурів, підданих гіпертермії, що свідчить про порушення цілісності мембран гепатоцитів печінки. Введення БП трохи (на 23 %) гальмує негативний вплив гіпертермії на печінку тварин. В той же час БП значно знижує рівень АсАТ, що може бути з'ясовано стабілізацією активності АсАТ під впливом речовин, що надходять з БП, зокрема, глютамінової кислоти

В таблиці 11 наведено дані з впливу БП з міді на активність основних глутатіонзалежних антиоксидантних ферментів, а також на активність супероксиддисмутази та каталази в гомогенатах печінки щурів в нормі та після гіпертермії

Таблиця 11

Вплив БП з мідій на активність основних антиоксидантних ферментів в гомогенатах печінки щурів в нормі та після гіпертермії

П=9

Назва ферменту	Активність ферменту, нмоль на 1 мг білка			
	Група щурів			
	Контроль (1)	Контроль +БП (2)	Гіпертермія(3)	Гіпертермія+ БП(4)
Глутатіонпероксидаза (ГПО) з гідроперекисом кумолу	168,8±4,63	207,5±16,5	196,6±15,6	200,9±20,2
ГПО з перекисом водню	34,8±4,0	38,9±5,0	44,8±4,3	54,6±4,1
Глутатіонредуктаза (ГР)	204,7±15,4	200,9±14,7	193,2±19,6	212,8±22,3
Глутатіонтрансфераза (Г-СТ)	1404,2±98,2	1391,4±59,1	1333,4±82,9	1221,1±100
Супероксиддисмутаза (СОД)	578,0±34,0	597,0±23,0	574,0±45,0	586,0±41,0
Каталаза (КТ)	472,0±41,0	435,0±28,0	311,0±39,0	474,0±64,0

З даних табл. 11 виходить, що вживання біополімеру викликає зміну ГПО активності, що свідчить про посилення захисних функцій даної антиоксидантної системи та пов'язано зі збільшенням швидкості ресинтезу глутатіону (кофактору ГПО) за рахунок високого рівня його попередників в БП (глутамату, метіоніну, гліцину та цистеїну). Це особливо актуально, оскільки при гіпертермії не підвищена активність ферменту, що відновлює глутатіон-ГР. Це явище спрямовано на адаптацію метаболізму печінки в умовах гіпертермії. Особливо важливо це тому, що печінка може стати джерелом глутатіону, відновленого для інших органів.

Крім того, з даних табл. 11 виходить, що БП з мідій викликає деяке підвищення активності інших антиоксидантних ферментів - СОД та КТ. Причому, активність КТ в печінці щурів при гіпертермії знижується, а вживання БП вертає значення цього

показника до величини значень у контрольних тварин. Важливим показником функціонального стану печінки є інтенсивність процесів окислення з трансформації енергії в мітохондріях.

В табл. 12 наведено дані про вплив БП з мідій на швидкість дихання мітохондрій в різноманітних метаболічних становищах (V_3 та V_4 по Чансу) в гомогенатах печінки щурів в нормі та після гіпертермії. При цьому V_3 характеризує швидкість синтезу АТФ дихальним ланцюгом - збільшення його свідчить про позитивні зміни в метаболізмі, V_4 свідчить про протонну провідність внутрішньої мембрани мітохондрій - збільшення цього показника може бути пов'язано з пошкодженням цієї мембрани.

Відношення V_3/V_4 - так званий дихальний контроль, свідчить про високу швидкість вироблення енергії в печінці тварин.

Таблиця 12

Вплив БП з мідій на швидкість дихання мітохондрій в метаболічних становищах (V_3 та V_4 по Чансу) в гомогенатах печінки щурів в нормі та після гіпертермії (нмоль на 1 мг білка)

П=9

Метаболічний стан	Група щурів			
	Контроль (1)	Контроль+БП (2)	Гіпертермія (3)	Гіпертермія+БП (4)
V_3	16,95±2,89	26,38±1,36	21,59±4,51	32,04±5,11
V_4	7,48±1,10	7,57±0,33	11,12±1,58	8,93±8,93±1,56
V_3 та V_4	2,26±0,33	3,08±0,7	2,82±0,44	3,59±0,35

З даних табл. 12 виходить, що БП викликає деяке збільшення швидкості синтезу АТФ в печінці, причому БП дозволяє захищати внутрішню мембрану мітохондрій.

Крім того, вживання БП забезпечує значне (>58,0 %) збільшення швидкості вироблення енергії в клітинах печінки тварин, яких піддали гіпертермії, що є позитивним фактором навіть в несприятливих умовах.

Позитивні результати експериментальних досліджень дозволяють рекомендувати використання БП як ефективного гепатопротектору з вираженими АО-властивостями.

Тиреотропний ефект БП з мідій було досліджено в амбулаторних умовах під час спостереження за 12-тьма вагітними жінками з діагнозом - гіперплазія 1, 2, 3 ступеня з тиреотоксикозом (районна поліклініка, м. Євпаторія).

Стан тиреоїдної системи вивчали за схемою, що включала три елементи — клінічний огляд, ЕКГ, ультразвукове дослідження щитоподібної залози, визначення в крові імуноферментативним методом вмісту гормонів тиреоїдної системи - T_4 та T_3 , а також тиреотропного гормону - ТТГ.

Клінічний огляд дозволив виявити усі хворі до лікування пред'являли скарги на емоційну лабільність, роздратованість, пітливість, схуднення, загальну слабкість, зниження пам'яті, безсоння, тахикардію, підвищення пульсового тиску. Під час огляду рухів руки відмічено характерне тремтіння кінцівок, особливо пальців витягнутих рук (симптом Марі), у деяких хворих - незначний екзофтальм.

за результатами УЗД та пальпування - щитоподібна залоза збільшена в розмірах, помірно щільної консистенції.

Вживання БП здійснювали один раз на день перед харчуванням (добова доза 0,2 г на кг маси тіла) протягом 24 днів

Гормональний скрінг крові вагітних жінок до та після вживання БП наведено в таблиці 13

З даних табл. 13 видно, що підвищений вміст в крові загального тироксину (T_4) та трийодтиронину (T_3) за принципом "зворотного зв'язку" пригнічує секрецію тиреотропного гормону (ТТГ)

Вживання БП в дозі 0,2 г на кг маси тіла протягом 21 дня дозволяє скорепювати рівень тиреоїдних гормонів (T_3 , T_4) в крові хворих та нормалізувати рівень біологічно активного ТТГ

Після лікування БП, крім відміченої позитивної динаміки з боку гормонів щитоподібної залози, спостерігається нормалізація клінічного стану хворих: зникли нездужання, слабкість, втомленість, тахікардія, тремор рук, знизилася пітливість, збільшилася маса тіла, нормалізувався сон, менш вираженим став екзофтальм, підвищилася працездатність. УЗ дослідження дозволили встановити, що щитоподібна залоза зменшилася в розмірах у 76 % хворих

Переваги БП, що заявляється, та способу його одержання

— можливість використання тканин молюсків (мідії, рапани та ампулярії) як об'єктів для виділення біологічно активних багатofункціональних БП -білкових комплексів глікозаміногліканів і глікопротеїнів,

— вперше для виділення БП з тканин молюсків було запропоновано спосіб гідролізу тканин молюсків з використанням ферментів аміполітичної та протеолітичної дії, що дозволив скоротити тривалість гідролізу більш, ніж в 15 разів у порівнянні з прототипом, пом'якшити умови гідролізу, замінити імпорتنі ферменти на вітчизняні та знизити енергоємність процесу,

— забезпечено високий ступінь випущення БП з тканин молюсків з максимальним зберіганням його нативних властивостей,

— можливість одержання БП, що характеризується специфічним складом та біологічною активністю — цукрознижуючою, гепатопротекторною, тиреотропною та антиоксидантною

ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ

1 Патент Великобританії № 1503564, МКИ А 6 1К 37/00, опубл. 15.03.78. Способ извлечения и обработки гликопротеинов, мукополисахаридов и сопутствующих веществ

2 Патент РФ № 2053779, СІ, Акционерное общество закрытого типа "Ратибор" — Препарат из тканей морских гидробионтов "Орбитар" и способ его получения, Бюл. "Изобретения", — М., — № 4, — 1996

3 Ринок Європа. Європейські вимоги до харчових добавок. Довідник, Львів, — Леонорм, — 1867 с