

(19)



(10) **LT 3355 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3355**

(51) Int.Cl.⁵: **A61K 35/78**

(21) Paraiškos numeris: **IP581**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 05 31**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 12 27**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 07 25**

(72) Išradėjas:
Werner Schnelder, DE
Erich F. Elstner, DE
Elisabeth Kleber, DE

(73) Patent savininkas:
STEIGERWALD ARZNEIMITTELWERK GmbH, Havelstrasse 5, D-6100 Darmstadt, DE

(74) Patentinis patikėtinis:
Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Vaistai, skirti gydyti sudirginimo būseną ir nervines disfunkcijas

(57) Referatas:

Išradimas priskiriamas vaistams ir jų panaudojimui gydyti sudirginimo būsenas ir nervines disfunkcijas. Vaistai skiriasi tuo, kad į juos, kaip aktyvios medžiagos, įeina gauti atliekant ekstrakciją spiritu *corydalis* ir *eschscholtzia* ekstraktai (2,5:10), esant reikalui, greta įprastų priedų. Ekstrakte *eschscholtzia* ir *corydalis* santykis (pagal svorį) sudaro nuo 20:1 iki 1:1.

Išradimas priskiriamas vaistams ir jų panaudojimui sušvelninti sudirginimo būseną ir nervinės disfunkcijas.

5 Yra žinoma, kad tarpiniai ir galutiniai medžiagų apykaitos pirokatechinamino produktai turi didelę įtaką žmogaus sudirginimo būsenai. Taip, pavyzdžiui, galutinis produktas adrenalinas veikia kaip adrenerginės nervų sistemos neurosiųstuvai kaip alfa
10 taip ir beta - receptoriams. Kaip simpatikomimetinis preparatas adrenalinas padidina širdies susitraukimo jėgą. Be to, kadangi adrenalinas padidina oksidacinę medžiagų apykaitą ląstelėse, to pasekoje padidėja mobilizacinis organizmo pasirengimas. Dėl to streso
15 situacijose stebi adrenalino išmetimo padidėjimą. Ypač aukštos adrenalino ir taip pat jo priešstadijose - noradrenalino koncentracijos gali sukelti kraštutinį sudirginimą, nervingumą ir tuo pačiu nepakankamą funkcinį organizmo sugebėjimą tuo metu, kai tik truputį
20 pakilę šių aminų dydžiai veikia visai teigiamai: pulsas ir kraujo spaudimas vos pakilę, muskulatūra ir galvos smegenys sužadintos, jautrumas padidintas.

Be to, žinoma, kad sekančios adrenalino priešstadijos -
25 dopamino koncentracijos pažeidimai, gali sukelti sudirginimo būseną ir nervinės disfunkcijas. Iš dalies, esant nepakankamam dopamino kiekiui, gali atsirasti depresija. Specialus nepakankamo dopamino kiekio sindromas yra Parkinsono liga, kurios daliniai simptomai yra akinezė, sustingimas ir virpėjimas ramybės
30 būsenoje. Naujausi klinikiniai rezultatai parodo terapinį dopa efektyvumą gydant parkinsonizmą. Šis veikimas paaiškėja stebint dopamino sumažėjimą pagrindiniame nervų mazge.

Yra žinomi vaistai, kurių pagrindą sudaro aktyvios medžiagos ir priedai (žiūr. CS A.L. Nr. 262751, A 61 K 35/78).

- 5 Tačiau dėl savo sudėties jie neturi galimybių padidinti paciento dopamino koncentracijos, 'vykstant natūraliai medžiagų apykaitai ir tuo pačiu sušvelninti ar panaikinti sudirginimą ir nervinės disfunkcijas, kurios pagrįstos amino balanso sutrikimu.
- 10 Taip pat žinomi vaistai, kurių pagrindą sudaro aktyvios medžiagos ir priedai (žiūr. US patentą Nr. 4810498, A 61 K 35/78).
- 15 Tačiau dėl savo sudėties jie neturi galimybių padidinti paciento dopamino koncentracijos, vykstant natūraliai medžiagų apykaitai ir tuo pačiu sušvelninti ar panaikinti sudirginimą ir nervinės disfunkcijas, kurios yra pagrįstos amino balanso sutrikimu.
- 20 Tuo būdu, neužtenkant dopamino, pageidautina natūraliu būdu padidinti šio pirokatechinemino koncentraciją. Tai galima pasiekti, pirma, padidinus dopa/dopamino sintezę, antra, neleidžiant dopaminui suskilti.
- 25 Siūlomo išradimo tikslas yra sukurti vaistus, kurie padidina paciento dopamino koncentraciją, vykstant natūraliai medžiagų apykaitai.
- 30 Nurodytą tikslą išradimu pasiekia dėka vaistų, pagal 1 punktą besiskiriančių tuo, kad į juos kaip aktyvios medžiagos įeina gauti ekstrahuojant spiritu (2,5:10) *corydalis eschscholtzia* ekstraktai, o esant reikalui, ir įprasti priedai, kuriuose ekstraktų *corydalis* ir
- 35 *eschscholtzia* santykis (pagal svorį) yra nuo 20:1 iki 1:1.

Tinkami išradimo įgyvendinimo variantai pateikiami formulės 2-9 punktuose. Be to, į šį išradimą įeina vaistų pritaikymas pagal 10 punktą 'sušvelninti ar panaikinti sudirginimą ir nervų disfunkcijas, kylančius, pažeidus amino balansą, ypač sumažėjusios dopa/dopamino koncentracijos. Toliau, į išradimą įeina gauto atliekant ekstrakciją spiritu (2,5:10) ekstrakto panaudojimas gydyti sudirginimą ir nervines disfunkcijas, atsiradusius pažeidus amino balansą pagal 11 ir 12 punktus. Pritaikymo formos pateiktos 13-15 punktuose.

Vaistai, pateikti išradime, gali turėti ekstrahuojant spiritu ekstraktus liofilizuotus iki miltelių pavidalo arba vandeninio ir/arba spiritinio tirpalo pavidalu. Liofilizuotus miltelius gauna, kaip taisyklė, atliekant gauto ekstrahuojant spiritu ekstrakto (išraukos iš augalinės žaliavos) liofilinį džiovinimą, įprastais liofiliniam džiovinimui būdais.

Išdžiovintus liofilinimu ekstraktus *corydalis* ir *eschschooltzia* galima laikyti atskirai arba sumaišytus, o prireikus pagaminti vaistus, galima sumaišyti su tinkamais farmacijoje nešėjais/skiedikliais. Tinktūrų gavimui tinka vanduo ir/arba spiritas. Į vaistus, svarbiausia, įeina aktyvių ingredientų išraukos, gautos ekstrahuojant spiritu (2,5:10) iš augalinės žaliavos, ir į juos įeina tokia ištrauka iš augalinės žaliavos.

Eschschooltzia ir *corydalis* santykis (perskaičiavus pagal sauso ekstrakto svorį) yra tinkamiausias nuo 10:1 iki 2:1, ir ypatingai 4:1.

Kaip aktyvūs ingredientai išradime ypač tinka *corydalis cavae rhizoma* ir *eschschooltzia californicae herba* ekstraktai.

- Vaistai išradime gali būti paruošti įprasta oraliniam skyrimui forma, ypač tikėtų tabletės, dražė, kapsulės ir ypatingai tikėtų tinktūros. Šias įvedimo formas, esant
- 5 reikalui, paruošia, naudodami įprastas ar a skiras įvedimo formas ir tinkamus farmacinius skie iiklius ir/arba nešiklius, įprastai naudojamus skiriant individualiai, inkapsuliuojant liofilizuotą ekstraktą arba jo spiritinį ir/arba vandeninį tirpalą. Norint
- 10 gauti skystas įvedimo formas, tokias kaip tinktūros, naudoja gautas ekstrahuojant spiritu spiritines ištraukas iš augalinės žaliavos. Greta šių liofilizuotų spiritinių ištraukų iš augalinės žaliavos taip pat galima gauti sausas liekanas sausai išgarinant pačias
- 15 spiritines ištraukas iš augalinės žaliavos, geriausia vakuumu ir/arba inertinių dujų atmosferoje iki sausos liekanos ir gautam tokiu būdu likučiui galima suteikti norimą įvedimo formą.
- 20 Aktyvių medžiagų koncentraciją vaistuose pagal išradimą galima keisti plačiose ribose. Kaip taisyklė, koncentracija sudaro nuo 0,5 iki 20 svorio %, perskaičiuoto į galutinę vaistų sudėtį, ypač tinka nuo 1 iki 10 svorio %, ir labiausiai - nuo 1 iki 4 svorio
- 25 %. Jei naudoja gautą ekstrahuojant spiritu (2,5:10) spiritinę ištrauką iš augalinės žaliavos, tai ją tinkamiausia naudoti tiesiog gautos po ekstrakcijos koncentracijos; augalinės žaliavos ištrauka iš *corydalis* ir *eschscholtzia* dažniausiai naudojama
- 30 tokiu santykiu, kad santykis *corydalis* ir *eschscholtzia* atitiktų paminėtiems aukščiau kaip tinkamiausiems.
- Norint gauti atskirus ekstraktus *corydalis* ir *eschscholtzia*, ypač *corydalis savae rhizoma* ir
- 35 *eschscholtziae californicae herba*, vaistai turi atitikti DAB 9 (vokiška farmakopėja) aprašymą. Tai

pasiekama kontroliuojant kokybę vaisto gamybos procese.

Atskirus ekstraktus gauna įprastais ir standartiniais
 5 ekstrakcijos būdais, kaip, pavyzdžiui, maceracija arba
 perkoliacija, naudojant etanolį arba mišinį etanolis/
 vanduo. Išsaugomas vaistinės žaliavos gydomųjų augalų -
 ekstrakto 2,5:10 santykis, t.y. iš 2,5 g gydomųjų
 10 augalų gauna 10 ml vaistinės žaliavos gydomųjų augalų
 ekstrakto. Kaip ekstrahuojantį agentą dažniausiai
 naudoja 30% etanolį. Gavimą galima reguliuoti, kontro-
 liuojant procesą.

Kad būtų įvertinta ir garantuota pastovi ekstrakcijos
 15 kokybė, naudoja įprastus kokybės kriterijus. Iš dalies
 tam tarnauja pilni ekstrahuotų medžiagų spektrai, ir,
 iš kitos pusės, žinomų iš literatūros abiejų gydomųjų
 augalų (pvz., cf.) pagrindinių alkaloidų analizės.

Po kokybės kontrolės ekstraktus, priklausomai nuo
 20 norimos įvedimo formos ir priklausomai nuo norimos
 koncentracijos, toliau apdoroja kaip skystą ekstraktą
 arba liofilizuotą ekstraktą.

Paskirtų vaistų tipas ir kiekis priklauso iš dalies nuo
 susirgimo sunkumo, nuo bendros savijautos ir nuo
 paciento amžiaus. Kaip taisyklė, paskiria vaisto kiekį
 tinktūros forma, kuri išradimu laikoma tinkamiausia, ir
 sudaro nuo 2 lašų/kūno svorio kg, vieną arba kelis
 30 kartus dienoje. Kai naudojamos kitos peroralinio
 įvedimo formos, paskiria, kaip taisyklė, atitinkamą
 kiekį, tinkamiausią nuo 2 iki 5 mg bendro sauso
 ekstrakto/kūno svorio kg, vieną ar kelis kartus
 kasdien.

35

Pridedamos figūros atvaizduoja:

- Fig. 1 parodo pirokatechinamino sintezės medžiagų apykaitos schemą.
- 5 Fig. 2 parodo tirozino reakcijos per dopa, dopachinoną iki dopachromo arba melanino apžvalgos schemą.
- 10 Fig. 3 parodo nustatyto prie 303 nm ultravioletinio spektro tirozino hidroksilinimą, esant *corydalis* ekstrakto 1:10.000, *eschscholtzia* ekstrakto 1:10.000 ar 20 vienetų fenoliazės.
- 15 Fig. 4 parodo grafiką Lineweaver-Burk fenoliazės reakcijos su *corydalis* ekstraktu (fig. 4a ir 4b), ir palyginimui be *corydalis* ekstrakto (fig. 4c-4f).
- Fig. 5 parodo fenoliazės reakciją, esant 3,4-dihidroksibenzeno.
- 20 Fig. 6 parodo D,L-dopa įtaką fenoliazės reakcijai prie skirtingų dopa koncentracijų (K-kontrolė).
- 25 Fig. 7 parodo dopamin-β-hidroksilazės sustabdymą *eschscholtzia* ekstraktu (kreivė A) ir taip pat vandeniniu 1% tirpalu ekstraktų *corydalis* ir *eschscholtzia*, kuriems atliktas sublimacinis džiovinimas (kreivė B).
- 30 Fig. 8 parodo fotometro pagalba prie 241 nm, katalizuoto amino oksidaze, benzilamino virtimo reakcijos į benzaldehidą sustabdymą *corydalis* ekstraktu.
- 35 Fig. 9 parodo katalizuoto MAO (monoaminoksidaze) benzaldehido susidarymo sustabdymą prie 241 nm, priklausomai nuo *eschscholtzia* ekstrakto koncentracijos.

Fig. 10 parodo katalizuoto MAO benzaldehido susidarymo sustabdymą prie 241 nm ekstraktais *eschscholtzia* (A), *corydalis* (B) ir ekstraktų *corydalis* ir *eschscholtzia* mišiniu santykiu 20:80.

Iš fig. 1 matosi pirokatechinamino medžiagų apykaitos schema. Atsirandantys tuo metu dopa ir dopamino junginiai pagal jų koncentraciją, visų pirma, priklauso nuo to, kaip greitai vyksta tirozino virtimas į dopa ir, antra, koku greičiu dopaminas reaguoja toliau iki noradrenalino ir adrenalino. Be to, dopaminas taip pat yra skaldomas monoaminoksidazių (MAO), taip, kad ir tai gali žymiai paveikti jo koncentraciją medžiagų apykaitoje. Kaip matosi iš fig. 1, padidintą dopamino koncentraciją gauna, jei padidina fenoloksidazės reakciją (fenoliazė, tirozinazė), ir dopamin-β-hidroksilazės ir monoaminoksidazės įtaką galima sumažinti. Buvo atlikti eksperimentai, parodantys, koku laipsniu aktyvūs vaistų komponentai išradime veikia tris fermentacines reakcijas.

Sekantys tyrimai, kadangi nebuvo nieko kito, buvo atlikti su parduodamais fermentais ir su *corydalis cavae rhizoma* ir *eschscholtziae californicae herba*.

1. Tirozinazės reakcijos tyrimai:

Vykstant medžiagų apykaitai, tirozinas yra hidroksilinamas naudojantčioje deguonį reakcijoje iki L-dopa. Šią pirmą pirokatechinamino sintezės stadiją katalizuoja tirozinazė ar fenoliazė, arba fenoloksidazė, į kurią įeina varis, mažai specifinis fermentas. Žinoma, kad fenoliazės plačiai paplitę gamtoje, sutinkamos augaluose, grybuose ir įvairiuose gyvulių audiniuose. Jos visur vaidina svarbų vaidmenį ten, kur oksiduoja mono- ar difenolius, be to, daugeliu atveju prasideda

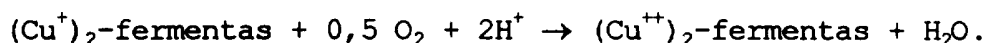
oksidacijos polimerizacijos reakcijos, kaip, pavyzdžiui, lignino ar melanino susidarymas.

5 Fenoliazės katalizuoja dvi viena po kitos sekančias oksidacijos stadijas, kurias galima aprašyti taip:

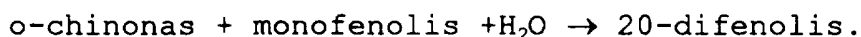
10 1. Fermento "krezolazės aktyvumas" iššaukia monofenolio hidroksilinimą orto - padėtyje su difenolio susidarymu.

2. "Pirokatechinolazės aktyvumas" katalizuoja tolesnę sudaryto o-diolio oksidaciją iki atitinkamo chinono.

15 Abi reakcijos tiesiogiai priklauso viena nuo kitos. Tamprus krezolazės reakcijos ir pirokatechinolazės reakcijos ryšys remiasi vario atomo oksidacijos būviu aktyviame centre, kuris nustatytas pagal D. Kertesz ir R. Zito, Hayaishi (leidėjas) "Oxygenases", Academic Press, Londonas (1962) 8 skyrius: Fenoliazė, parodyta sekančiai: $(\text{Cu}^{++})_2$ -fermentas + o-dihidroksifenolis $\rightarrow$ $(\text{Cu}^+)_2$ -fermentas + o-chinonas + 2H^+ .



25 Anksčiau pateiktame vario elektronų balanse krezolazės reakcija nėra priimta domėn. Faktinai, lieka neaišku, ar katalizuoja monofenolio hidroksilinimą tiesioginę fermentacinę reakciją, ar ši reakcija vyksta cheminiu būdu lygiagrečiai pirokatechinamino oksidacijai pagal sekančią schemą:



35 Nefermentacinės reakcijos faktą visų pirma patvirtina tai, kad reaguojant monofenoliams su fenoliazėmis galima stebėti indukcinę fazę, kuri prie tirozinazių iš gyvulių audinių gali tęstis iki vienos valandos.

Nepertraukiama fermentacinė reakcija gali prasidėti tik tada, jei dioliai ar chinonai yra kaip priemaišos arba yra sudaryti autooksidacijos rezultate.

- 5 Tirozinazės reakcijos su augaliniais ekstraktais iš *corydalis* ir *eschsoltzia* tyrimas.

Fig. 2 schematiškai parodo reakcijos apžvalgą nuo tirozino iki dopachromo ir jo virtimo į chinoniminą arba melaniną.

Eksperimentiniai stebėjimai buvo atliekami po tirozino oksidacijos iki dopachromo (Fig. 2), pirmo dihidroksilenilalanino produkto (dopa). Pats dopachromas yra dopachromo tatumerazės substratas ir yra melanino susidarymo priešstadija.

Kaip dopachromo susidarymas, taip ir melanino sintezė priveda prie dopa suskilimo ir tuo pačiu prie dopamino sintezės sumažėjimo.

Dopachromo koncentraciją galima sekti ultravioletiniame spektre, esant bangos ilgiui 303-318 nm. Jo susidarymas iš tirozino prilyginamas tyrinėjamos fenoliazės aktyvumui, kurią galima laikyti nustatančia reakcijos greitį.

Tyrinėjimus atliko sekantiems substratų mišiniams:

30 2 mM tirozino;

100 mM fosfatinio buferinio tirpalo, pH 6,5;

35 20 vienetų tirozinazės ar spiritinių ištraukų *eschsoltzia* ar *corydalis*, atskiestų santykiu 1:10000 (pagamintų iš pagrindinio ekstrakto pagal sekantį pavyzdį).

Fig. 3 parodo tirozino hidroksilinimą nustatytą prie 303 nm ultravioletinio spektro, dalyvaujant fenoloksidazei arba *corydalis* ir *eschsoltzia* ekstraktams. Be to, esant vienai fenoliazei, stebi maždaug 15 minučių "ramybės" fazę.

Corydalis ekstraktų skiedimas 1:10000 sutrumpina šią "ramybės" fazę arba pradinę fazę, taip kaip matyti iš fig. 3. Esant aukštesnėms *corydalis* koncentracijoms, stebi greitą maksimalios normos vartimą be "ramybės" fazės.

Ekstraktas iš *eschsoltzia* taip pat privedė prie sutrumpintos pradinės fazės, bet ekstrakto *eschsoltzia* efektyvumas žymiai žemesnis už *corydalis* efektyvumą.

Kontroliniai bandymai parodė, kad atitinkamo etanolio kiekio dalyvavimas jokios įtakos reakcijai neturi. Be to, bandymai su pirolchinolinchinonu (PQQ) parodė, kad pridėjimas šio fiziologiškai labai įdomaus chinono neturi jokios įtakos pradinei fenoliazės reakcijos fazei. Ir hipericinas, kuris, kaip ir parachinonas galėtų daryti įtaką ramybės fazei, taip pat neturi įtakos reakcijai.

Šioje bandymų serijoje įdomus tas faktas, kad ekstraktas iš *corydalis* nors ir perstumia į priekį maksimalios tirozino vartimo normos momentą, bet neturi įtakos maksimaliai vartimo normai. Bandymai su skirtingos koncentracijos substratu grafike Lineweaver-Burk nerodo jokio persistūmimo K_m -fenoliazės reakcijos dydžio (žiūr. Fig. 4a-4f).

35

Kad būtų galima toliau paaiškinti tirozinazės reakcijos mechanizmą, dalinai įvertinant ramybės fazės

sutrumpėjimą, į bandomą pradinį mišinį prideda kitų medžiagų:

- 5 a) Vario druskų priedas neturėjo jokios įtakos fermentacinei reakcijai;
- 10 b) Askorbininė rūgštis kaip reduktorius - kaip tai žinoma iš literatūros gali paveikti ramybės stadiją, esant įvairiems reakcijų tipams. Visgi to negalima stebėti šios bandymų serijos ribose: askorbininė rūgštis nors ir negali pradėti tirozino pavirtimo į L-dopą, bet tuo pačiu trukdo jo tolimesnei oksidacijai iki dopachromo. Fenoliazės reakcijos nebuvo galima stebėti dalyvaujant askorbininei rūgščiai prie 303 nm laiko tarp 30 min., ramybės stadija dargi pailgėjo;
- 15 c) Kombinacija PQQ su askorbinine rūgštimi, be to, susidaro atstatyta forma PQQH₂, kuri galėjo veikti reakciją kaip diolis, taip pat pailgindama ramybės stadiją;
- 20 d) Priedas iš tikrų diolių kaip 3,4-dihidroksibenzolas ir D,L-dopa (dopa; 3,4-dioksifenilalanino), sutrumpina reakcijos ramybės stadiją (kai priedas 3,4-dioksifenilalaninas), dėl didesnio substrato kiekio taip pat padidėja dopachromo susidarymo greitis.

30 Fig. 5 parodyta fenoliazės reakcija dalyvaujant 3,4-dihidroksibenzolui. Fig. 6 parodo D,L-dopa įtaką fenoliazės reakcijai priklausomai nuo dopa koncentracijos. Kaip iš fig. 5, taip ir iš fig. 6 galima aiškiai matyti pavadintų dioliais įtaką ramybės stadijai.

35 3,4-dioksifenilalanino autooksidacijos, kuri vyksta prie šarminių pH dydžių, galima nepastebėti, arba tik truputį - prie pH 6,5.

Aukščiau nurodyti bandymai parodo, kad fenoliazės reakcijos pradinės fazės sutrumpėjimą gali sukelti tik pridėdami diolių. Chinolinas ir askorbininė rūgštis neturi jokios įtakos. Dėl to reikia laikyti, kad i ekstraktus *corydalis* ir *eschsoltzia* įeina orto-dioliai, kurie iššaukia greitą tirozino vartimą į 3,4-dioksifelalaniną. Toliau, tenka matyti, kad ekstraktai *corydalis* ir *eschsoltzia* ir gyvame organizme sukelia greitesnį tirozino vartimą ir tuo pačiu labiau padidintą dopa (3,4-dioksifenilalanino) koncentraciją.

2. Dopamin- β -hidroksilazės reakcijos tyrimas

15 Fermentas dopamin- β -hidroksilazė katalizuoja dopamino vartimą iki noradrenalino. Dopamin- β -hidroksilazė taip pat yra turintis vario fermentas. Hidroksilinimas vyksta deguoniui skylant ir kaip atstatančių agentų reikia askorbininės rūgšties ir fumarato, kad būtų regeneruotas vario atomo oksidavimo statusas.

Fermento aktyvumą nustato potenciometru molekulinės deguonies išeigos pagrindu. Atitinkamas bandymo priedas talpina sekančius komponentus:

25 po 100 μ l tiramino, fumarato, askorbato (kiekvienas 5 mmol);

1 ml fosfatinio buferinio tirpalo, pH 5 (100 mmol);

30 1 ml vandens;

100 μ l fermento (atitinkamai 0,1 vieneto).

35 Deguonies išeigos normas skaičiuo O_2 turinčio tirpalo pagrindu, kurio temperatūra $37^{\circ}C$, esant atitinkamam tūriui.

Kai pridedama *eschscholtzia* ekstrakto, vyksta pastebimas, nuo koncentracijos priklausomas fermentacinės reakcijos stabdymas, t.y. žymiai nuslopinamas šoninės grandinės hidroksilinimas. Buvo pastebėta, kad fermentinis aktyvumas sustabdomas taip pat etanolio. Vis tik stabdymas ekstraktu yra žymiai didesnis, taip kad galima išžiūrėti aiškų skirtumą.

Fig. 7 parodyta stabdymas dopamin- β -hidroksilazės *eschscholtzia* ekstraktu (kreivė A) ir vandeniniu 1% tirpalu *eschscholtzia* ir *corydalis* ekstraktų, kuriems atliktas sublimacinis džiovinimas, santykiu 20:1 (kreivė B) pagal išradimą.

Fig. 7 abi kreivės rodo ryškų fermentinio aktyvumo stabdymą. Šių kreivių skirtumai priklauso nuo etanolio ir *corydalis* ekstrakto (kreivė B) buvimo ar nebuvimo. Sumažėjusį fermentinio stabdymo poveikį, esant *eschscholtzia* ekstraktui, iš dalies galima paaiškinti skirtingų ekstrakto substratų deguonies išėiga. Nors ekstraktų *corydalis* ir *eschscholtzia*, kuriems atliktas sublimacinis džiovinimas, vandeninis tirpalas taip pat parodo deguonies išėigą su tiraminu, askorbatu ir fumaratu; vis tik stabdantis poveikis fermentui nesumažėja, dėl to čia labai apsunkinta efekto interpretacija.

Aukščiau pateikti bandymai aiškiai parodo, kad dopamin- β -hidroksilazės fermentą stabdo spiritiniu *eschscholtzia* ekstraktu (kreivė A), o taip pat ekstraktų *corydalis* ir *eschscholtzia*, kuriems atliktas sublimacinis džiovinimas, vandeniniu tirpalu (kreivė B), kas, esant pirokatechinamino apykaitai, priveda prie noradrenalino ir adrenalino susidarymo sumažėjimo. Šis stabdantis veikimas paaiškina vaistų pagal išradimą raminantį veikimą. Stabdymu palaikoma aukšta dopamino

koncentracija sukelia ir teigiama įtaką prie parkinsonizmo sindromo, kur suardytos dopaminerginės nervų ląstelės ir didelį dopamino kiekį galvos smegenyse tenka palaikyti dirbtinėmis priemonėmis.

5

3. Mono-amino-oksidazės reakcijos tyrimas

Kaip matyti iš fig. 1 dopa (3,4-dioksifenilalanino) arba dopamino koncentraciją taip pat reguliuoja jų suskaldymu monoaminooksidazėmis. Monoaminooksidazės paverčia pirminius aminus deguonies pagalba vandens aplinkoje į atitinkamą aldehydą, amoniaką ir vandenilio peroksidą stochiometrinio santykiu. Naudojama čia aminooksidazė buvo nupirktą firmoje Sigma Chemicals. Ši aminooksidazė labai panaši į substrato pavidalo benzilaminą. Todėl buvo atlikti žemiau pateikiami substrato pavidalo benzilamino tyrimai ir patikrinta *corydalis* ir *eschscholtzia* įtaka šios monoamino-oksidadės aktyvumui.

20

Benzilamino vartimą į benzilaldehidą monoaminooksidazės dėka nustatė fotometru ir potenciometru:

a) Fotometro pagalba suranda sudaromąjį benzaldehidą, kuris prie 241 nm turi aukštą molekulinį sugėrimo rodiklį ($1,2 \times 10^4$). Toks didelis jautrumas leidžia naudoti labai mažus fermento kiekius, kurie gali būti 0,01 ir 0,02 monoaminooksidazės vienetuose 2 ml reakciniame tūryje.

30

Atitinkamas bandymo priedas su bendru tūriu 2.000 μl apima:

50 μl 100 m mol vandenilio benzilamino -HCl tirpalo (atitinkamai 2,5 m mol);

35

100 m mol fosfatinio buferinio tirpalo , pH 7,4;

0,01 arba 0,02 vienetų (U) MAO, pridėto dalimis po 100 μ l į atitinkamą pagrindinį tirpalą;

5 etaloninė kiuvetė su buferiniu tirpalu, vandeniu ir benzilaminu.

Bandymuose su aukščiau aprašytu bandymo priedu po 10 minučių reakcijos laiko į matavimo kiuvetę ir etaloninę kiuvetę pylė atskiestus *eschsoltzia* ir *corydalis* ir nustatė pasikeitusį aktyvumą. Fig. 8 parodo benzaldehido 'susidarymo stabdymą priklausomai nuo *corydalis* koncentracijos (20 ar 40 μ l 1:10 pagrindinio ekstrakto atskiesto tirpalo).

15

Fig. 9 parodyta MAO aktyvumo stabdymas ekstraktu iš *eshsoltzia* prie skirtingų ekstrakto kiekių. Pastebimas ryškus MAO aktyvumo stabdymas.

20 Fig. 10 parodo MAO aktyvumo stabdanti veikimą, pridedant įvairias *eschsoltzia* ekstrakto (kreivė A), *corydalis* ekstrakto (kreivė B), ir ekstraktų *corydalis* ir *eschsoltzia* mišinio santykiu 20:80 (kreivė C). Geresniam bandymo rezultatų sulyginimui fig. 10 duota

25 stabdymo veiksmų schema %.

MAO aktyvumas kiekviename buvo priimtas 100 % (klampaus amonio sulfato - fermento pagrindu buvo sunku išreikšti pastovius siūlomo prekyboje fermento kiekius).

30

Bandymų įvertinimas rodo, kad *corydalis* ekstraktu sukelia saikingą MAO - aktyvumo stabdymą. Didesnę įtaką galima stebėti esant *eschsoltzia* ekstraktui. Žymus MAO stabdymas būna esant abiejų ekstraktų mišiniui,

35 sudarytam iš 80 % *eschsoltzia* ekstrakto ir 20 % *corydalis* ekstrakto.

- b) Potenciometru galima nustatyti reakciją benzilaminas + O_2 + $H_2O \rightarrow$ benzaldehidas + NH_3 + H_2O_2 dėl deguonies tūrio sumažėjimo reakciniame mišinyje platinos-deguonies elektrodo pagalba. Deguonies virtimo įrodymui reikia didesnio substrato ir fermento kiekio. Atitinkamas bandymo priedas talpino:
- 200 μ l 100 m mol benzilamino tirpalo (atitinkamai 10 m mol);
- 1.000 μ l 20 m mol fosfatinio buferinio tirpalo, pH 7,5 (atitinkamai 100 m mol);
- 1.000 μ l distiliuoto vandens, 0,054 MAO.
- Pridėjus 100 μ l *corydalis* ir *eschscholtzia* ekstraktų po 3 minučių reakcijos laiko galima apskaičiuoti įvairias deguonies virtimo normas.
- Deguonies elektrodo rezultatai parodo monoaminooksidazės aktyvumo sumažėjimą atskirų ekstraktų iš *corydalis* ir *eschscholtzia* dėka. Buvo patvirtintas stiprus *eschscholtzia* ekstrakto veikimas į MAO aktyvumą.
- Anksčiau pateikti pavyzdžiai rodo, kad galima pasiekti žymų MAO stabdymą ekstraktais iš *corydalis* ir *eschscholtzia* ir šių dviejų ekstraktų mišiniu. Iš čia galima padaryti išvadą, kad stabdant aminooksidazių aktyvumą plazmoje, aminams kaip ir dopaminui būdingas ilgesnis buvimo kraujyje laikas ir tuo pačiu jie ilgiau išlieka aktyvūs. Iš čia išplaukia vaistų teigiamas efektas pagal išradimą sušvelnėjus sudirginimui ir nervų disfunkcijoms ir jų pasėkoje gautoms depresijoms ypač prie dopamino deficito sindromo, tokio kaip parkinsonizmas.

PAVYZDŽIAI

I PAVYZDYS

5

Ekstrakto gavimas

10 Buvo gauti atskiri ekstraktai *corydalis cavae rhizoma*
ir *eschscholtzia colifornicae herba*. Atskirus
ekstraktus gavo ekstrakcijos būdu, naudojant
15 perkoliaciją, 50°C temperatūroje 16 valandų. Buvo
prisilaikoma santykio vaistiniai augalai - ekstraktas
2,5:10, t.y. iš 2,5 g atitinkamo vaistinio augalo gavo
10 ml vaistinio augalo ekstrakto. Ekstrahuojantis
agentas: 30 % etanolis.

Gautus tokiu būdu ekstraktus galima tiesiogiai naudoti
gaunant vaistų sudėtį arba liofilizacijos būdu galima
juos pakeisti į sausą ekstraktą.

20

2 PAVYZDYS

D,L-dihidroksifenilalanino įtaka fenoliazės reakcijai

25 Reakcijos sąlygos: fosfatinis buferinis tirpalas,
pH=6,5 100 m M, tirozinas 2 m M,
fenoliazė 20 V, D,L-dihidroksi-
fenilalaninas, kintamas kiekis

t (min.)	fenoliazė		+ DOPA 500 nM		+ DOPA 5 μ M		+ DOPA 50 μ M	
	mU	+/-	mU	+/-	mU	+/-	mU	+/-
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2			4	0	23	2,2	70	4,5
4			13	1,5	69	2,9	157	8,1
6	5	0,53	28	3,2	117	5,2	236	11
8	6	1,2	50	2,9	170	4,7	321	15
10	12	1,5	75	5,1	228	7,2	402	15
12	23	2,2	..	..	..	..	..	..
14	39	3,1						
16	60	4,7						
18	84	7,3						
20	139	18	291	14	554	16	775	29
..	..	..	..	..	..	..	..	..
30	404	32	562	28	883	21	1090	37

5 Kaip rodo fig. 6, DL-dopa gali žymiai sutrumpinti fenoliazės ramybės stadiją, be to, 5 μ M dopa iššaukia greitą dopachromo susidarymą. Su 50 μ M dopa, reakcijos pradžia, iššaukta fermento, jau vyksta su maksimalia virtimo norma.

10 Dopa autooksidacija, t.y. dopachromo susidarymas be fermento dalyvavimo, esant pH=6,5 stebimam laiko intervale nepastebėta.

15 Vienok DL-dopa yra ne bet koks diolis, o feniliazės substratas, kurio produktas vėl duoda dopachromą. Todėl žemiau (3 pavyzdyje) buvo atlikti palyginamieji tyrimai su 3,4-dihidroksibenzenu.

3 PAVYZDYS

3,4-dihidroksibenzeno (kaip starterio) veikimas i
5 fenoliazės reakcija.

Reakcijos sąlygos: fosfatinis buferinis tirpalas,
pH=6,5, 100 m M, tirozinas 2 m M,
10 fenoliazė 20 VU, 3,4-dihidroksi-
benzolo, kintamas kiekis

fenoliazė			+ 3,4-DHB 5μM		+ 3,4-DHB 50 μM	
t(min.)	mE	+/-	mE	+/-	mE	+/-
0	0	0	0	0	0	0
2			6	1,7	27	2,7
4			15	1,3	63	4,8
6	8	0,91	33	4,1	102	8,9
8	16	1,3	58	6,2	143	13
10	38	2,7	97	11	180	18
..	..	..	..	..	..	..
20	312	14	355	42	446	42
..	..	..	..	..	..	..
30	678	29	638	64	712	69

Tai parodo, kad orto-dihidroksibenzolas prie
koncentracijų 5 ir 50 μ mol gali sutrumpinti arba
15 panaikinti fenoliazės reakcijos ramybės stadiją (fig.
5).

4 PAVYZDYS

a) Michaelio konstantos nustatymas vykstant tirozino virtimui dėka fenoloksidazės.

5

Reakcijos sąlygos: fosfatinis buferinis tirpalas, pH=6,5,
100 m M, tirozinas 20 μ M iki 2 m M,
fenoliazė 20 U/prad. mišinį

Substrato koncentracija	Atvirkščia koncentracija 1/ (M)	Atvirkščia virtimo norma 1/ (mE/min.)
Sritis nuo 2 μ M iki 1 m M		
20 μ mol	0,05	0,27
40 μ mol	0,025	0,173
60 μ mol	0,0167	0,0116
80 μ mol	0,0125	0,098
100 μ mol	0,01	0,076
500 μ mol	0,002	0,044
1 m mol	0,001	0,040
$K_M = 141 \mu \text{ mol}$		

Sritis nuo 20 iki 70 μ mol

20 μ mol	0,05	0,163
30 μ mol	0,033	0,125
40 μ mol	0,025	0,100
50 μ mol	0,020	0,081
70 μ mol	0,014	0,061

$$K_M = 145 \mu \text{ mol}$$

Sritis nuo 100 iki 20 $\mu \text{ mol}$

100 $\mu \text{ mol}$	0,01	0,0555
120 $\mu \text{ mol}$	0,0083	0,0525
140 $\mu \text{ mol}$	0,0071	0,0475
160 $\mu \text{ mol}$	0,0063	0,0435
180 $\mu \text{ mol}$	0,0056	0,0415
200 $\mu \text{ mol}$	0,005	0,40

$$K_M = 142 \mu \text{ mol}$$

Sritis nuo 1 iki 2 $\mu \text{ mol}$

1000 $\mu \text{ mol}$	0,001	0,03352
1400 $\mu \text{ mol}$	0,00071	0,0340
1800 $\mu \text{ mol}$	0,00055	0,0334
2000 $\mu \text{ mol}$	0,0005	0,0330

$$K_M = 137 \mu \text{ mol}$$

Rezultatai pateikti figūrose 4c - 4f.

5 b) Michaelio konstanta reakcijoje, esant *corydalis* ekstraktui

10 Virtimo normos tyrinėjimai su *corydalis* ekstraktu atliekami praskiedžiant ekstraktą 1:200. Šis ekstrakto kiekis ankstesniuose bandymuose tuoj pat sukeldavo pilną fermentacinį aktyvumą, pradinė fazė sudaro 0 minučių.

Dydžio K_M nustatymas parodo, esant *corydalis* ekstraktui, šiek tiek padidėjusį išsibarstymą, bet yra vienodoje koncentracijų sferoje.

5 Michaelio konstantos, esant *corydalis* ekstraktui.

Reakcijos sąlygos: fosfatinis buferinis tirpalas, pH=6,5, 100 m M, tirozinas 20 μ M iki 2 m M, fenoliazė 20 U/prad. mišini, *corydalis* ekstraktas 1:2000

10

Substrato koncentracija	Atvirkščia koncentracija 1/ (M)	Atvirkščia virtimo norma 1/ (mE/min.)	
Sritis nuo 20 iki 100 μ mol			
20 μ mol	0,05	0,0083	0,262
30 μ mol	0,033	0,057	
40 μ mol	0,025	0,045	
50 μ mol	0,020	0,040	
60 μ mol	0,017	0,033	0,10
70 μ mol	0,014	0,030	
100 μ mol			0,080
		$K_M =$ 164 μ mol	137 μ M
Sritis nuo 100 iki 200 μ mol			
100 μ mol	0,01	0,0500	
120 μ mol	0,0083	0,0435	
140 μ mol	0,0071	0,0414	
160 μ mol	0,0063	0,0383	
180 μ mol	0,0056	0,0370	
200 μ mol	0,005	0,0344	
		$K_M =$ 151 μ mol	

Rezultatai parodyti figūrose 4a ir 4b.

5 PAVYZDYS

5 a) *Corydalis* ekstrakto įtaka

Kaip matyti iš žemiau pateiktos lentelės ir fig. 8, ekstraktas iš *corydalis cava* stabdo MAO aktyvumą. Naudoja 20 ar 40 μ l 1:10 praskiesto ekstrakto tirpalo (2 ar 4 μ l pradinės medžiagos). Šie kiekiai atitinka, perskaičiavus į bendrą reakcijos tūrį 2 ml, atskiedimo 1:1000 ar 1:500. Paties ekstrakto absorbcija prie 241 nm dėka daugelio aromatinių junginių trukdo tyrinėti didesnius ekstrakto kiekius, nes šiuo atveju neišmanoma ilgiau subalansuoti reakciją etaloninėje kiuvetėje.

MAO aktyvumas (mE/min) veikiant *corydalis*

Reakcijos sąlygos: fosfatinis buferinis tirpalas, pH=7,4, 100 m M, benzilaminas 2,5 m M, monoaminooksidazė 0,01, 0,02 vienetų/pradinį mišinį, *corydalis* ekstraktas, 1:10, besikeičiantis kiekis

25

benzaldehidas (mE/min)		
	0,01 U MAO	0,02 U MAO
	8,35 $\pm$ 0,50 (100%)	18,4 $\pm$ 1,00 (100%)
+ 2 μ l COR	6,30 $\pm$ 0,02 (75%)	12,6 $\pm$ 1 % (68,5%)
+ 4 μ l COR	5,50 $\pm$ 0,00 (65,9%)	12,2 $\pm$ 0,45 (66,3%)

Rezultatai parodyti fig. 8.

b) *Eschscholtzia* ekstrakto įtaka.

Esant padidintam *eschschooltzia* ekstrakto skaidrumui, šiame tyrime galima naudoti 20,40 ar 60 µl 1:10 atskiesto tirpalo. Šiuo atveju pradiniam reakciniam mišinyje yra 1:1000, 1:500 arba 1:330 atskiesto *eschschooltzia* ekstrakto tirpalo. Žemiau pateikta lentelė ir fig. 9 paaiškina aukštą šio ekstrakto stabdymo sugebėjimą: jau atskiedus 1:500 monoamino oksidazės aktyvumas laikosi tiksliai žemiau 50%, o atskiedus 1:300 fermento aktyvumas sumažėja iki trečdaliao pradinio dydžio.

MAO aktyvumas veikiant *eschschooltzia*

Reakcijos sąlygos: fosfatinis buferinis tirpalas, pH=7,4, 100 m M, benzilaminas 2,5 m M, monoamino oksidazė 0,01, 0,02 U/prad. mišinį, *eschschooltzia* ekstraktas, 1:10 keičiasi

benzaldehydas (mE/min)		
MAO	0,01 U	0,02 U
	10,3+/-1,50 (100%)	20,0+/-0,30 (100%)
2 µl ESCH	6,75 / 0,25 (55,5%)	11,8 / 0,55 (59%)
4 µl	4,50 / 0,00 (43,7%)	8,50 / 0,30 (43,5%)
6 µl	3,50 / 0,00 (33,9%)	7,50 / 0,30 (37,5%)

Rezultatai parodyti fig. 9.

6 PAVYZDYS

Farmacinio preparato gavimas

25

a) Tinktūros gavimas

Tinktūrai gauti sumaišė pagal 1 pavyzdį gautus vaistinių augalų spiritinius ekstraktus, naudojant 20 ml vaistinių augalų *corydalis cavae rhizoma* ekstrakto ir 80 ml vaistinių augalų *eschschooltzia*

californicae herba ekstrakto. Gauta 100 ml paruoštos naudojimui tinktūros.

b) Tablečių gavimas

- 5 Gautus pagal 1 pavyzdį ekstraktus iš *corydalis cavae rhizoma* ir *eschscholtzia californicae herba* džiovino (pavyzdžiui, liofilizacijos būdu), ir sausus ekstraktus sumaišė svorių santykiu *eschscholtzia/corydalis* = 4/1
- 10 kartu su susmulkintu į miltelius krakmolu (kaip farmacinis nešiklis) ir formavo tabletes tablečių prese (0,5 g, diametras 0,6 cm). Aktyvaus ingrediento ekstraktų kiekis tabletėse sudarė 2 svorio %.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Vaistai, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie sudaryti iš aktyvių ingredientų ekstraktų, gautų iš
5 *corydalis* ir *eschschooltzia* spiritinio ekstrakto (2,5:10), pasirinktinai drauge su įprastais priedais, kuriuose *eschschooltzia* ir *corydalis* ekstraktų svorio santykis yra nuo 20:1 iki 1:1 ribose.
- 10 2. Vaistai pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie turi vandeninio ir/arba spiritinio tirpalo ekstraktų miltelių pavidalą.
3. Vaistai pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i -
15 r i a n t y s tuo, kad jie turi vaisto spiritinio ekstrakto pavidalą.
4. Vaistai pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie pateikiami spiritinio ekstrakto pavidalu.
20
5. Vaistai pagal bet kurią iš 1-4 punktų, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad *eschschooltzia* ir *corydalis* spiritinių ekstraktų santykis sudaro nuo 10:1 iki 2:1.
- 25 6. Vaistai pagal bet kurią iš 1-4 punktų, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad *eschschooltzia* ir *corydalis* santykis, perskaičiavus į gydomųjų augalų ekstraktus, sudaro 4:1.
- 30 7. Vaistai pagal bet kurią iš 1-6 punktų, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad į juos kaip aktyvios medžiagos įeina *corydalis cavae rhizoma* ir *eschschooltzia californicae* herba ekstraktai.
- 35 8. Vaistai pagal bet kurią iš 1-7 punktų, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad jie turi peroralinio naudojimo vaistinę formą.

9. Vaistai pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t y s
tuo, kad jie turi tablečių, draže, kapsulių arba
tinktūrų pavidalą.
- 5 10. Vaistai pagal 1-9 punktą, skirti naudoti
sudirginimo būsenoms ir nervinėms disfunkcijoms, kurios
pagrįstos amino balanso sutrikimu, sušvelninimui arba
pašalinimui.
- 10 11. *Corydalis* ir *eschschooltzia* ekstraktas, gautas
ekstrahuojant alkoholiu (2,5:10) skirtas gydyti
sudirginimo būsenas ir nervinės disfunkcijas, kurios
pagrįstos amino balanso sutrikimu.
- 15 12. Panaudojimas ekstrakto gauto ekstrahuojant spiritu
corydalis ir *eschschooltzia* (2,5:10) gaminti vaistus,
sušvelninančius arba pašalinančius sudirginimo būsenas
ir nervinės disfunkcijas, kurios pagrįstos amino
balanso sutrikimu.
- 20 13. Panaudojimas pagal 12 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad gamina vaistus sudirginimo
būsenos ir nervinės disfunkcijos, pagrįstos sumažinta
dopa/dopamino koncentracija paciento medžiagų
25 apykaitoje.
14. Panaudojimas pagal 12 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad gamina vaistus sušvelninti arba
pašalinti depresijas.
- 30 15. Panaudojimas pagal 12 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad gamina vaistus sušvelninti
parkinsonizmo negalavimus.

Fig.1

Pirokatechinamino medžiagų apykaitos schema

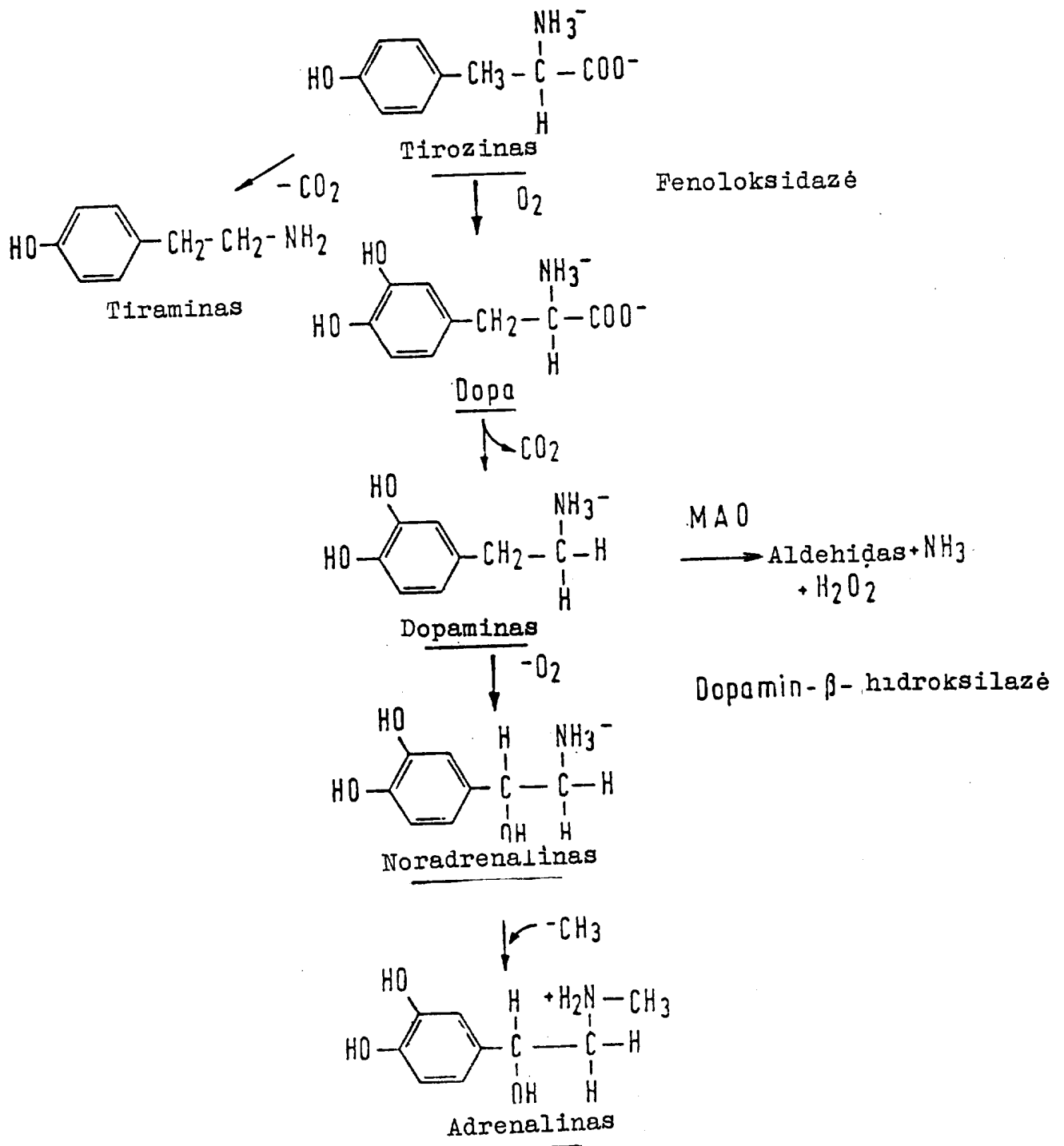


Fig. 2

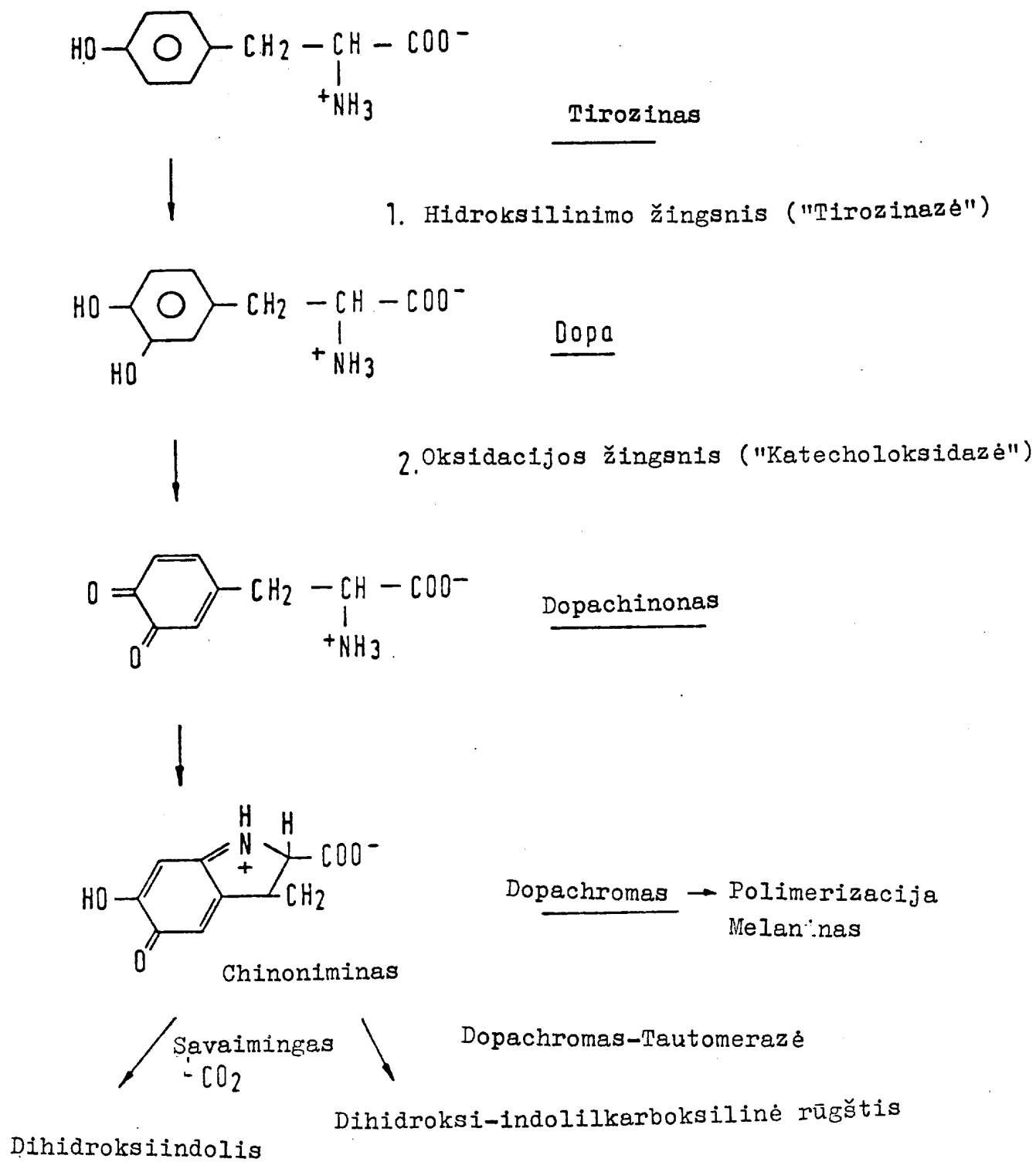


Fig.3

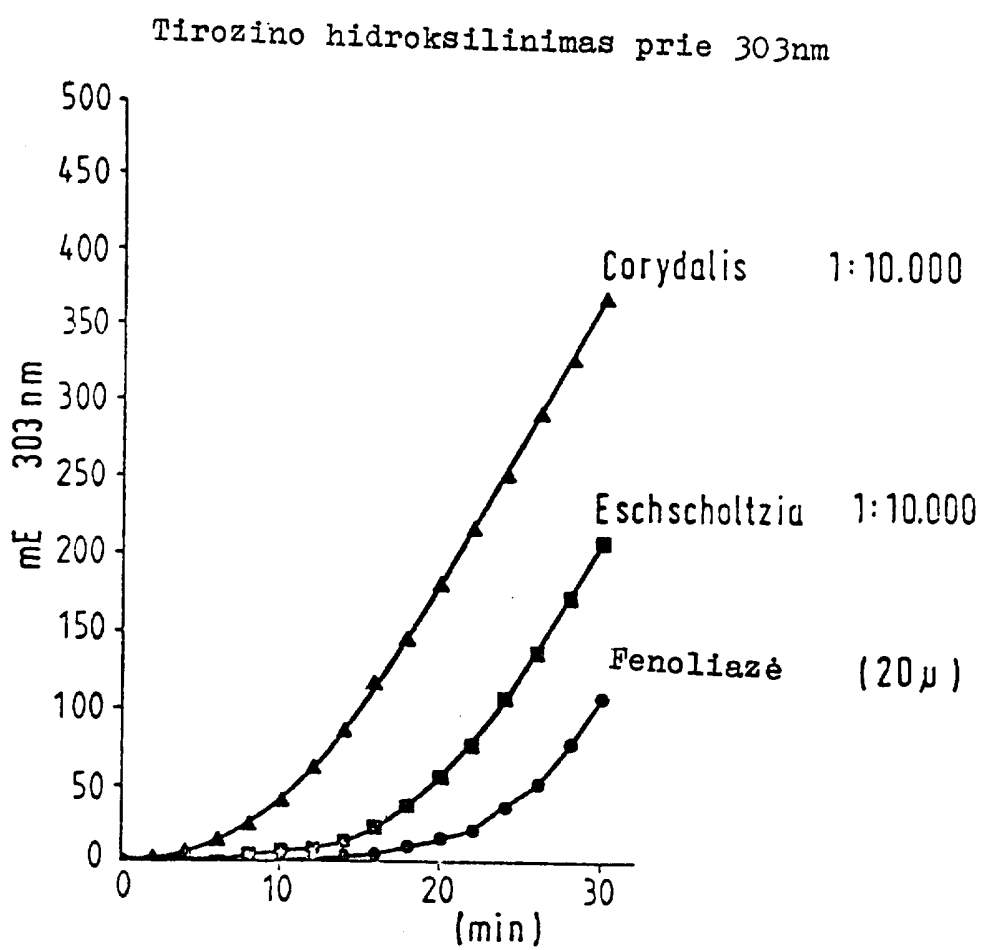


Fig. 4 a

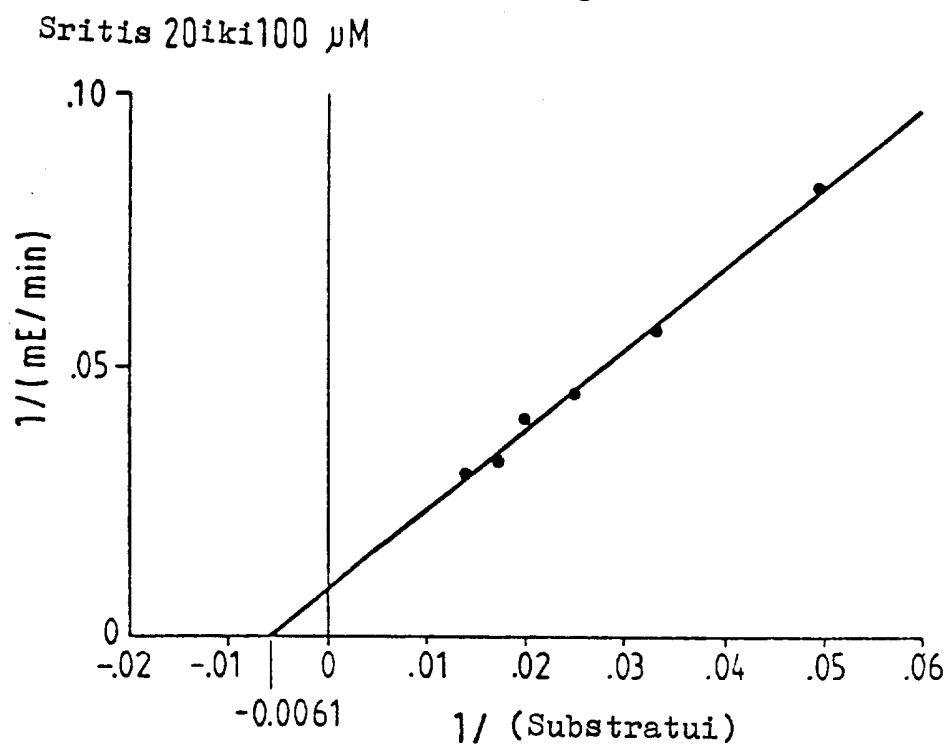


Fig. 4 b

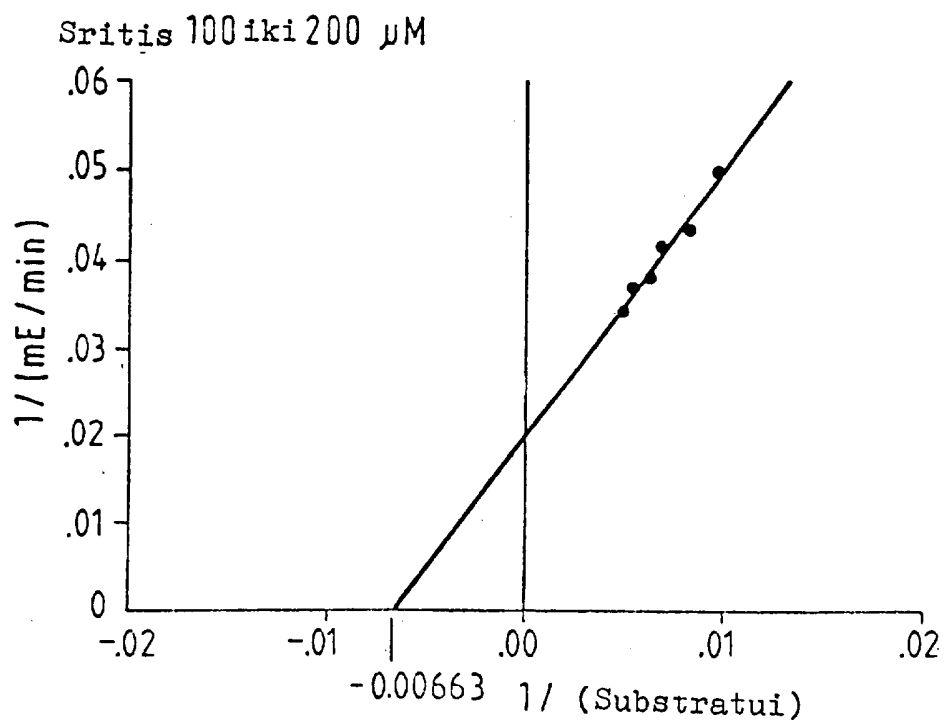


Fig. 4c

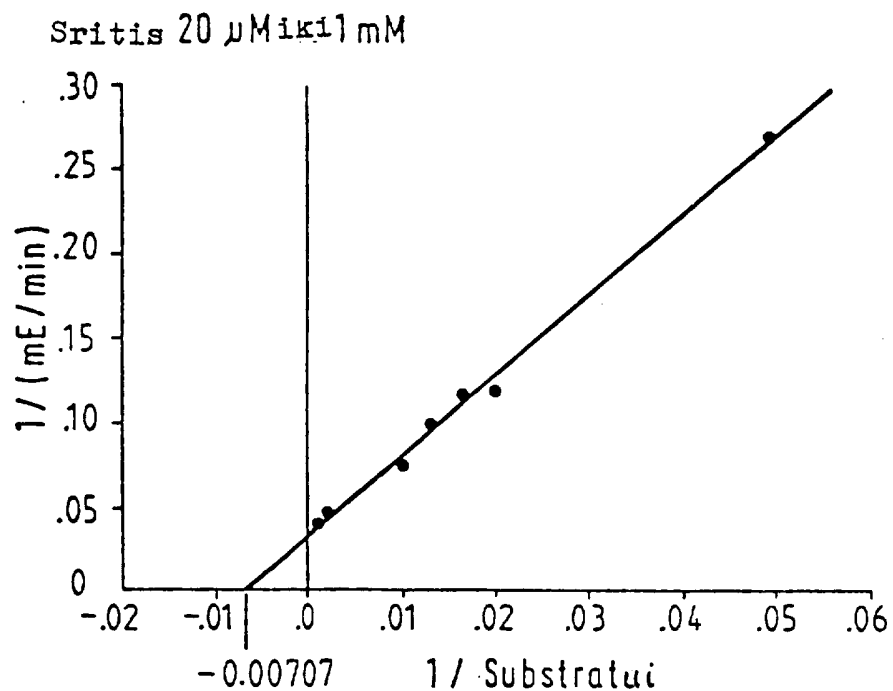


Fig. 4d

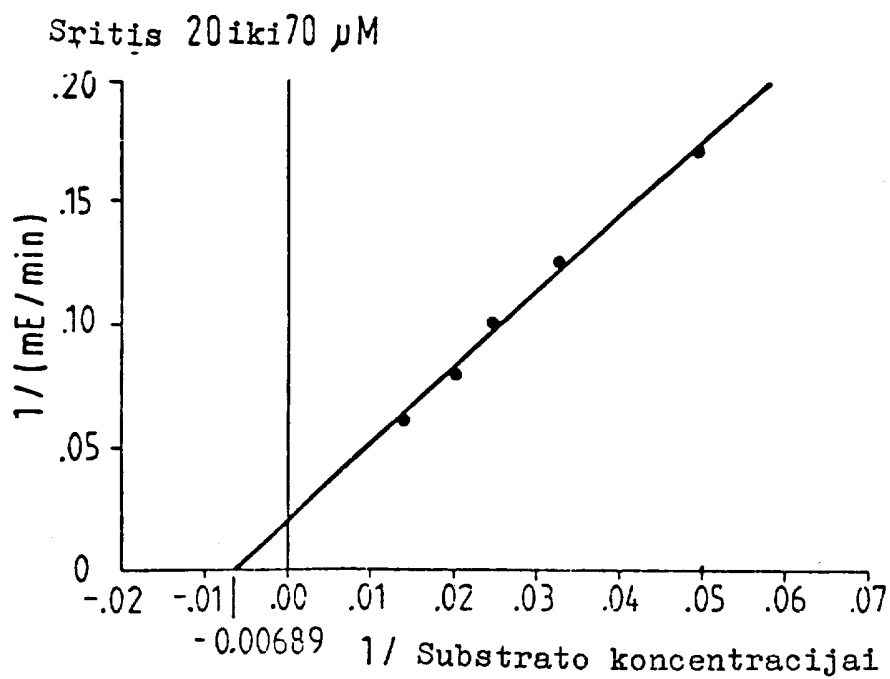


Fig. 4e

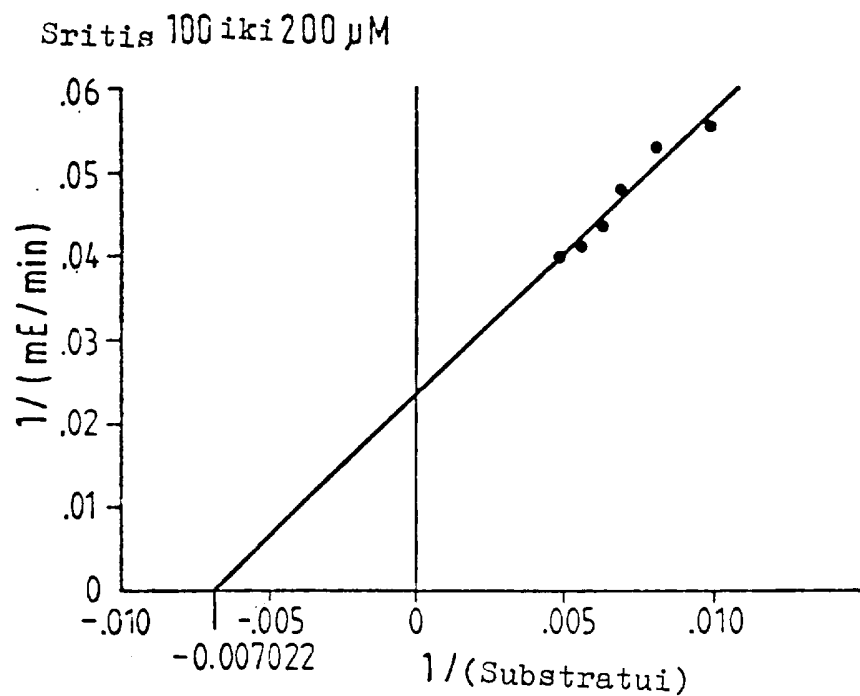


Fig. 4f

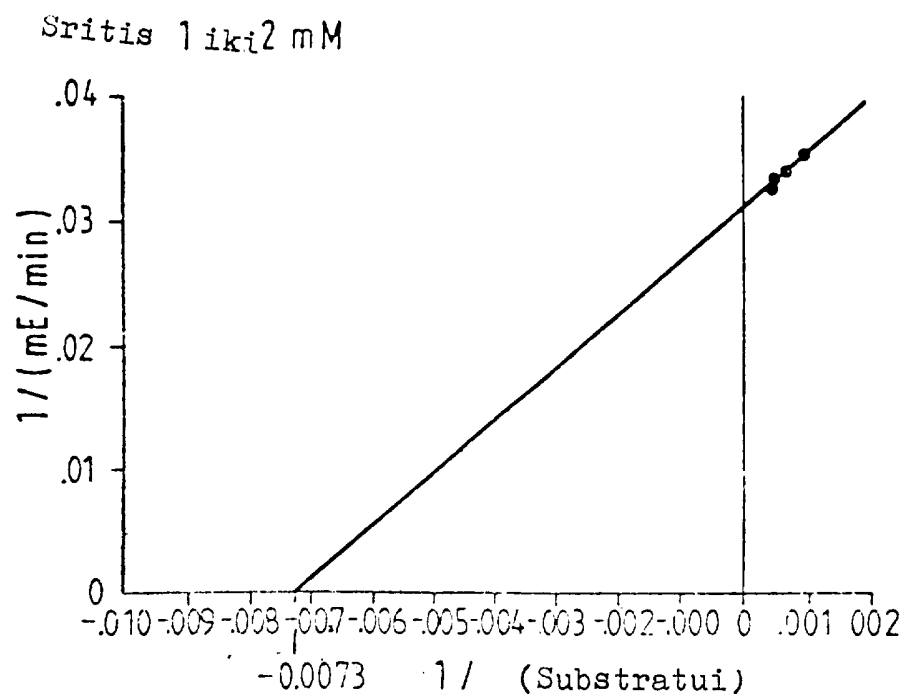


Fig. 5

Fenoliazės reakcija dalyvaujant 3,4-Dihidroksibenzolui

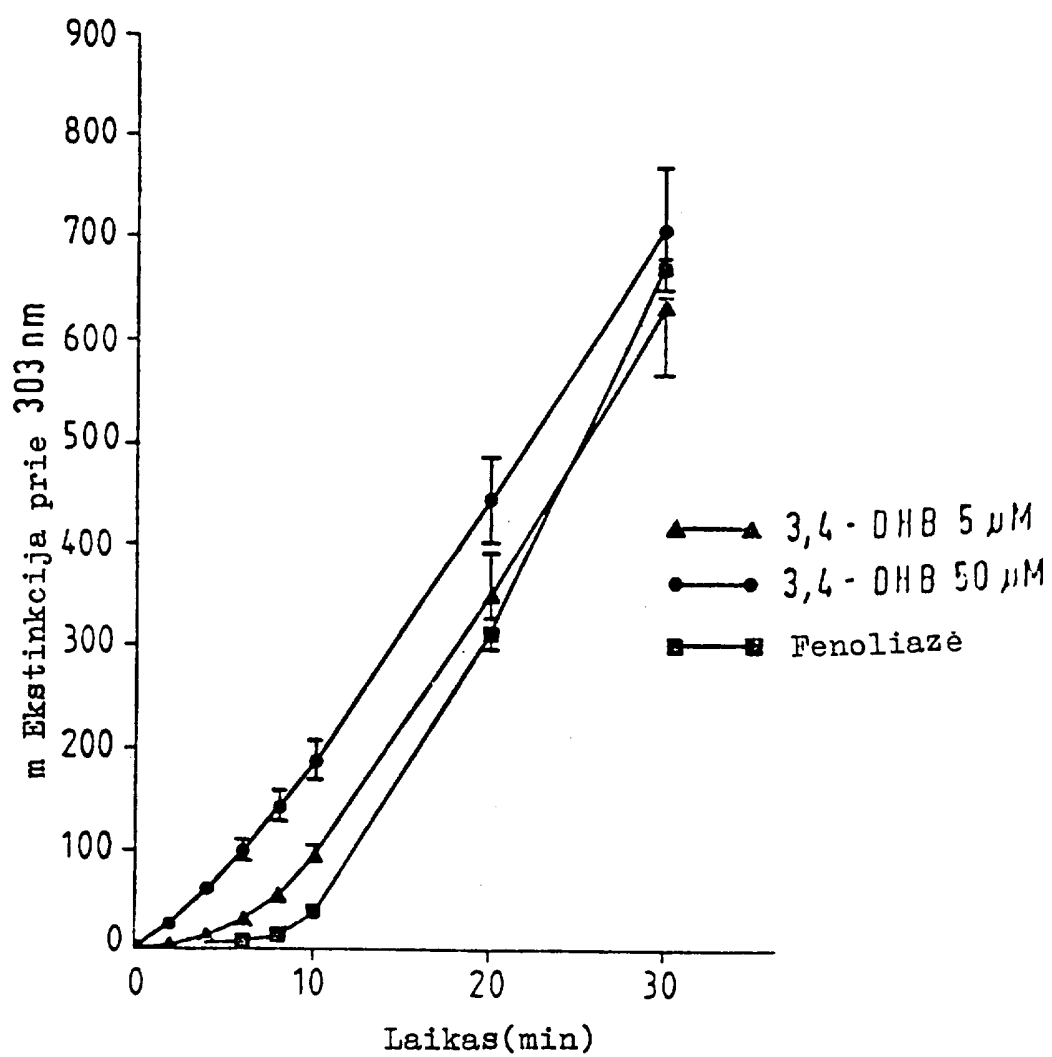


Fig. 6

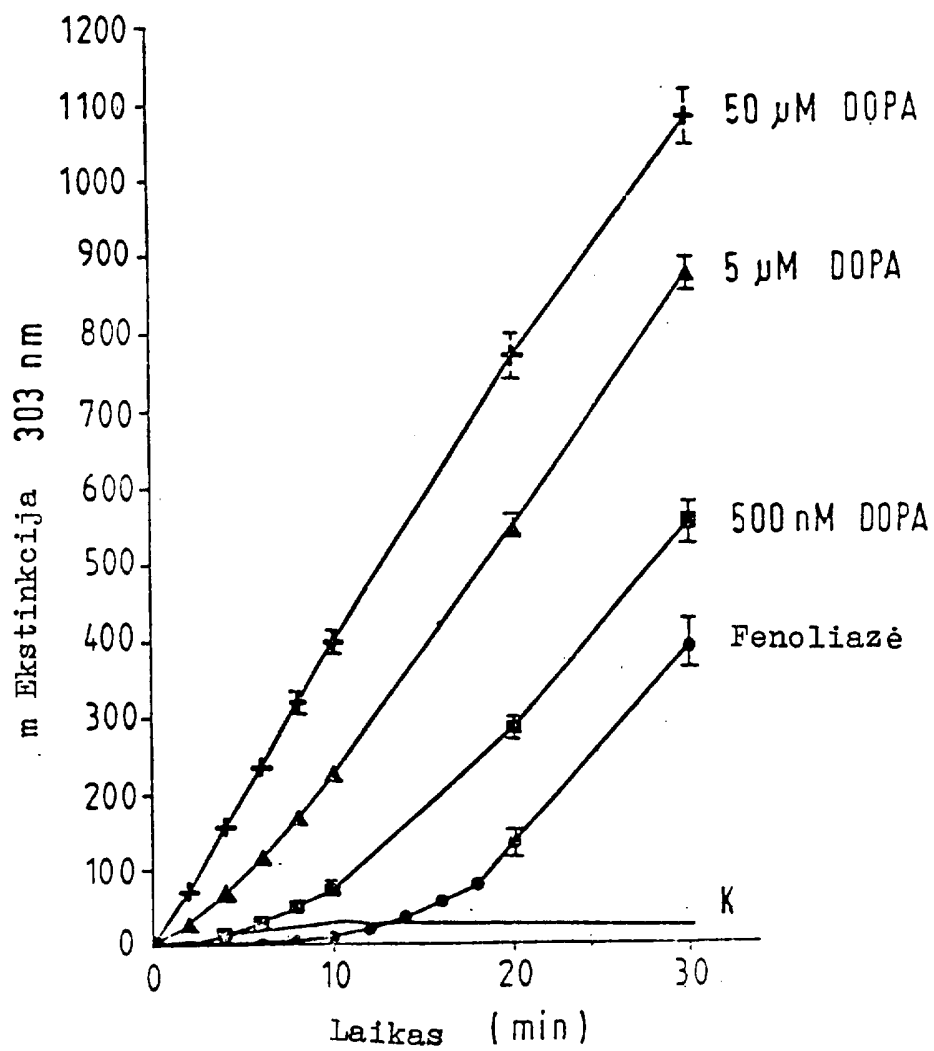


Fig. 7

Stabdymas Dopamin- β - hidroksilaze

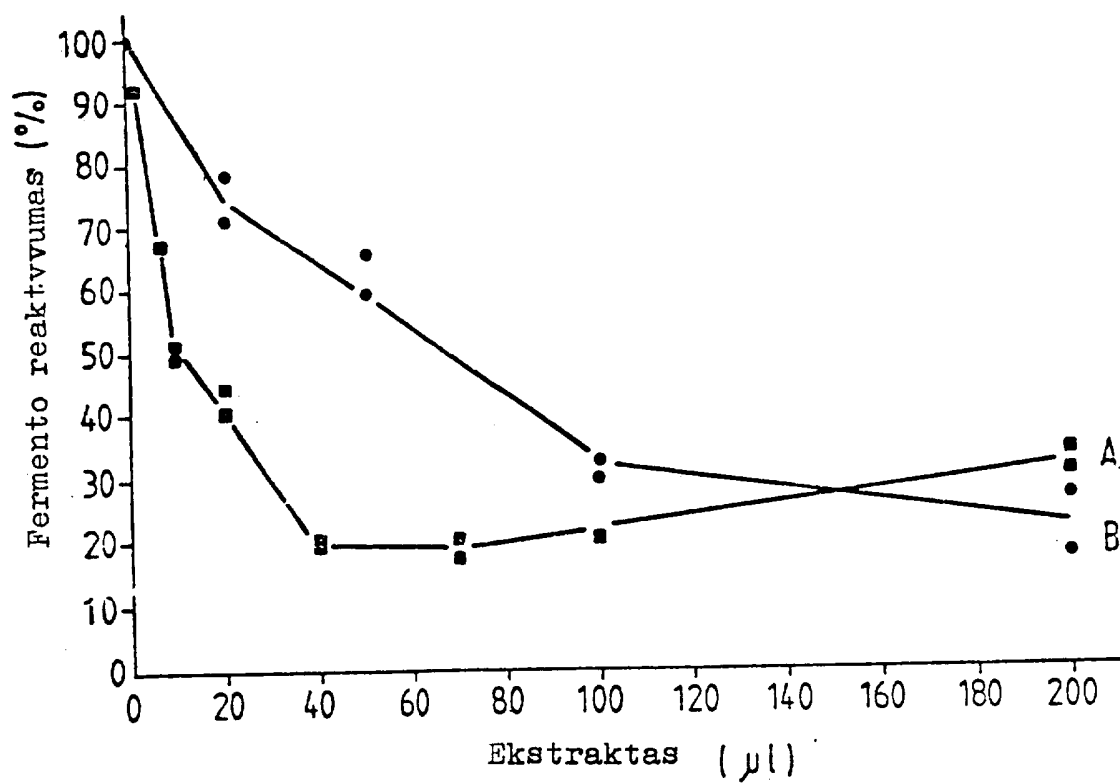


Fig. 8

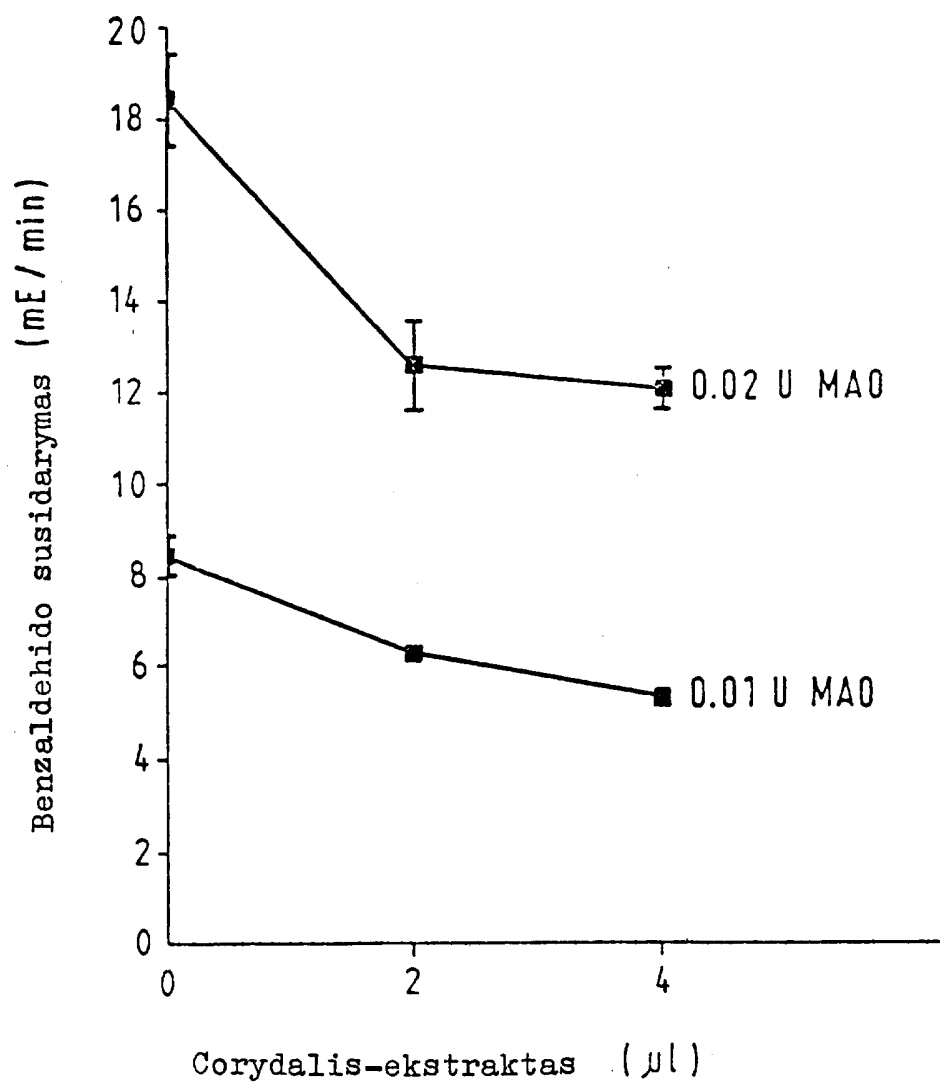


Fig. 9

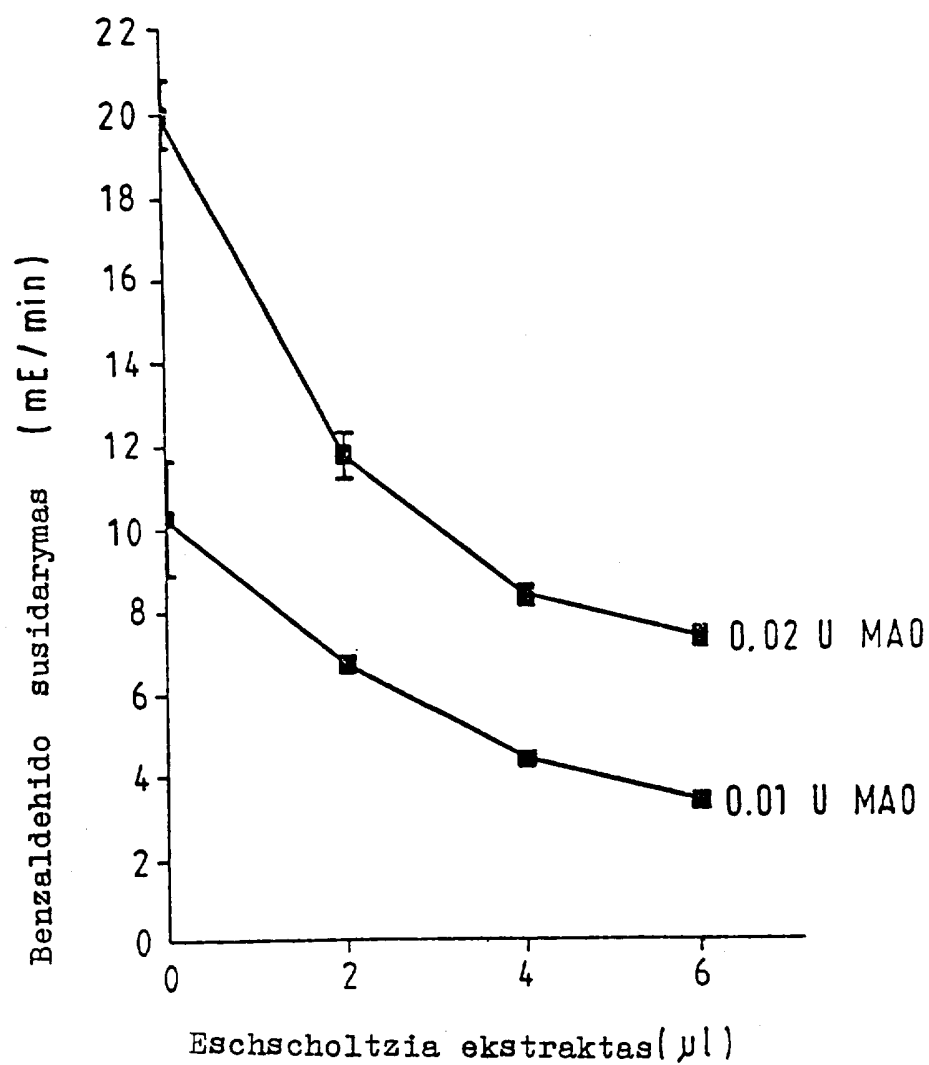


Fig. 10

%Stabdymas (241 nm)

