

(19)



(10) **LT 4144 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **4144**

(51) Int. Cl.⁶: **A61K 35/78**

(21) Paraiškos numeris: **95-064**

(22) Paraiškos padavimo data: **1995 06 08**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1996 12 27**

(45) Patento paskelbimo data: **1997 04 25**

(72) Išradėjas:

Valdimaras Janulis, LT

Vladimir Glyzin, RU

Sergej Nikolaev, RU

Larisa Šantalova, RU

Aleksandr Mandadaev, RU

(73) Patento savininkas:

Kauno medicinos akademija, A. Mickevičiaus g. 9, 3000 Kaunas, LT

(54) Pavadinimas:

**Preparato, pasižyminčio priešuždegiminiu ir hipoazoteminiu veikimu,
gamybos būdas**

(57) Referatas:

Išradimas priklauso medicinos sričiai, o būtent farmacijos pramonei ir susijęs su preparato, pasižyminčio priešuždegiminiu ir hipoazoteminiu veikimu, gaminimu iš augalinės žaliavos.

Išradimo esmė yra tame, kad ekstrahuojant augalinę žaliavą etilo spiritu, koncentruojant ir valant ekstraktą, naudoja kanadinio desmodiumo (*Desmodium canadense* D. C.) žolę, ekstrahuoja ją 90 % etilo spiritu, ekstraktą valo želatinos tirpalu santykiu 1:2, separuoja ir džiovina išpurškiamojoje džiovylkoje.

Išradimas priklauso medicinos sričiai, o būtent farmacijos pramonei, ir susijęs su preparato, pasižyminčio priešūždegiminiu ir hipoazoteminiu veikimu, gaminimu iš augalinės žaliavos.

Žinomas flavonglikozidų, pasižyminčių priešūždegiminiu ir antimikrobinu veikimu, gavimo būdas iš *Desmodium canadense* D.C. žolės, ekstrahuojant augalinę žaliavą etilo spiritu, koncentruojant spiritines ištraukas, ištirpinant likutį vandenyje, valant dichloreтанu, flavonoidus ekstrahuojant n-butilo spiritu, praplaunant butanolines ištraukas vandeniui, koncentruojant butanolines ištraukas iki sauso likučio ir gaunant galutinį gamybos produktą, kurio išeiga yra 0,6-0,7% nuo žaliavos masės (žr. buv. TSRS aut. liud. Nr. 571949, TPK A 61 K 35/78, 1978).

Žinomo būdo trūkumai yra tie: 1) kad ekstrakto valymui naudojamas dichloreтанas - nuodingas organinis tirpiklis. 2) Flavonoidų išskyrimui naudojamas n-butilo alkoholis. 3) Panaudojant žinomą flavonglikozidų gavimo būdą, gaunama maža preparato išeiga. Išradimo tikslas - preparato pasižyminčio, priešūždegiminiu ir hipozoteminiu veikimu gamybos būdo sukurimas. Nurodytas tikslas pasiekiamas tuo, kad preparatas, pasižymintis hipoazoteminiu ir priešūždegiminiu poveikiu, gaminamas ekstrahuojant augalinę žaliavą etilo alkoholiu, koncentruojant spiritines ištraukas ir valant ekstraktą. Kanadinio desmodiumo (*Desmodium canadense* D.C.) žolę ekstrahuoja 90% etilo alkoholiu, o ekstrakto valymą atlieka 0,3% želatinos tirpalu (ekstraktas : želatinos tirpalas, 2:1) ir po to ekstraktą separuoja ir džiovina išpurškiamoje džiovykloje. Galutinio produkto išeiga sudaro 7,58% nuo žaliavos masės.

Koncentruoto ekstrakto išvalymui panaudoja 0,3% želatinos tirpalą santykiu 1:2. Šis santykis pasirinktas atlikus bandymus, kuriuose želatinos tirpalas ir ekstraktas buvo naudojami santykiais 1:1, 1:2, 1:3. Naudojant želatinos tirpalą santykiu 1:2, pasiekia geriausią chlorofilo ir rauginių medžiagų nusodinimą iš ekstrakto ir po to jų geriausią atskyrimą separavimo metodu. Naudojant kitus santykius, negalima kokybiškai išvalyti koncentruoto ekstrakto.

1. Pareiškiamo preparato gamybos būdo pavyzdys.

15,6 kg *Desmodium canadense* D.C. žolės susmulkina iki 5 mm didumo dalelių. Susmulkintą žaliavą pakrauna į ekstraktorių su maišykle ir išoriniu šildytuvu. Ją užpila 155 l trečios ištraukos nuo ankstesnės įkrovos ir 45 l 90% etilo alkoholio (santykiu žaliava:ekstrahentas 1:10) ir 50 l etilo alkoholio pseudodugnui

po ekstraktoriumi užpildyti). Ekstrahuoja (60-70) °C temperatūroje, nuolat maišant 2 valandas. Ištrauką supila į surinktuvą. Antrajai ekstrakcijai užpila 90% etilo alkoholio kiekį, lygų nupiltam, ir vėl ekstrahuoja 1 valandą, o po to ekstrakciją pakartoja. Pirmos ekstrakcijos metu gauna 155 l ištraukos, antros - 156 l ir trečios - 155 l. Pirmą ir antrą ištraukas koncentruoja kartu iki 6 l. Trečią ištrauką naudoja naujos augalinės žaliavos ekstrakcijai. Į koncentruotą ekstraktą, maišant supila 3 l 0,3% želatinos tirpalo. Išsiskyrusias balastines medžiagas atskiria separavimu. Gauna 9 l išvalyto ekstrakto, kurį džiovina išpurškiamojoje džiovvykloje. Preparato išeiga 0,715 kg, kas sudaro 7,58% nuo augalinės žaliavos masės. Preparate yra 20,26 % flavonoidų, perskaičiavus į izoorientiną.

2. Pavyzdys *Desmodium canadense* D.C. sauso ekstrakto priešūždegiminio aktyvumo tyrimai.

Atliko eksperimentus su 30-čia abiejų lyčių baltų neveislinių (180-200) g masės žiurkių. Tyrė pareiškiamu būdu gauto preparato poveikį uždegimo eksudacinei fazei pagal metodiką (žr. Strelnikov J.E. Sravnitel'naja charakteristika protivovospalitel'novo deistvija nekotoryx pirimidinovyx proizvodnyx. // Farmakologija i toksikologija -1960. -Nr 6. -S. 526-531). Likus 3 valandoms iki 0,1 ml 3% formalino tirpalo subplantarinio sušvirkštimo į dešinę užpakalinę letenėlę baltoms žiurkėms, o paskui po 5 ir 18 valandų gyvūnams zondų į skrandį, suleido vaistus, gautus pareiškiamu būdu. Vaistus vartojo tirpalo pavidalu, dozuojant 25; 50; 100 mg/kg ir suleidžiant po 1 ml/100 g žiurkės kūno masės. Kontrolinės grupės gyvūnams leido tokį pat kiekį distiliuoto vandens. Palyginimui naudojo preparatą "Kaleflon" eksperimentine terapine doze 100 mg/kg. Po 24 val. nuo formalino suleidimo žiurkės dekapitavo lengvos narkozės fone, amputavo užpakalines letenėles kelio sąnaryje. Tyrimų duomenys apie pareiškiamu būdu gauto preparato poveikį žiurkių letenėlių formalininio uždegimo pabrinkimo eksudacinei fazei pateikti 1 lentelėje.

Iš 1 lentelės duomenų matome, kad preparatas, gautas pareiškiamu būdu, visomis tyrinėtomis dozėmis turi antieksudacinį poveikį. Be to, jo efektyvumas koreliuoja su preparato dozės didinimu. Vartojant jį 25 mg/kg doze, aptinkama tik pabrinkimo masės mažėjimo tendencija (skirtumas nėra patikimas); 50 mg/kg dozė sukelia patikimą šio rodiklio sumažėjimą. Labiausiai išreikštas antieksudacinis preparato poveikis - 100 mg/kg dozei, pabrinkimo išsivystymo sustabdymas siekia 21,7%. Tokiu būdu, preparato gauto siūlomą būdu antieksudacinis aktyvumas yra didesnis, vartojant jį dozėmis 50 ir 100 mg/kg, negu toks pat veikimas palyginamojo preparato "Kaleflon".

1 lentelė

Preparato pavadinimas	Dozė, mg/kg	Letenėlių masės skirtumas, mg	Pabrinkimo masės sumažėjimo %
1	2	3	4
Distiliuotas vanduo	-	847,2 + 49,0	-
Pareiškiamu būdu siūlomas preparatas	25	783,5 + 68,6	7,55
Pareiškiamu būdu siūlomas preparatas	50	742,7 + 70,2*	12,3
Pareiškiamu būdu siūlomas preparatas	100	663,5 + 20,3*	21,7
"Kaleflonas"	100	789,4 + 42,5	6,8

Pastaba: * Reikšmės pasikliaujamai skiriasi nuo kontrolinės grupės duomenų.

3. Pavyzdys. Pareiškiamo preparato poveikio alteraciniams procesams uždegimo židinyje tyrimai.

Eksperimentus atliko su 40 neveislinių baltų abiejų lyčių žiurkėmis. Uždegimo modeliavimą atliko Menkino metodu (žr. Oivin I.A., Setel S.L. Metodika izučenija mestnyx narušenij kapiliarnoj pronicaemosti. // Materialy po patogenesu vospalenija i patologii belkov krovi: Tr. Stalinobadskovo med. in-ta. - Dušambe, 1962. -T.49. -No 5. -S. 167-173.) įleidžiant 0,5 ml 9% acto rūgšties tirpalo po oda į nugaros sritį nuo kurios iš anksto nuskuto plaukus. Tuo pat metu į pilvo sritį, injekavo 300 mg/kg dozę dekstrano tirpalo (žr. Berezovskaya J., Belochapko A., Vlasova M., Kinzirsky A. Some aspects of testing drugs for nephrotoxicity in rats. // Arch. Toxicol. -1980. -Suppl.4. -P. 184-193). Pareiškiamu būdu gautą preparatą įvedė dozėmis 25, 50 ir 100 mg/kg pirmą kartą, likus 1 val. iki acto rūgšties suleidimo, o po to - 1 kartą per parą 25 dienų laikotarpyje kasdien. Vienos kontrolinės grupės gyvūnai tuo pačiu laiku gavo analogišką kiekį distiliuoto vandens, kitos grupės gyvūnams naudojo preparatą "Kaleflon" doze 100 mg/kg. Nekrotizuoto audinio plotą vertino 2, 9 ir 25 eksperimento parą, pažymint nekrozės plotą ant permatomos juostelės. Tyrimų duomenys apie pareiškiamo preparato poveikį žiurkių uždegiminio proceso alteracijos fazei pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė

Preparato pavadinimas	Preparato kiekis, mg/kg	Alteracijos plotas, cm ²		
		2 para	9 para	25 para
Distiliuotas vanduo	-	2,13 + 0,26	4,15 + 0,45	0,67 + 0,19
Pareiškiamas preparatas, %	25	2,11 + 0,39 1	2,43 + 0,36* 41	0,45 + 0,11 33
Pareiškiamas preparatas, %	50	1,41 + 0,36* 34	1,67 + 0,14* 60	0,09 + 0,03* 87
Pareiškiamas preparatas, %	100	1,44 + 0,31 33	3,10 + 0,34* 25	0,69 + 0,03 0
"Kaleflonas" %	100	1,09 + 0,22* 49	2,00 + 0,30* 52	0,39 + 0,13* 42

Pastaba: * Reikšmės pasikliaujamai skiriasi nuo kontrolinės grupės duomenų.

Kaip matome iš 2 lentelės duomenų, pareiškiamas preparatas visomis tirtomis dozėmis sumažina audinio pažeidimo laipsnį, slopina alteracinių procesų vystymąsi, o taip pat greitina pažeisto audinio regeneraciją uždegiminiame židinyje. Labiausiai išreikštas prieš uždegiminis poveikis nustatytas naudojant preparatą 50 mg/kg doze. Šiuo atveju preparatas atskleidė apsauginį aktyvumą, sumažindamas uždegiminės reakcijos išreikštumą: pusei gyvūnų antrą parą neatsivėrė žaizdos, o žiurkėms su išsivysčiusia alteracija alteracijos plotas buvo vidutiniškai 34% mažesnis, negu kontrolinės grupės. Be to, siūlomas preparatas, kurio dozė 50 mg/kg, efektyviai stimuliuo regeneracinius procesus: alteracijos plotas sumažėjo vidutiniškai (55-70)%, lyginant su kontrolinės grupės duomenimis, ir beveik visiškai atsistatė pažeistas audinys 25-ją tyrimų parą.

4. Pavyzdys. Pareiškiamu būdu gauto preparato hipoazoteminio aktyvumo eksperimentiniai tyrimai.

Eksperimentą atliko su 108 neveislinių baltų žiurkių patiniais ir panaudojo ūmaus inkstų nepakankamumo modelį, plačiai naudojamą eksperimentinių nefropatijų modeliavimui (žr. Sokolova V.E., Vasilčenko E.A., Liubarceva L.A. Vlijanie preparata iz vidov lespedeci na azotistij obmen krolikov // Rast. resursy. -1975. -T.II, vyp.I. -S. 90-94. ir Berezovskaja J., Belochapko A., Vlasova M., Kinzirsky A. Some aspects of testing drugs nephrotoxicity in rats. // Arch. Toxicol. -1980. -Suppl.4. -P.184-193). Gyvūnams į pilvą suleido po 1 ml 2% gyvsidabrio

dichlorido tirpalo. Preparato, gauto pareiškiamu būdu, tirpalo įvedė į skrandį 25, 50 ir 100 mg/kg dozėmis, suleidžiant po 1 ml/100 g, 1 valandą prieš gyvsidabrio dichlorido tirpalo injekciją, o po to 1 kartą per parą 7 dienų laikotarpyje. Kontrolinės grupės gyvūnai gavo analogišką kiekį distiliuoto vandens. Palyginimui naudojo preparatą "Lespenephrium" doze 0,15 ml/100 g, kuri yra optimali eksperimentinė terapinė dozė. Biocheminius tyrimus atliko 1, 3 ir 7 parą nuo eksperimento pradžios. Bandomųjų gyvūnų kraujo serume nustatė karbamido ir kreatinino kiekius. Tyrimų duomenys apie preparato, gauto pareiškiamu būdu, poveikį karbamido ir kreatinino kiekiui žiurkių kraujo serume ūminės intoksikacijos fone pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė

Preparato pavadinimas	Dozė, mg/kg	Karbamidai			Kreatininas		
		1 para	3 para	7 para	1 para	3 para	7 para
Intaktinė		5,06±0,55	5,28±0,32	5,21±0,32	66,37±0,32	72,3±4,7	76,6±7,1
Kontaktinė		30,60±0,85	58,50±3,18	-	421,55±15,3	942,5±40,4	-
P ₁		<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	-
Pareiškiamas preparatas	25	25,6±1,85	22,0±5,98	5,2±0,23	322,84±21,8	405,33±96,5	95,9±11,4
P ₁		<0,05	<0,001	-	<0,01	<0,001	-
Pareiškiamas preparatas	50	25,5±1,75	45,7±4,70	12,2±1,74	337±19,81	606,5±44,2	123,7±15,5
P ₂		<0,05	<0,05	-	<0,01	<0,001	-
Pareiškiamas preparatas	100	20,3±3,02	42,5±6,59	8,7±0,6	339,1±22,6	627,9±62,3	140,4±9,6
P ₂		<0,01	<0,05	-	<0,05	<0,01	-
"Lespenephrium"	0,15/100	25,5±1,7	38,4±5,39	6,3±0,57	372,4±37,62	553,1±70,5	104,7±13,7
P ₂		<0,05	<0,01	-	<0,05	<0,01	-

Pastaba: P₁-patikimas skirtumas tarp intaktinės ir kontrolinės grupių.

P₂-patikimas skirtumas tarp kontrolinės ir bandomosios grupių

Kaip matome iš pateiktos lentelės, vienkartinis gyvsidabrio dichlorido sušvirkštimas gyvūnams sukelia toksinį inkstų pažeidimą su išreikštu hiperazoteminio sindromo išsivystymu. 1-ąją parą po gyvsidabrio dichlorido injekcijos labai padidėja (vidutiniškai 6 kartus) karbamido ir kreatinino kiekis kontrolinės grupės gyvūnų kraujo serume. Gyvūnams įvedus preparatą, pagamintą siūlomą būdu, stebimas jo apsauginis poveikis: karbamido ir kreatinino kiekis sumažėja vidutiniškai (15-18)%. Visų tirtų preparato dozių efektyvumas buvo apytiksliai vienodas ir buvo lespenephrium veikimo lygyje. 3-ią bandymų parą buvo stebimas tolesnis karbamido ir kreatinino kiekio padidėjimas bandomųjų gyvūnų

kraujo serume. Kontrolinėje grupėje šie rodikliai viršijo intaktinių gyvūnų duomenis atitinkamai 11 ir 9 kartus. Suleidus bandomiesiems gyvūnams preparato, gauto siūlomu būdu, pasikliautinais sumažėjo kaip karbamido, taip ir kreatino kiekis. Labiausiai išreikštas poveikis buvo stebimas, naudojant preparatą 25 mg/kg doze. Šiuo atveju pastebėta, kad šlapalo ir kreatinino kiekis sumažėjo dvigubai, lyginant su kontrolinės grupės duomenimis. Lespenefrilio aktyvumas buvo mažesnis, negu sauso kanadinio desmodiumo ekstrakto, vartojant 25 mg/kg doze, bet didesnis, vartojant 50 ir 100 mg/kg dozėmis. Likusių gyvū žiurkių biocheminių rodiklių tyrimas parodė, kad preparato 25, 100 mg/kg dozės ir lespenefrilis sumažina karbamido kiekį iki intaktinių gyvūnų lygio; o grupės, gavusios preparatą doze 50 mg/kg, šis rodiklis lieka truputį padidėjęs. Duomenys apie kreatinino kiekį rodė, kad efektyviausias buvo desmodiumo ekstraktas doze 25 mg/kg, veikęs lespenefrilio lygyje.

Išradimo apibrėžtis

1. Preparato, pasižyminčio priešūždegiminiu ir hipoazoteminiu poveikiu, gamybos būdas, ekstrahuojant augalinę žaliavą etilo alkoholiu, koncentruojant ir valant ekstraktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kaip augalinę žaliavą naudoja kanadinio desmodiumo (*Desmodium canadense D.C.*) žolę, ją ekstrahuoja etilo alkoholiu, ekstraktą koncentruoja, koncentratą valo 0,3% želatinos tirpalu santykiu 1:2, separuoja nuo balastinių medžiagų ir džiovina išpurškiamojoje džiovykloje.
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ekstrakciją vykdo per 3 kartus, pirmai ekstrakcijai naudojant trečią ištrauką nuo ankstesnės įkrovos, pridedant dalį 90% etilo alkoholio, antrai ekstrakcijai užpila naujo 90% etilo alkoholio kiekį, lygų nupiltam nuo pirmo karto, o po to ekstrakciją pakartoja.