

(19)



(10) **LT 5701 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5701** (51) Int. Cl. (2006): **A61K 31/00**

(21) Paraiškos numeris: **2010 027**

(22) Paraiškos padavimo data: **2010 03 29**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2010 10 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2010 12 27**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Rapolas LIUŽINAS, LT
Karolis JANKEVIČIUS, LT
Virginija BUKELSKIENĖ, LT
Daiva BALTRIUKIENĖ, LT
Aldona BARTUSEVIČIENĖ, LT
Liudvika Laima GRICIŪTĖ, LT

(73) Patent savininkas:

VšĮ „Grunto valymo technologijos“, Antakalnio g. 42, LT-10304 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Genė Ona SRUOGIENĖ, UAB TARPINĖ, A.P.Kavoliuko g. 24-152, LT-04328 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Fitocheminė kompozicija, jos gavimo būdas ir panaudojimas

(57) Referatas:

Išradimas priklauso sveikatos apsaugos sričiai, būtent vaistiniams preparatams, savo sudėtyje turintiems organinių veikliųjų ingredientų. Jis pagrįstas fitocheminių junginių, kaip terapinio preparato, gavimu ir panaudojimu gydant cistinę fibrozinę krūties ligą – mastopatiją. Fitocheminių junginių kompozicija, apima eterinius aliejus ir tirpiklį, kur kompoziciją ir jos eterinius aliejus sudaro fitocheminių junginių karvono, limoneno, steroidų, flavonoidų, esančių vaistinio augalo *Carum carvi* (kmyno) vaisiuose kompleksas, tirpikliu naudojant 60-96 % etilo alkoholi. Kompozicijos komponentų masės dalių santykis: *Carum carvi* vaisiai ir 60-96 % etilo alkoholis maždaug 1:5.

Išradimas priklauso sveikatos apsaugos sričiai, būtent vaistiniams preparatams, savo sudėtyje turintiems organinių veikliųjų ingredientų. Jis pagrįstas fitocheminių junginių, kaip terapinio preparato, gavimu ir panaudojimu gydant cistinę fibrozinę krūties ligą – mastopatiją.

Mastopatijos patogenezę sudaro nuo fiziologinės normos nukrypstantys krūties audinio pokyčiai. Šie pokyčiai yra proliferacinio (vešėjimo) ir neproliferacinio (regresinio) pobūdžio. Liga prasideda difuzine ir progresuoja į mazginę (židininę) formą. Supiktybėti gali visų rūšių proliferacinė ir kai kurių rūšių neproliferacinė mastopatija. Įvairių formų mastopatija serga iki 45 % (ypač vyresnio amžiaus) moterų.

Mastopatijai gydyti (proliferacinė operuojama) vis labiau naudojami nespecifiniai – fitoterapiniai preparatai. Pastaruoju metu (XXI a. pirmajame dešimtmetyje) fitocheminių junginių paieškomis ypač aktyviai užsiima kinų specialistai. Jie naudojami per ilgą laiką sukaupia kinų tradicinės medicinos patirtimi ir sudaro įvairias vaistinių augalų kompozicijas mastopatijai gydyti. Žinomos 4-6 vaistinių augalų kompozicijos [patentai: CN 101129527 (A), CN 1657069 (A), CN 1757297 (A), CN 1895441 (A)]. Į šių kompozicijų sudėtį įeina *Bupleurum*, *Jasminum*, *Reynotria*, *Polygonatum*, *Ziziphus*, *Carthamus* genčių vaistiniai augalai. Taip pat žinomos 7-10 vaistinių augalų kompozicijos [patentai CN 101214298 (A); CN 1861183 (A); CN 1493349 (A); CN 1726989 (A); CN 1385202 (A); CN 1883552 (A); CN 101361805 (A); CN 101224249 (A); CN 100998845 (A)]. Šiose kompozicijose vyrauja tokie vietinių vaistinių augalų genčių augalai: *Angelica*, *Amygdalus*, *Scrophularia*, *Forsythia*, *Cinnamomum*, *Pistacia*, *Myrrhis*, *Cyperus*, *Paeonia*, *Diervilla*, *Salvia*, *Philodendron*, *Rheum*, *Silphium*, *Scutellaria*, *Sesamum*, *Xeranthemum* augalai. Pastaraisiais metais Kinijoje patentuotos 24-35 vaistinių augalų rūšių kompozicijos įvairiems mastopatijos tipams gydyti [patentai: CN 101485862 (A), 2009-07-22 (A); CN 1695694 (A); CN 1759899 (A)]. Šiose kompozicijose be jau paminėtų augalų randame *Polygonum*, *Astragalus*, *Panax*, *Corydalis*, *Fritillaria*, *Prunella*, *Brassica* ir kitų genčių vaistinius augalus.

Sukurtos kompozicijos pasižymi mastopatiją inhibuojančiomis savybėmis, tačiau jų trūkumas yra tas, kad šis inhibavimas yra vertinamas tik patenkinamai (vidutinis inhibavimo lygis).

Mastopatijai gydyti vartojamos ir vidutinio klimato zonos vaistinių augalų kompozicijos (RU patentas 2 066 168 C1). Šią kompoziciją sudaro *Matricaria recutita*, *Melilotus officinale*, *Leonurus cardiaca*, *Padus avium*, *Epilobium angustifolium*, *Achillea millefolium*, *Origanum vulgare*, *Betula pendula* (pumpurai). Šios paskirties preparatui gauti taip pat naudojamos kerpės *Cetraria islandica* (RU patentas 2034561 C1). Žinomas gydymo būdas, kai naudojamos (RU patentas 2 234 958 C2) radono procedūros (vonia) su kintančių bangų lazerio terapija (veikiant pieno liaukas), o taip pat milimetrinio diapazono elektromagnetinės bangos, veikiant jomis biologiškai aktyvius VC-17 ir RP-6 taškus (RU patentas 2 257 921 C2). Šiomis priemonėmis padidinamas nespecifinis organizmo atsparumas bei patogenezė, tačiau šis poveikis yra ribotas.

Taip pat žinomas Indijos Mokslinio ir taikomojo tyrimo tarybos (Council of scientific and industrial research) specialistų grupės (sudaryta iš 12 tyrėjų) ištirtas vaistinių augalų *Carum carvi* (paprastasis kmynas), *Zingiber officinale* (imbieras tikrasis), *Cuminum cyminum* (kmyninis kuminas) ir *Piper nigrum* (juodasis pipiras) kompozicijos ekstrakto sinergetinis poveikis įvairiems gydomiesiems preparatams, padidinantis jų veikimo efektyvumą (WO 2004/067018 A1). Į šių preparatų sąrašą buvo įtraukti onkologijos praktikoje naudojami metotreksatas (methotrexate) ir 5-fluoruracilas (5-fluorouracil).

Šio sprendimo trūkumas yra tas, kad kompozicija tik pagerina cheminių gydomųjų preparatų veikimą.

Artimiausia siūlomam techniniam sprendimui yra farmacinė kompozicija, kuriai gaminti panaudojami aromatinių augalų eteriniai aliejai (WO 9 637 210 (A2) patentas). Kompoziciją sudaro *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, *Mentha piperita*, *Thymus serpyllum*, *Saturea hortensis*, *Saturea montana*, *Saturea subricata*, *Carum corticum*, *Ocimum gratissimum*, *Moranda punctata*, *Mosla japonica* ir *Salvia officinalis* augalų eteriniai aliejai. Kompozicija naudojama kolibaciliozės, dermatomikozės, burnos gleivinės uždegimo, pūliuojančių žaizdų gydymui ir kt. atvejais.

Šio sprendimo trūkumas yra tas, kad palyginti sudėtingos vaistinių augalų kompozicijos ekstraktas pasižymi siauru veikimo spektru, nerodo biologinio aktyvumo gydant mastopatiją.

Siūlomo išradimo užduotis – sukurti preparatą – fitocheminių junginių derinį, kuris užtikrintų preparato biologinį aktyvumą gydant mastopatiją, būtų stabilus, pasižymėtų teigiamu veikimu žmogaus organizmui, būtų pranašesnis, palyginti su kitais žinomais analogiškais preparatais bei gydymo priemonėmis ir kurio gamyba būtų nesudėtinga bei preparatas būtų nebrangus.

Užduotis išsprendžiama fitocheminių junginių kompozicija, apimančia eterinius aliejus ir tirpiklį, kurioje eterinius aliejus sudaro fitocheminių junginių karvono, limoneno, steroidų, flavonoidų, esančių vaistinio augalo *Carum carvi* (kmyno) vaisiuose kompleksas, o tirpiklis yra 60-96 % etilo alkoholis, kur kompozicijos komponentai įeina tokiu masės dalių santykiu: *Carum carvi* vaisiai ir 60-96 % etilo alkoholis maždaug 1:5.

Kompozicija apima visą fitocheminių gydomųjų junginių kompleksą. Jį sudaro 5-7 % eterinio aliejaus, kuriame randame terpeno darinių: 50-60 % karvono, 30-40 % limoneno ir mažesniais kiekiais – dihidrokarvono, dihidrokarveolio, karveolio, linaloolio; komplekso sudėtyje taip pat yra flavonoidų – kvercetino ir kamferolio, taninų, dervingų medžiagų, baltymų, riebalų rūgščių. Šios farmakologiniu požiūriu aktyvios gydomosios medžiagos telkiasi vaistinio augalo *Carum carvi* (paprastojo kmyno) vaisiuose.

Carum carvi (paprastasis kmynas) yra dvimetis arba daugiametis žolinis augalas. Jo aukštis – 50-100 cm. Stiebas status, šakotas. Žiedynas – sudėtinis skėtis. Žiedai maži, balti arba kiek rausvi. Žydi vidutinio klimato juostoje gegužės-birželio mėn. Vaisiai subręsta birželio-liepos mėn. Jie 3-7 mm ilgio ir 1,0-1,5 mm pločio. Paplitęs Europoje ir Azijoje. Kultivuojamas.

Augalo vaisiai naudojami maisto ir konditerijos pramonėje, parfumerijoje. Buityje – rauginant kopūstus, sūrų gamyboje, kepant duoną, kulinarijoje (Кошечев А. К., Дикорастущие съедобные растения в нашем питании, М., 1980, 256 c.; Food technol. Abstr., 1974, N 93, p. 470) Jų dedama į giras ir kitus nealkoholinius ir alkoholinius gėrimus. Jauni lapai tinka salotoms, sriuboms. Iš žiedų bitės prineša per 100 kg/ha nektaro,

Carum carvi kaip vaistinis augalas yra įtrauktas į daugelio šalių farmakopėjas. Vaisių antpilas (mokslinėje medicinoje) vartojamas skrandžio hipofunkcijos (atonijos) atveju, esant meteorizmui (Лекарственные препараты, разрешённые к применению в СССР, М., 1979, 351 c.). Tibeto medicinoje – esant neurozėms, medžiagų apykaitos sutrikimams,

intoksikacijoms, akių skausmams (Дикорастущие полезные растения флоры Монгольской Народной Республики, Л., 1985, 235 с.). Kinų ir indų medicinoje – esant įvairioms skrandžio-žarnyno ligoms, chroniškam cholecistitui, kaip laktogeninė priemonė (Шпетер А. И., Пименов М. Г. Ресурсы важнейших лекарственных растений советского Дальнего Востока // Ресурсы дикорастущих лекарственных растений СССР, Л., 1968, с. 66-79; Chopra R. N., Nayr S. L., Chopra S. C., Glossary of Indian medicinal plants, New Delhi, 1956, 330 p.). Liaudies medicinoje įvairūs kmynų vaisių ekstraktai – diuretinė, atsikosėjimą gerinanti, apetitą žadinanti, virškinimą gerinanti priemonė, esant meteorizmui (Завражнов В. И., Китаева Р. И., Хмелёв К. Ф., Лекарственные растения Центрального Черноземья, 3-е изд., Воронеж, 1977, 447 с.). Esant bronchų astmai, ascitui, egzемаi, kaip antihelmintinė priemonė (Роллов А. Х. Дикорастущие растения Кавказа, их распространение, свойства и применение, Тифлис, 1908, 599 с.; Сахобиддинов С. С. Дикорастущие лекарственные растения Средней Азии, Ташкент, 1984, 199 с.). Ekstraktas (eterinis aliejus) eksperimento sąlygomis rodo antibakterinį aktyvumą (Бондаренко А. С. и др., Антимикробная активность некоторых растений // Фитонциды в народном хозяйстве, Киев, 1964, с. 170-179). Eterinis aliejus pasižymi antituberkulioziniu veikimu (Мищенко Е. Л. и др., Действие антибиотических веществ из высших растений на микобактерии // Микроб. журнал, 1985, т. 47, N 1, с. 77-80).

Pastaruoju metu kmynai naudojami medicinoje kaip priemonė nuo meteorizmo, spazminių skrandžio bei žarnyno negalavimų esant virškinimo sutrikimams (Holtmann G. S., Haag B. et al., 2003, Effects of a fixed combination of piperment oil and caraway oil on symptoms and quality of life in patients suffering from functional dyspepsia. Phytomedicine 10 (suppl. 4): 56-57; Medisch A. G., Holtmann G. S. et al., 2004. Treatment of functional dyspepsia with a herbal preparation: a double blind, randomized, placebo controlled, multicenter trial. Digestion 69: 45-52). Kmyną ekstraktas ir eterinis aliejus naudojami skrandžio opų gydymui (Khayyal M. T., El-Ghazaly M. A. et al., 2001. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. Arzneimittelforschung 51: 545-553). Kmynai pasižymi fungicidiniu veikimu – slopina *Candida albicans* – tai vienas labiausia paplitusių žmogaus patogeninių mikromicetų (Deeptha K. M. et al., 2006. Dose dependent inhibitory effect of dietary caraway on 1,2-dimethylhydrazine induced colonic aberrant crypt foci and bacterial enzyme activity in rats. Invest. New Drugs 24(6): 479-488).

Pateikiame detalesnę kmynų (*Carum carvi*) vaisių biologiškai aktyvių cheminių junginių charakteristiką.

Kmynų vaisiuose eterinių aliejų randama nuo 2,6 iki 7,67 % (Каррыев М. О., Фармакохимия некоторых эфиромасличных растений флоры Туркмении, Ашхабад, 1973, 154 с.; Соболевская Л. А., Тюрина Е. В., Гуськова И. Н. Эфиромасличные растения Дальнего Востока, Новосибирск, 1972, с. 188; Karrer W. Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Basel; Stuttgart, 1958, 1207 s). Eterinių aliejų sudėtyje randama procentais (%): karvono 41-60, limoneno 30, trans-dihidrokarvono, cis- dihidrokarvono, izo-dihidrokarvono, dihidrokarveolo, cis-karveolo, trans-karveolo, γ -terpineno, karvakrolo, izodihidrokarveolo, neodihidrokarveolo, neoizodihidrokarveolo, perilo alkoholio, dihidropinolo, acetaldehido, diacetilo, α -pineno, β -pineno, sabineno, mirceno, α -fenandreno, menteno, linaloolo, tricikleno, α -tujono, β -tujono, β -fencheno, kamfeno, karenio, α -terpineno, β -felandreno, β -kariofileno, β -kadineno, terpinoleno, timolo, trans-anetolo, kamforos, terpinenolo-4, petrozolino rūgšties (Embong M. B., Hudziger D. Molnar S., Essential oils from species grown in Alberta: Caraway oil (*Carum carvi*) // Can J. Plant. Sci., 1977, vol. 57, N 2, p. 543-549; Ikeda R. M. et al. The monoterpene hydrocarbon composition on some essential oils // J. Food. Sci., 1962, vol 27, N5, p. 455-458; Karrer W. Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Basel, Stuttgart, 1958, 1207 s.; Masada Y. Analysis on essential oils by gas chromatography and mass-spektrometry, New York, 1976, 334 p.; Rothbächer H., Suten F. Über Hydroxylverbindungen des Kümmel – oils // Planta med., 1975, Bd. 28, H. 2, s. 112-123; Salveson A., Baerheim Svendsen A. Gas liquid chromatographic separation and indication of the constituents of caraway seed oil // Planta med., 1976, Bd 30, H.1, p. 93-96; Schantz M., Huhtikengas A. Über die Bildung von Limonen und Carvon in Kümmel – *Carum carvi* // Phytochemistry, 1971, vol 10, N8, p. 1787-1793; Zderkiewicz T. Zawartość oleiku w różnych fazach dojrzalosci owoców kminku di-tetraploidnego – *Carum carvi* L. // Acta agrobot., 1971, vol. 24, N1, p. 121-122).

Kmynų eteriniame aliejuje randami steroidai (organiniai junginiai, jų molekulių pagrindą sudaro ciklopentanoperhidrofenantreno žiedai): stigmasterinas, palmitatas ir stigmasterino stearatas (Kartnig Th., Scholz G. Über einige Lipoid-Inhaltstoffe aus den Früchten von *Pimpinella anisum* und *Carum carvi* L. // Fette, Seifen, Anstrich mittel, 1969, Bd 71, H. 4, s. 276-280).

Fenolkarboninės rūgštys ir jų dariniai: 4-β-D-gliukopiranoziloksibenzoinė rūgštis (Dirks V., Hermann K., 4-(β-Glukopyranosyloxy)-benzoic acid, a characteristic phenolic constituent of the Apiaceae // *Phytochemistry*, 1984, vol. 23, N 8, p. 1811-1812).

Kumarinai (heterocikliniai deguonies junginiai, augaluose esantys glikozidų pavidalo kumarinai vadinami laktonais) – 0,02-0,48 % (Валуцкая А. Г., Гуськова И. А., Содержание кумаринов в сибирских представителях сем. зонтичных // *Раст. ресурсы*, 1972, т. 8, вып. 4, с. 547-554; Каррьчев М. О. Фармакохимия некоторых эфиромасличных растений флоры Туркмении, Ашхабад, 1973, 154 с.): umbeliferonas, skopolitinas, herniarinas.

Flavonoidai (įvairios spalvos augaliniai pigmentai, priklauso glikozidams) – 0,98-1,24 % (Kunzemann J., Hermann K. Isolierung und Identifizierung der Flavon(ol)-O-glykoside in Kümmel (*Carum carvi* L.), Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.), Anis (*Pimpinella anisum* L.) und Koriander (*Coriandrum sativum* L.) und von Flavon-C-glykosiden im Anis, Z. Lebensmitteluntersuch. und Forsch., 1977, Bd 164, H. 3, s. 194-200): kvercetino 3-gliukoronidas, izokvercizinas, rutinas, kvercetino 3-0-kofeoilgliukozidas, kempferolio 3-gliukozidas.

Riebalai (vienas svarbiausių ląstelės komponentų, glicerino ir riebalų rūgščių esteriai) - 18,4-21,18 %. Jų sudėtyje (%): angliavandeniliai 0,2; trigliceridai 66; laisvosios riebalų rūgštys 5,1 (petrozolino, palmitino, stearino, linoleno, oleino). (Зарайская Е. И., Борисюк Ю. Г. Исследование жирных кислот плодов тмина - *Carum carvi* L. и аниса *Pimpinella anisum* L. /Некоторые вопросы фармации, Киев, 1956, с. 185-189; Степаненко Г. А., Гусакова С. Д., Умаров А. У., Липиды семян *Carum carvi* и *Foeniculum vulgare* // *Химия природ. соедин.*, 1980, N 6, с. 827-828; Hondelmann W. Das Vorkommen einer ungewöhnlichen Fettsäure, der Petroselinensäure, in der Familie der Doldengewächse als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Ölfrüchte // *Landbauforsch. Völkenrode*, 1985, Jd 35, H. 4/, s. 185-190; Kleiman R., Spencer C. F., Search for new industrial oils: Umbelliferae seed oils rich in petroselinic acid // *J. Americ. Oil Chem. Soc.*, 1982, vol. 59, N 1, p. 29-38).

Kompoziciją gaunama tokiu būdu: sausus *Carum carvi* (paprastojo kmyno) vaisius, kaip vaistinę žaliavą, turinčius ne daugiau kaip 12 % drėgmės, ne mažiau kaip 5-6 % eterinių aliejų ir ne daugiau kaip 8-9 % mineralinių medžiagų, o pelenų, netirpstančių 10 % druskos rūgštyje,

ne daugiau kaip 1,5-2,0 %, susmulkina ir ekstrahuoja 60-96 % etilo alkoholiu, geriau 96 % etilo alkoholiu, per 24-72 val. 18-20 °C temperatūroje kratant, gaunama fitocheminių junginių tinktūra.

Taip paruošta kompoziciją naudojama mastopatijai gydyti, kur kompozicijos terapinė dozė/dienai ligoniui skiriama 7,5-12,5 ml arba 150-250 lašų vartojimui per OS po 30-50 lašų 5 kartus per dieną ne mažiau kaip 30 min. prieš valgį, geriau vienodais laiko intervalais. Kompozicijos nešikliu yra vartojama sacharozė, kurios vienkartinę dozę sudaro 5-7 g sacharozės.

Ekstrakto aktyvumui įvertinti naudotos nelinijinės žiurkės ir pelės, o taip pat linijinės pelės DBA/2, BDF, C57B1 ir BALB/C. Eksperimentiniams gyvūnams buvo įskiepijami sarkomos (S-45), sarkomos (S-180) ir pieno liaukos adenokarcinomos (Ca 755) augliai. Tiriamasis ekstraktas eksperimentiniams gyvūnams buvo suleidžiamas į pilvo ertmę nuo kelių iki keliolikos ml/kg svorio. Ekstraktai žiurkėms buvo suleidžiami nuo eksperimentinio auglio ląstelių transplantacijos praėjus 3-5 paroms, pelėms – praėjus 1-2 paroms. Ekstraktai buvo leidžiami iki 5 kartų. Ekstrakto aktyvumo įvertinimo trukmė – 10 parų.

Ekstrakto aktyvumas buvo vertinamas auglio ląstelių augimo slopinimu, išreiškiamu procentais (%), palyginus su kontroliniu variantu, o taip pat eksperimentinio gyvūno kūno ir blužnies masės pokyčiais (%). Gauti teigiami rezultatai. Kmyno vaisių ekstraktas (tinktūra) pieno liaukų adenokarcinomos (Ca 755) ląstelių augimą slopino 90 %.

Nustatyta terapinė dozė (TD) mg/kg. Ji yra 30-90 mg/kg per parą. Tuomet smulkaus svorio (50 kg) ligonei – 1500-2500 mg/50 kg per parą sausos kmyno vaisių masės, arba šį kiekį transformavus į 60 % etilo alkoholio ekstraktą (kai kmyno vaisių masės ir alkoholio santykis 1:5) turėsime (1,5 arba 2,5 g x 5) 7,5-12,5 ml alkoholio ekstrakto. Tai paros (tikriausiai, dienos norma). Ekstraktas naudotinas lašais (1 ml = 20 lašų). Taigi dienos norma (dozė) – 150-250 ekstrakto lašų. Ši dozė rekomenduojama *per os* vartoti 5 kartus per dieną po 30-50 ekstrakto lašų vienam kartui, mažiausiai pusę valandos prieš valgį. Tinkamiausias ekstrakto (tinktūros) nešėjas – sacharozė (cukrus), 5-7 g sacharozės, į kurią lašinama 30 arba 50 tinktūros lašų ir taip paruošiama vienkartinė dozė mastopatijai gydyti. Ši procedūra vienodais laiko intervalais per dieną atliekama 5 kartus.

Kmyno vaisių ekstrakto (tinktūros) efektyvumo vertinimas buvo atliktas ir kitu būdu – vertinant citotoksinę kompozicijos poveikį piktybinių ląstelių kultūroje *in vitro*. Tuo tikslu naudotas 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas (MTT). Tai vienas dažniausiai naudojamų būdų ląstelių proliferacijai ir citotoksiškumui vertinti (Mosmann T. 1983. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 65, 55-63). Tetrazolio druskos sudaro didelę heterociklinių organinių junginių grupę, kurios po redukcijos visada virsta spalvotais, dažnai netirpiais junginiais. Geltonos spalvos MTT redukuoja metaboliškai aktyvios ląstelės, veikiant mitochondrijų fermentams dehidrogenazėms. Šio proceso išdava – vandenyje netirpus, bet tirpstantis etanolyje, izopropanolyje bei rūgštiniame izopropanolyje, spalvotas formazanas. Vandenyje netirpus formazanas gali būti tirpinamas ir mineraliniame aliejuje, tačiau, šiuo atveju farmazano nuosėdos turi būti inkubuojamos iki 24 val. 37 °C temperatūroje, kai dimetilsulfoksido (DMSO) formazano nuosėdos ištirpsta nedelsiant (Kasagai S. N. et al., 1990. A simple in vitro cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay; analysis of angiotensin toxicity on dental pulp cells (RPC – C2A), Japan J. Pharmacol 52: 95-100). Gautas tirpalas vertinamas spektrometriškai 500-600 nm bangos ilgyje. Šis metodas visuotinai pripažintas, tinkamas priešvėžinių junginių tyrimams, svarbus klinikoje (Hatok J. E., Babusikova T., et al., 2009. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. Clin. Exp. Med. 9: 1-7).

Tyrimai atlikti tokia darbo tvarka.

Kmynų ekstrakto paruošimas.

Kmynų sėklos mechaniškai susmulkinamos (sumalamos). Susmulkinta masė ekstrahuojama 96 % etilo alkoholiu 24 val. kambario temperatūroje kratant. Naudotas kmynų sėklų ir etilo alkoholio santykis 1:10 (1 g kmynų sėklų 10 ml 96 % etilo alkoholio).

Naudotos ląstelės bei jų auginimo sąlygos.

Darbe buvo vertintas spiritinio kmynų ekstrakto poveikis krūtų vėžio - MCF7, plaučių vėžio - A549 bei neuroblastomos - N2A linijų ląstelėms. Ląstelių linijos gautos iš ATCC (American Type Culture Collection). Ląstelės auginamos Iscove modifikuotoje Dulbecco terpėje (IMDM), praturtintoje 10 % fetalinių veršelių serumu ir antibiotikais – penicilinu (100 VV) ir streptomycinu (100µg/ml). Ląstelės persėjamos 2-3 kartus per savaitę, jų monosluoksnį

disperguojant EDTA-tripsino (4:1) mišiniu. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje, aplinkoje esant 5 % CO₂ ir 95 % drėgmei.

Kmynų poveikio ląstelių gyvybingumui tyrimas.

Dieną prieš poveikį, tiriamos ląstelės išsėjamos maždaug 200 ląstelių/ml suspensijos tankiu į 96 duobučių polistirolinę plokštę. Po 24 val. ląstelėms pradėjus daugintis, augimo terpė pakeičiama nauja terpe, kurioje yra skirtingos koncentracijos kmynų ekstraktai. Lygiagrečiai buvo tiriamas ir ekstragenta – etilo alkoholio bei pavienio kmynų ekstrakto poveikis tiriamų ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui. Abiem atvejais poveikio trukmė – 24 val.

Ląstelių proliferacinio aktyvumo įvertinimas.

Tiriamų ląstelių proliferacija buvo vertinama naudojant MTT reagentą. Metodas paremtas gyvų ląstelių mitochondrijų fermentų gebėjimu tirpų geltonos spalvos MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidą] redukuoti iki violetinės spalvos netirpius kristalus formuojančio formazano. Gyvų ląstelių skaičius yra tiesiogiai proporcingas susidariusio produkto – formazano kiekiui, kuris įvertinamas spektrofotometriškai 570 nm bangos ilgyje, gautus netirpius kristalus ištirpinus etanolyje. Proliferacijos įvertinimui naudojamas 0,2 mg/ml MTT tirpalas fosfatiname buferyje, kurio 50 µl/cm² pilama ant ląstelių monosluoksniu prieš tai pašalinus auginimo terpę. Inkubuojama 1 val., susidariusios nuosėdos tirpinamos etanoliu, kurio pilama 100 µl/cm². Optinis tankis matuojamas spektrofotometriškai 570 nm bangos ilgyje.

Išradimo apibendrintam aiškinimui toliau pateikiami pavyzdžiai.

1 pavyzdys. *Carum carvi* alkoholinio ekstrakto (tinktūros) priešvėžinis aktyvumas (auglio ląstelių kultūros: Ca755, S-45, S-180)

Terapinė kmynų tinktūros dozė/dienai	Terapinė kmynų dozė/dienai	Auglio ląstelių kultūra (štamai)	Auglio augimo stabdymas, %	Kūno biomasės kitimas, %	Blužnies biomasės kitimas, %
--	----------------------------------	---	----------------------------------	--------------------------------	------------------------------------

1,5-2,5 g kmynų ekstrakto alkoholyje 1:5 = 7,5-12,5 ml tinktūros arba 150-250 lašų tinktūros	30-50 mg/kg arba 1500-2500 mg (1,5-2,5 g) 50-čiai kg	Ca755	90,0	5,0	13,6
		S-45	66,0	20,4	13,6
		S-180	63,0	-2,5	-11,0

2 pavyzdys. *Carum carvi* alkoholinio ekstrakto (tinktūros) priešvėžinis aktyvumas (auglio
ląstelių linijos: MCF7, N2A, A549)

Dozė		Auglio ląstelių linija	Ląstelių augimo stabdymas, %
Kmynų	Tinktūros		
10 mg kmynų vaisių 1 ml tinktūros	100 µl tinktūros panaudota auglio ląstelių reakcijai vertinti	MCF7 N2A A549	Daugiau nei 80 Registruojamas stabdymas Registruojamas stabdymas

2-ojo pavyzdžio rezultatai gauti naudojant kitokią tyrimo metodiką, nei 1-ojo pavyzdžio atveju. Jie patvirtina 1-ojo pavyzdžio duomenis - *Carum carvi* tinktūra stabdo pieno liaukos adenokarcinomos vystymąsi (ląstelių dauginimąsi), ir tas stabdymas yra statistiškai patikimas.

Carum carvi vaisių tinktūra, atsižvelgiant į joje esantį netoksinį fitocheminių junginių rinkinį ir jų gydomąjį efektą, gali būti vertinama kaip nereceptinis fitoterapinis vaistinis preparatas. Jis tinka pieno liaukų adenokarcinomos profilaktikai ir gydymui. Taip pat gali būti naudojama pooperaciniu laikotarpiu bei chemoterapijos būdo taikymo atveju. Kmyno vaisių fitocheminiai junginiai tinktūros ar kitu pavidalu (milteliai, granulės) perspektyvūs derinyje su šiuolaikiniais vaistiniais preparatais, naudojamais vėžio įvairių formų chemoterapijoje, o taip pat derinyje su kitų vaistinių augalų produktais junginiais, pasižyminčiais priešvėžinėmis savybėmis.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Fitocheminių junginių kompozicija, apimanti eterinius aliejus ir tirpiklį, besiskirianti tuo, kad jos eterinius aliejus sudaro fitocheminių junginių karvono, limoneno, steroidų, flavonoidų, esančių vaistinio augalo *Carum carvi* (kmyno) vaisiuose kompleksas, o tirpiklis yra 60-96 % etilo alkoholis, kur kompozicijos komponentai įeina tokiu masės dalių santykiu: *Carum carvi* vaisiai ir 60-96 % etilo alkoholis maždaug 1:5.
2. Kompozicijos pagal 1 punktą gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad sausus *Carum carvi* vaisius, turinčius ne daugiau kaip 12 % drėgmės, ne mažiau kaip 5-6 % eterinių aliejų, ne daugiau kaip 8-9 % mineralinių medžiagų, iš kurių netirpstančių 10 % druskos rūgštyje yra ne daugiau kaip 1,5-2,0 %, susmulkina ir ekstrahuoja 60-96 % etilo alkoholiu, geriau 96 % etilo alkoholiu, per 24-72 val. 18-20 °C temperatūroje kratant, gaunant fitocheminių junginių tinktūrą.
3. Kompozicijos pagal 1 ir 2 punktą panaudojimas mastopatijai gydyti, besiskiriantis tuo, kad kompozicijos terapinė dozė/dienai skiriama 7,5-12,5 ml arba 150-250 lašų vartojimui *per os* po 30-50 lašų 5 kartus per dieną ne mažiau kaip 30 min. prieš valgį, geriau vienodais laiko intervalais.
4. Panaudojimas pagal 3 punktą, besiskiriantis tuo, kad kompozicija vartoja su nešikliu.
5. Panaudojimas pagal 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas nešiklis yra sacharozė.
6. Panaudojimas pagal 4 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtos sacharozės vienkartinę dozę sudaro 5-7 g sacharozės.