

(19)



(10) **LT 5740 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5740**

(51) Int. Cl. (2006): **A61K 36/00**

(21) Paraiškos numeris: **2010 062**

(22) Paraiškos padavimo data: **2010 08 25**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2011 04 26**

(45) Patent paskelbimo data: **2011 06 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
Ieva PAUNKSNYTĖ, 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:

Fitocheminių junginių kompozicija, jos gavimo būdas ir panaudojimas vėžiui gydyti

(57) Referatas:

Fitocheminių junginių kompozicija, skirta vėžiui gydyti, apimanti eterinius aliejus ir tirpiklį, kurioje eterinius aliejus sudaro dipenteno, felandreno, seskviterpeno, kariofileno junginiai, alkaloido piperino, esančių juodųjų pipirų (*Piper nigrum*) vaisiuose, kompleksas, ir/arba fitocheminių junginių karvono, limoneno, steroidų, flavonoidų, esančių vaistinio augalo paprastojo kmyno (*Carum carvi*) vaisiuose, kompleksas, o tirpiklis yra 60-96 % etilo alkoholis, kur kompozicijos komponentai įeina tokiu masės dalių santykiu: juodųjų pipirų ir paprastojo kmyno vaisių mišinio ir 60-96 % etilo alkoholio maždaug 1:10. Kompozicija gali būti panaudota gydant tokias vėžio formas kaip krūties vėžys, neuroblastoma, plaučių vėžys.

Išradimas priklauso sveikatos apsaugos sričiai, būtent vaistiniams preparatams, savo sudėtyje turintiems organinių veikliųjų ingredientų ekstraktų derinį ir gali būti panaudojamas gydant tokias vėžio formas kaip krūties vėžys, neuroblastoma, plaučių vėžys.

Pasaulinės sveikatos apsaugos organizacijos (PSO) duomenimis kasmet pasaulyje dvylikai milijonų žmonių diagnozuojamas vėžys. 7,6 mln. gyventojų miršta nuo šios ligos. Lietuvoje onkologinėmis ligomis serga apie 80 tūkstančių žmonių. Naujų vėžio atvejų kasmet diagnozuojama per 16 tūkstančių. Gydoma įvairiais būdais. Naudojamas chirurginis gydymo būdas. Jei žmogui negali būti atliekama operacija, tuomet taikoma radioterapija bei chemoterapinis gydymas. Mokslinės organizacijos daug pastangų skiria chemoterapinio metodo tobulinimui. Ieškoma aktyvių fitocheminių junginių, sudaromos vaistinių augalų kompozicijos vėžiui gydyti.

Intensyviausiai šioje srityje dirba kinų specialistai. Jie naudojami kinų tradicinės medicinos patirtimi (patentai CN 101129527 (A); CN 101214298 (A); CN 101485862 (A)), o taip pat Lietuvoje (patentas LT 5701).

Kinijoje pastaraisiais 2008-2009 metais patentuotos gerokai modifikuotos tradicinės kinų medicinos sukurtos fitocheminių junginių kompozicijos (CN 101455834 (A); CN 101361539 (A); CN 1517030 (A); CN 1337243 (A)). Sukurtos kompozicijos pasižymi onkologines ligas inhibuojančiomis savybėmis, tačiau jų trūkumas yra tas, kad šis inhibavimas yra vertinamas tik patenkinamai (vidutinis inhibavimo lygis).

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*, *Satureia hortensis*, *Satureia montana*, *Satureia 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 krūties vėžį, neuroblastomą, plaučių vėžį.

Siūlomo išradimo užduotis – sukurti preparatą – fitocheminių junginių kompoziciją, kuri užtikrintų preparato biologinį aktyvumą, efektyviai veiktų krūties vėžio (MCF-7), plaučių vėžio (A549) ir neuroblastomos (N2A) linijų ląsteles, būtų stabili, pasižymėtų teigiamu veikimu žmogaus organizmui, būtų pranašesnė, palyginti su kitais žinomais analogiškais preparatais bei gydymo priemonėmis, ir kurios gamyba būtų nesudėtinga bei preparatas būtų nebrangus.

Užduotis išsprendžiama sukuriant fitocheminių gydomųjų junginių kompoziciją, efektyviai veikiančią krūties vėžio (MCF-7), plaučių vėžio (A549) ir neuroblastomos (N2A) linijų ląsteles, apimančią eterinius aliejus ir tirpiklį, kur eterinius aliejus sudaro dipenteno, felandreno, seskviterpeno, kariofileno junginiai, alkaloido piperino, esančių *Piper nigrum* (juodųjų pipirų) vaisiuose, kompleksas, ir/arba fitocheminių junginių karvono, limoneno, steroidų, flavonoidų, esančių vaistinio augalo *Carum carvi* (paprastojo kmyno) vaisiuose kompleksas, o tirpiklis yra 60-96 % etilo alkoholis, kur kompozicijos komponentai įeina tokiu masės dalių santykiu *Carum carvi* bei *Piper nigrum* ir 60-96 % etilo alkoholio maždaug 1:10.

Fitocheminių junginių kompoziciją gaunama tokiu būdu: kaip vaistinę žaliavą ima reikiamą kiekį sausų *Piper nigrum* (juodųjų pipirų) vaisių ir/arba *Carum carvi* (paprastojo kmyno) vaisių, juos susmulkina ir ekstrahuoja 60-96 % etilo alkoholiu, geriau 96 % etilo alkoholiu, per 24-72 val. 18-20 °C temperatūroje kratant. Gaunamas fitocheminių junginių ekstraktas. Ekstraktui gauti ima minėtus vaisius, kaip vaistinę žaliavą, turinčius ne daugiau kaip 12 % drėgmės.

Fitocheminių junginių alkoholiniam ekstraktui gauti panaudotos vaistinio augalo *Carum carvi* (paprastojo kmyno) ir *Piper nigrum* (juodųjų pipirų) vaisiai. Taip pat buvo įvertintas kmynų ir pipirų ekstraktų mišinio poveikis chemoterapinio vaisto taksolio veikimo efektyvumui.

Paprastojo kmyno vaisiuose randame 3-7 % eterinio aliejaus, o jame yra karvono, limoneno, dihidrokarveolio, dihidropinolio, dihidrokarvono, linaloolio, karvakrolio, karveolio, neodihidrokarveolio, izodihidrokarveolio. Vaisiuose yra kumarino junginių.

Kmyno vaisių fitocheminių junginių detali charakteristika.

Carum carvi (paprastasis kmynas) yra dvimetis arba daugiametis žolinis 50-100 cm aukščio augalas. 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. *Carum carvi* kaip vaistinis augalas yra įtrauktas į daugelio šalių farmakopėjas.

Pateikiame detalesnį kmynų (*Carum carvi*) vaisiuose nustatytų biologiškai aktyvių cheminių junginių sąrašą:

- eteriniai aliejai (nuo 2,6 iki 7,67 proc.) (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). Juos sudaro (proc.): karvonas 41-60, limonenas 30 bei trans-dihidrokarvonas, cis-dihidrokarvonas, izo-dihidrokarvonas, dihidrokarveolas, cis-karveolas, trans-karveolas, γ -terpinenas, karvakrolas, izodihidrokarveolas, neodihidrokarveolas, neoizodihidrokarveolas, perilo alkoholis, dihidropinolas, acetaldehidas, diacetilas, α - ir β -pinenai, sabinenas, mircenas, α -fenandrenas, mentenas, linaloolas, triciklenas, α - ir β -tujonai, β -fenchenas, kamfenas, karenas α -terpinenas, β -felandrenas, β -kariofilenas, β -kadinenas, terpinolenas, timolas, trans-anetolas, kamforos, terpinenolo-4, petrozolino rūgštis (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.; Rothbacher 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 dojrzałości owoców kminku di-tetraploidnego – *Carum carvi* L. // Acta agrobot., 1971, vol. 24, N1, p. 121-122).

- steroidai - 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, Anstrichmittel, 1969, Bd 71, H. 4, s. 276-280).

- fenolkarboninės rūgštys ir jų dariniai: 4-β-D-gliukopiranoziloksibenzoinė (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 – 0,02-0,48 proc. (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 – 0,98-1,24 proc. (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-O-kofeoilgliukozidas, kempferolio 3-gliukozidas.

- riebalai - 18,4-21,18 proc. Jų sudėtyje yra (proc.): 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 Petroselininsäure, 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).

Juoduojų pipirų (*Piper nigrum*) vaisiuose (*Fructus Piper nigri*) yra 5-9 % alkaloido piperino (piperidino darinys), kuris sukelia deginantį pojūtį. Vaisiuose yra 0,9-2,5 % eterinio aliejaus. Jame randama dipenteno, felandreno, seskviterpeno, kariofileno junginių.

Piper nigrum priklauso *Piperaceae* šeimos augalams. Tai liana, turinti orines šaknis, kuriomis prisitvirtina prie atramos. Vaisiai bręsta lėtai. Laikas nuo žydėjimo iki pilno vaisiaus subrendimo užtrunka 4-6 mėnesius. Vaisiai renkami nesubrendę. Džiovinami saulėje pajuosta. Sultingas minkštumas susiraukšlėja. Turi specifinį kvapą. Skonis – deginantis.

Trumpai pateikiame tiriamus plaučių vėžį ir neuroblastomą.

Plaučių vėžys – liga, kurios metu plaučių audinio ląstelės pradeda nekontroliuojamai augti ir daugintis. Lietuvoje, kaip ir daugelyje pasaulio šalių, plaučių vėžys labiausiai paplitęs tarp vyrų. Moterys taip pat serga, tik daug rečiau. Tai viena pagrindinių vyrų mirštamumo nuo vėžio priežasčių. Kasmet nuo plaučių vėžio pasaulyje miršta apie 1 mln. žmonių. Lietuvoje kiekvienais metais nustatoma apie 1200 naujų plaučių vėžio atvejų. 2006 m. duomenimis Lietuvoje 100 000 gyventojų užregistruota 1 317 plaučių vėžio atvejai (1 119 vyrų ir 198 moterų). Sergamumas plaučių vėžiu tiesiog proporcingas tabako rūkymui, kuris kasmet didėja. Plaučių vėžio rizika priklauso nuo surūkytų cigarečių skaičiaus: rizika gali padidėti net iki 200 kartų, lyginant su nerūkančiais žmonėmis. Nerūkančiųjų sergamumą plaučių vėžiu (tokių yra apie 15 %) lemia genetiniai faktoriai (Gorlova OY, Weng SF, Zhang Y et al. (2007). Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International Journal of Cancer* 121 (1): 111-118; Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ (1997). The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *British Medical Journal* 315 (7114): 980-988), rodono dujos, asbestas (O'Reilly KM: McLaughlin AM, Beckett WS, Sime PJ (2007). Asbestos-related lung disease. *American Family Physician* 75 (5): 683-688), oro tarša (Kabir, Z; Bennett K, Clancy L (2007). Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association? *Irish Medical Journal* 100 (2): 367-369; Coyle, YM; Minahjuddin AT, Hynan LS, Minna DJ (2006). An ecological study of the association of metal air pollutants with lung cancer incidence in Texas. *Journal of Thoracic Oncology* 1 (7): 654-661; Chiu, HF; Cheng MH, Tsai SS et al. 2006). Outdoor air pollution and female lung cancer in Taiwan *Inhalation Toxicology* 18 (13): 1025-1031) bei pasyvus rūkymas (Carmona, RH (2006). The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services. <http://www.surgeongeneral.gov/library/secondhandsmoke>. „Secondhand smoke exposure causes disease and premature death in children and adults who do not smoke“. Catelinois O, Rogel A, Laurier D, et al. (2006). Lung cancer attributable to indoor radon exposure in France: impact of

the risk models and uncertainty analysis. *Environ. Health Perspect.* 114(9): 1361-6). Svarbus faktorius – tinkama mityba. Nustatyta, kad tinkamai maitinantis rizika susirgti plaučių vėžiu galima sumažinti 20-33 procentais. Plaučių vėžys dažniausiai diagnozuojamas per vėlai, todėl itin sunkiai gydomas. Pagrindiniai plaučių vėžio tipai: smulkialąstelinis plaučių vėžys (SCLC – *small cell lung carcinoma*) ir nesmulkialąstelinis plaučių vėžys (NSCLC – *non-small cell lung carcinoma*). Šis skirstymas yra labai svarbus skiriant gydymą. NSCLC dažniausiai gydomas chirurginiu būdu, o SCLC geriau pasiduoda chemoterapijai ir radioterapijai ((Vaporciyan, AA; Nesbitt JC, Lee JS et al. (2000). *Cancer Medicine*. B C Decker. Pp. 1227-1292). Priklausomai nuo stadijos, penkerius metus išgyvena apie 14 procentų sergančiųjų (Minna, JD (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (17th ed.). McGraw-Hill. Pp. 551-562).

Neuroblastoma – tai piktybinis simpatinės nervų sistemos navikas. Neuroblastoma sudaro 8-10 % visų piktybinių vaikų navikų ir yra dažniausias navikas pirmaisiais gyvenimo metais. Didžiąją dalį neuroblastoma diagnozuojama iki 5 metų amžiaus. Berniukai serga dažniau nei mergaitės.

Neuroblastomos etiologija nėra visiškai aiški. Kai kuriais atvejais nustatoma paveldima neuroblastoma, kurią sukelia reta mutacija 16 chromosomoje anaplastinės limfomos kinazės gene (Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, et al (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455 (7215): 930-5). Lygiagrečiai yra tiriama įvairūs faktoriai, galintys nulemti neuroblastomos vystymąsi. Tai rūkymas, alkoholio, įvairių medikamentų vartojimas ar darbas nėštumo metu su toksiškais chemikalais (Olshan, AF, Bunin, GR (2000) Epidemiology of Neuroblastoma. In: Brodeur, GM, Sawada, T. Tsuchida, Y. Voute, PA eds., Neuroblastoma, Elsevier, Amsterdam, pp 33-39. Menegaux F, Olshan AF, Neglia JP, Pollock BH, Bondy ML (2004). Day care, childhood infections, and risk of neuroblastoma. *Am. J. Epidemiol.* 159 (9): 843-51). Kiti tyrimai ieško ryšio tarp neuroblastomos ir infekcijų ankstyvame amžiuje, hormonų, apvaisinimą skatinančių medikamentų vartojimo (Olshan AF, et al. Hormone and Fertility Drug Use and Risk of Neuroblastoma: A Report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group, *Am J Epidemiol* 1999; 150: 930-8) ar motinos vartotų plaukų dažų (McCall EE, et al. (2005) Maternal hair dye use and risk of neuroblastoma in offspring. *Cancer causes and Control* 16,6: 743-8; Hech JE, Ritz B, Hung RJ, Hashibe M, Boffetta P (2009) The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol* 23 (2): 125-43). Neuroblastomos gydymui naudojamas platus spektras priemonių – chemoterapija,

chirurginis gydymas, radioterapija, kaulų čiulpų ir hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija, 13-*cis*-retinoinės rūgšties bei imunoterapijos taikymas, tačiau, nepaisant to, vaikų, sergančių pažengusia ligos forma, išgyvenimas yra prastas.

Cistinės fibrozinės krūties ligos - 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 dažniau 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 įvairius vaistinių augalų mišinius mastopatijai gydyti. Žinomos 4-6 tokios vaistinių augalų kompozicijos (patentai: CN 101129527 (A), CN 1657069 (A), CN 1757297 (A), CN 1895441 (A)), į kurių sudėtį įeina *Bupleurum*, *Jasminum*, *Reynotria*, *Polygonatum*, *Ziziphus*, *Carthamus* genčių vaistiniai augalai. Be šių, yra 7-10 vaistinių augalų kompozicijų [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)], kuriose 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 patentuota dar 24-35 vaistinių augalų rūšių kompozicijų 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. Šios kompozicijos pasižymi mastopatiją stabdančiomis savybėmis, tačiau jų trūkumas yra tai, kad stabdymas vertinamas tik patenkinamai (vidutinis inhibavimo lygis).

Mastopatijai gydyti vartojami ir vidutinio klimato zonos vaistinių augalų mišiniai (RU patentas 2 066 168 C1), kuriuos 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 radono procedūros (vonia) su kintančių bangų lazerio terapija (RU patentas 2 234 958 C2) 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 slopinama patogenezė, tačiau šis poveikis irgi yra ribotas.

Taip pat žinoma 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.

Indijoje tyrėjų grupė ištyrė (WO patentas 2004/067018 A1) vaistinių augalų *Carum carvi* (paprastasis kmynas), *Zingiber officinale* (imbieras tikrasis), *Cuminum cyminum* (kmyninis kuminas) ir *Piper nigrum* (juodasis pipiras) kompozicijos ekstrakto sinergetinį poveikį įvairiems gydomiesiems preparatams, siekdami padidinti jų veikimo efektyvumą. Į šių preparatų sąrašą buvo įtraukti onkologijos praktikoje naudojami metotreksatas (methotrexate) ir 5-fluorouracilas (5-fluorouracil). Vaistinių augalų kompozicijos ekstraktas pagerino nurodytų cheminių preparatų veikimą, t.y., pasižymėjo sinergetiniu veikimu.

Pateikiamo išradimo tiriamasis darbas suskirstytas į dvi dalis. Pirmoje dalyje įvertintas juodųjų pipirų (*Piper nigrum*) ir kmynų (*Carum carvi*) bei jų ekstraktų mišinio poveikis krūties vėžio (MCF-7), plaučių vėžio (A549) bei neuroblastomos (N2A) ląstelių. Antroje dalyje įvertintas juodųjų pipirų ir kmynų ekstraktų mišinio poveikis chemoterapinio vaisto – taksolio veikimo efektyvumui.

Naudotos metodikos.

Kmynų ir juodųjų pipirų fitocheminių junginių kompozicijos gavimas.

Kmynų ir juodųjų pipirų vaisiai mechaniškai susmulkinami (sumalami). Susmulkinta masė ekstrahuojama 60-96 % etilo alkoholiu 24 val., kambario temperatūroje purtant. Naudotas

kmynų ar juodųjų pipirų ir etilo alkoholio santykis maždaug 1:10 (1 g susmulkintų kmynų ar juodųjų pipirų vaisių ekstrahuota 10 ml 60-96 % etilo alkoholiu).

Siekiant įvertinti vaistiniuose augaluose esančių augalų veikliųjų medžiagų, tirpstančių etilo alkoholyje, suminį poveikį vėžinių ląstelių gyvybingumui, buvo gauta fitocheminių junginių kompozicija. Tuo tikslu, pradiniai kmynų bei juodųjų pipirų ekstraktų įvairūs tūriai buvo supilami kartu ir praskiedžiami ląstelių auginimo terpe iki 1 mL. Tokiu būdu buvo paruoštos 25 įvairios kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų koncentracijos, kuriomis buvo veikiamos tiriamos vėžinių ląstelių linijų ląstelės (1 lentelė). Gautos kompozicijos koncentracija buvo išreikšta dimensija - $\mu\text{L}/\text{mL}$, reiškiančia ekstrakto tūrį (μL) 1-me mL terpės.

Eteriniai aliejai yra svarbi paprastojo kmyno (*Carum carvi*) bei juodųjų pipirų (*Piper nigrum*) sudėtinė dalis. Paprastojo kmyno vaisiuose jų randama 3-7 proc., o juoduosiuose pipiruose iki 3 proc. Kadangi eteriniai aliejai yra tirpūs etanolyje, todėl etilo alkoholiu ekstrahuojant smulkintus šių augalų vaisius, aliejai ištirpsta jame. Eterinių aliejų ekstrakcija etanoliu yra priimtinas metodas, naudojamas išgaunant ekstraktus ir iš kitų prieskoninių ir/ar vaistinių augalų (Solano et al., 2006). Tokiu būdu gautame ekstrakto be kitų medžiagų turi būti ir eterinių aliejų dalis. Bendroje dalyje ir skiriamosios dalies pradžioje vaistiniuose augaluose *Carum carvi* bei *Piper nigrum* randama eterinių aliejų koncentracija ir jų sudėtis apibūdinama naudojantis literatūros duomenimis. Šiame darbe mes nekėlėme tikslo nustatyti tikslias eterinių aliejų koncentracijas mūsų gautame ekstrakto, nes be eterinių aliejų tirčiuose vaistiniuose augaluose randama ir daugiau veikliųjų etilo alkoholyje tirpstančių medžiagų, kurių suminis poveikis vėžinių ląstelių gyvybingumui ir buvo tirtas. Todėl kiekybinė sudėtis yra apibūdinama augalo vaisių masės santykiu su ekstrakcijai naudotu etilo alkoholio tūriu – 1:10, t.y. 1 g smulkintų vaisių ekstrakcijai naudota 10 mL etilo alkoholio.

Išradime pateikiama sąvoka „fitocheminių junginių kompozicija“ suprantama, kaip kmyno (*Carum carvi*) bei juodųjų pipirų (*Piper nigrum*) veikliųjų medžiagų, jų tarpe ir eterinių aliejų, tirpių etilo alkoholyje derinys. Sąvoka „kmyno (*Carum carvi*) ekstraktas arba juodųjų pipirų (*Piper nigrum*) etanolinis ekstraktas“ nepilnai atspindi paraiškoje pateikiamus duomenis, nes atskiri kmynų ir pipirų ekstraktai buvo naudoti tik palyginamajai analizei.

Naudotos ląstelės bei jų auginimo sąlygos

Darbe buvo vertintas spiritinio juodųjų pipirų vaisių ekstrakto poveikis krūties vėžio (MCF-7), plaučių vėžio (A549) bei neuroblastomos (N2A) linijų ląstelėms. Ląstelių linijos gautos iš ATCC (American Type Culture Collection). Ląstelės augintos Iscove modifikuotoje Dulbeco terpėje (IMDM), praturtintoje 10 % fetalinių veršelių serumu ir antibiotikais – penicilinu (100 VV) ir streptomycinu (100 $\mu\text{m/ml}$). 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 ir juodųjų pipirų vaisių ekstrakto mišinio poveikio ląstelių gyvybingumui tyrimas

Dieną prieš poveikį tiriamos ląstelės išsėjamos maždaug 200 ląstelių/ml. suspensijos tankiu į 96 duobučių polistirolinę plokštelę. Po 24 val., ląstelėms pradėjus daugintis, auginimo terpė pakeičiama nauja terpe, kurioje yra pridėta skirtingos koncentracijos kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų mišinio. 1 lentelėje pateikiama tyrimuose naudotų kmynų ir juodųjų pipirų vaisių ekstraktų koncentracijų kombinacijos. Lygiagrečiai buvo tiriamas ir ekstragento – etilo alkoholio bei pavienių kmynų bei juodųjų pipirų ekstraktų 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 $\mu\text{l/cm}^2$ pilama ant ląstelių monosluoksnio prieš tai pašalinus auginimo terpę. Inkubuojama 1 val., susidariusios nuosėdos tirpinamos etanoliu, kurio pilama 100 $\mu\text{l/cm}^2$. Optinis tankis matuojamas spektrofotometriškai, 570 nm bangos ilgyje.

Kmynų ir juodųjų pipirų vaisių ekstrakto slopinamojo poveikio MCF-7 linijos ląstelių proliferacijai tyrimas.

Pirmiausia buvo tiriama kmynų ir juodųjų pipirų ekstrakto mišinio poveikis krūties vėžio MCF-7 linijos ląstelių proliferacijai. Tuo tikslu buvo paruoštos 25 įvairios kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų koncentracijos (1 lentelė).

1 lentelė

Kmynai, $\mu\text{L/mL}$ \ Pipirai, $\mu\text{L/mL}$	Pipirai, $\mu\text{L/mL}$				
	2	4	6	8	10
10	2:10	4:10	6:10	8:10	10:10
20	2:20	4:20	6:20	8:20	10:20
30	2:30	4:30	6:30	8:30	10:30
40	2:40	4:40	6:40	8:40	10:40
50	2:50	4:50	6:50	8:50	10:50

Lentelėje išraiška 2:10 reiškia, kad 1-ame mL ląstelių auginimo terpės yra 2 μL etanolinio pipirų ekstrakto bei 10 μL analogiško kmynų ekstrakto. (Analogiškai suprantamos ir kitos išraiškos: 4:10, 6:10 ir t. t.).

Lentelėje pateiktomis ekstraktų mišinio koncentracijomis buvo veikiamos tiriamos ląstelės. Gauti rezultatai pateikiami Fig. 1 – Fig. 5 diagramose.

Fig. 1 diagramose A-E parodyta veikliųjų kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų koncentracijų poveikio MCF-7 linijos ląstelių proliferacijai tyrimas. Ekstraktų mišinio (pipirai – 8 ir 20 $\mu\text{L/mL}$ ir kmynai – 40 ir 50 $\mu\text{L/mL}$) slopinamasis poveikis MCF-7 linijos ląstelių proliferacijai gerai išreikštas – 75-80 %.

Analogiški tyrimai buvo atlikti su plaučių vėžio A549 linijos ląstelėmis.

Fig. 2 diagramose A-D parodyti gauti veikliųjų kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų koncentracijų poveikio A459 linijos ląstelių proliferacijai tyrimo duomenys. Iš pateiktų duomenų matyti, kad juodųjų pipirų ir kmynų mišinio poveikis plaučių vėžio A549 linijos ląstelėmis yra daug didesnis nei atskirų medžiagų ekstraktų veikimas, t. y. mišinio poveikis yra maždaug 80 %.

Taip pat buvo ištirtas kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų, naudojamų kartu su taksoliu, slopinamasis poveikis MCF-7 ir A549 linijos ląstelių proliferacijai. Buvo ištirta, kaip juodųjų pipirų ir kmynų ekstraktų mišinys pagerina chemoterapinio preparato taksolio veikimą. Žinoma, kad taksolis – plačiai naudojamas, mikrovamzdelius stabilizuojantis ir slopinantis jų dinamiką, chemoterapinis agentas, galintis įvairiose ląstelėse indukuoti programuotą ląstelių žūtį, priklausomai nuo p53 būklės. Jo veikimas pasireiškia tiesioginiu poveikiu mitochondrijoms, cit c išlaisvinimu, GTP sujungiančio baltymo aktyvacija ir NF- κ B/I κ B- α signalinio kelio aktyvacija. Taksolis (paclitaxel) indukuoja programuotą ląstelių žūtį aktyvuodamas kaspazę-7, o ne kaspazę-3. Be to, lygiagrečiai aktyvuojamos JNK, p38 MAPK ir ERK, tačiau jų aktyvacija yra nesusijusi su apoptozės indukcija (Okano et al., 2001).

Tyrimų metu taksolis buvo pridedamas 1 val. prieš paveikiant ląsteles su juodųjų pipirų ir kmynų ekstraktų mišiniu.

Fig. 3 diagramose A-B pateikiami duomenys, gauti veikliųjų kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų koncentracijų poveikio taksolio veikimui MCF-7 linijos ląstelėse tyrimas.

Fig. 4 diagramose A-B pateikiami duomenys, gauti veikliųjų kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų koncentracijų poveikio taksolio veikimui ir A459 linijos ląstelėse tyrimas .

Iš pateiktų duomenų matyti, kad juodųjų pipirų ir kmynų ekstraktų mišinys padidina taksolio veikimą, tačiau suminis poveikis dažniausiai yra mažesnis už juodųjų pipirų ir kmynų ekstraktų mišinio veikimą, kai nėra taksolio.

Taip pat buvo ištirtas kmynų vaisių ekstrakto slopinamasis poveikis neuroblastomos (N2A) linijos ląstelių proliferacijai.

Atliktas kmynų vaisių 60-96 % alkoholinio ekstrakto (kmynų tinktūros) poveikis neuroblastomos (N2A) linijų ląstelėms.

Fig. 5 diagramoje parodytas kmynų vaisių ekstrakto slopinamasis poveikis neuroblastomos (N2A) linijos ląstelių proliferacijai. Ektrakto poveikis neuroblastomos ląstelių proliferacijai yra gerai išreikštas ir siekia iki 80 %.

Tyrimai parodė, kad kmynų vaisių ekstraktas, pasižymintis netoksiniu arba silpnai išreikštu toksiniu veikimu, intensyviai stabdo neuroblastomos (N2A) ląstelių dauginimąsi. Jis tinka neuroblastomos profilaktikai ir gydymui.

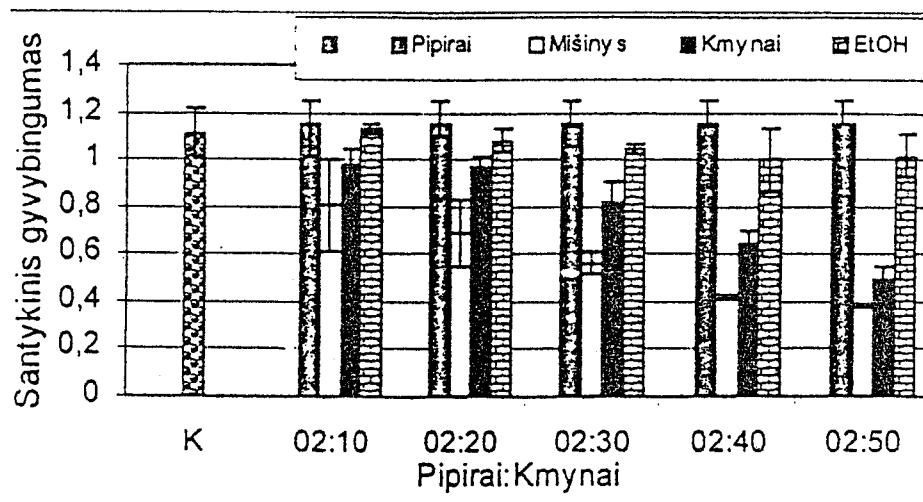
Tyrimais taip pat įsitikinta, kad ekstraktų mišinio (pipirai+kmynai) slopinamasis poveikis MCF-7 linijos ląstelių proliferacijai gerai išreikštas. Reikšmingi rezultatai gauti tiriant slopinamąjį kmynų ir juodųjų pipirų ekstraktų mišinio poveikį A549 linijos ląstelių proliferacijai. Nustatyta, kad mišinio poveikis yra daug didesnis nei atskirų fitocheminių junginių veikimas. Taip pat parodyta, kad chemoterapinio preparato taksolio gydomasis veikimas MCF-7 ir A549 ląstelių linijoms pagerėja, kai jis naudojamas kartu su kmynų ir juodųjų pipirų alkoholiniu ekstraktu.

Ši gausi informacija verta to, kad būtų išbandyta klinikos sąlygomis.

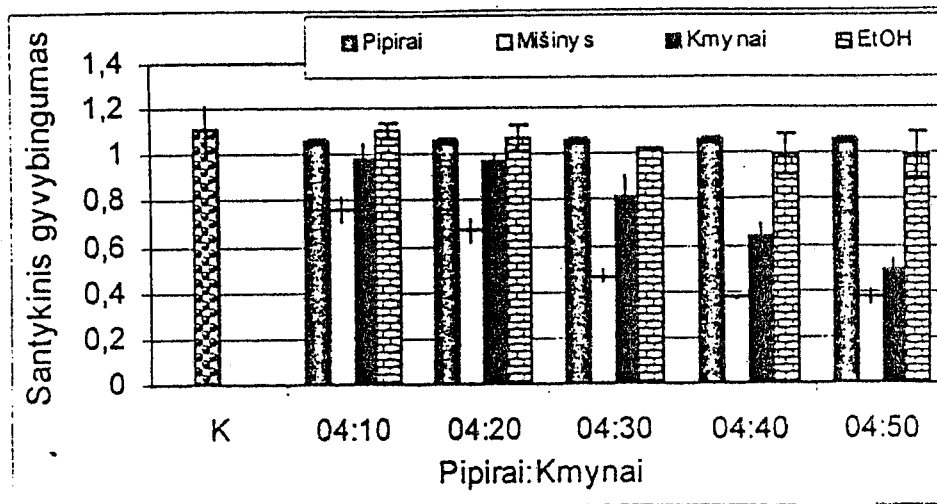
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Fitocheminių junginių kompozicija, skirta vėžiui gydyti, apimanti eterinius aliejus ir tirpiklį, besiskirianti tuo, kad kurioje eterinius aliejus sudaro dipenteno, felandreno, seskviterpeno, kariofileno junginiai, alkaloido piperino, esančių juodųjų pipirų (*Piper nigrum*) vaisiuose, kompleksas, ir/arba fitocheminių junginių karvono, limoneno, steroidų, flavonoidų, esančių vaistinio augalo paprastojo kmyno (*Carum carvi*) vaisiuose, kompleksas, o tirpiklis yra 60-96 % etilo alkoholis, kur kompozicijos komponentai įeina tokiu masės dalių santykiu: juodųjų pipirų ir paprastojo kmyno vaisių mišinio ir 60-96 % etilo alkoholio maždaug 1:10.
2. Kompozicijos pagal 1 punktą gavimo būdas, besiskirianti tuo, kad kompozicijai gauti gamina fitocheminių junginių ekstraktus, kur sausus juodųjų pipirų (*Piper nigrum*) vaisius ir/arba vaistinio augalo paprastojo kmyno (*Carum carvi*) vaisius, turinčius ne daugiau kaip 12 % drėgmės, susmulkina ir ekstrahuoja 60-96 % etilo alkoholiu per 24-72 val. 18-20 °C temperatūroje purtant.
3. Kompozicijos pagal 1 ir 2 punktus panaudojimas MCF-7 linijos ląstelių proliferacijai slopinti, kur kompoziciją sudaro pipirų ekstrakto – 8-20 µL/mL ir kmynų ekstrakto – 40-50 µL/mL mišinys.
4. Kompozicijos pagal 1 ir 2 punktus panaudojimas A549 linijos ląstelių proliferacijai slopinti, kur kompoziciją sudaro pipirų ekstrakto – 4-8 µL/mL ir kmynų ekstrakto – 20-40 µL/mL mišinys.
5. Kompozicijos pagal 1 ir 2 punktus panaudojimas kartu su vaistiniu preparatu taksoliu MCF-7 linijos ląstelių proliferacijai slopinti, kur kompoziciją sudaro pipirų ekstrakto – 4-8 µL/mL ir kmynų ekstrakto – 20-30 µL/mL mišinys.
6. Kompozicijos pagal 1 ir 2 punktus panaudojimas kartu su vaistiniu preparatu taksoliu A549 linijos ląstelių proliferacijai slopinti, kur kompoziciją sudaro pipirų ekstrakto – 2-4 µL/mL ir kmynų ekstrakto – 20-30 µL/mL mišinys.
7. Kompozicijos pagal 1 ir 2 punktus panaudojimas neuroblastomos proliferacijai slopinti, kur kompoziciją sudaro kmynų ekstraktas 20-40 µL/mL.

A



B



C

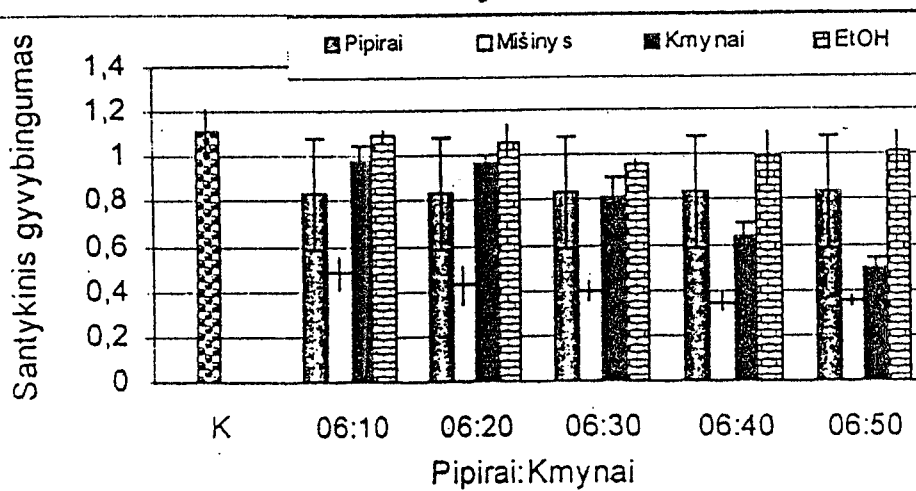
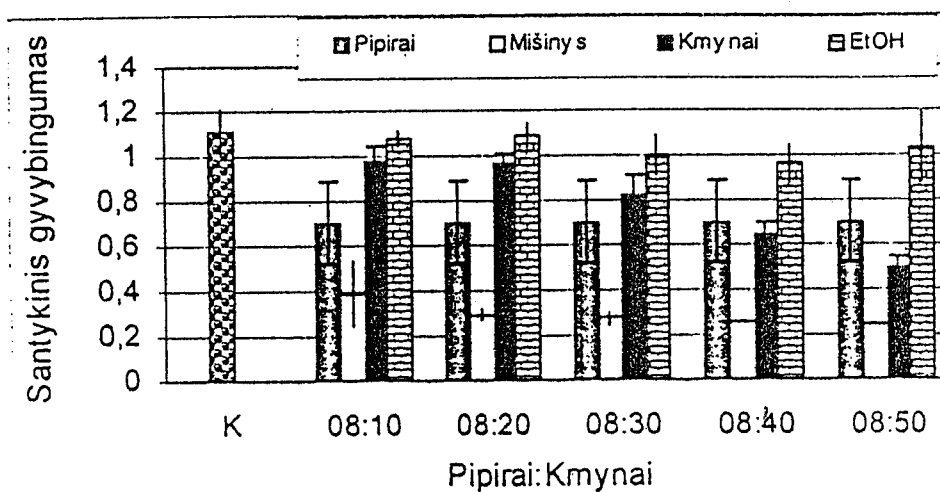


Fig. 1

D



E

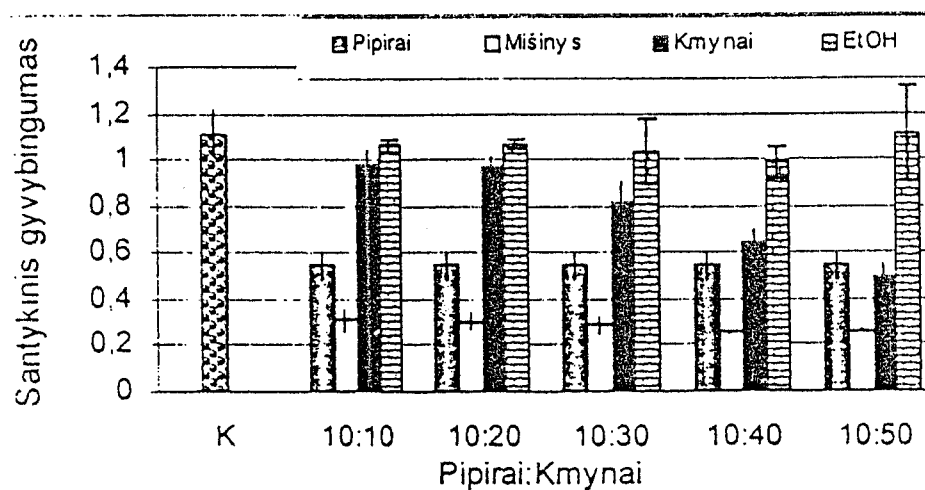
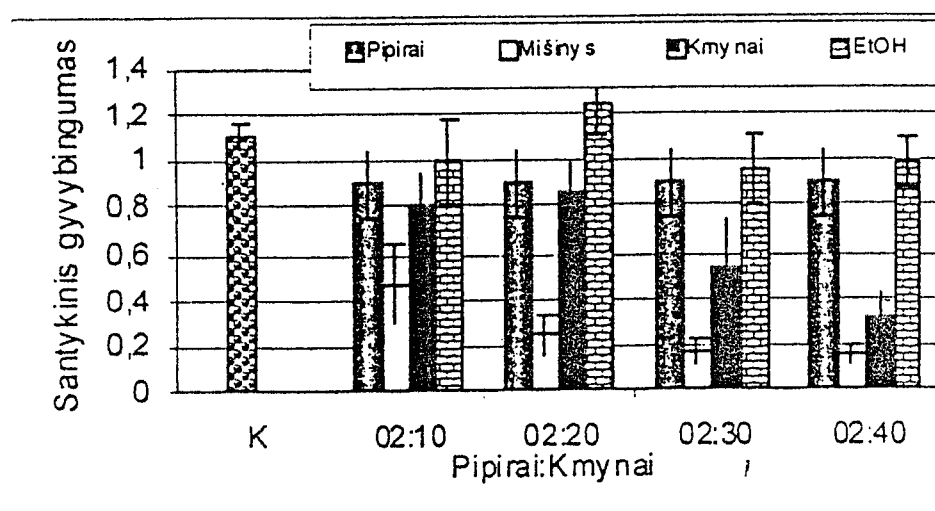


Fig. 1

A



B

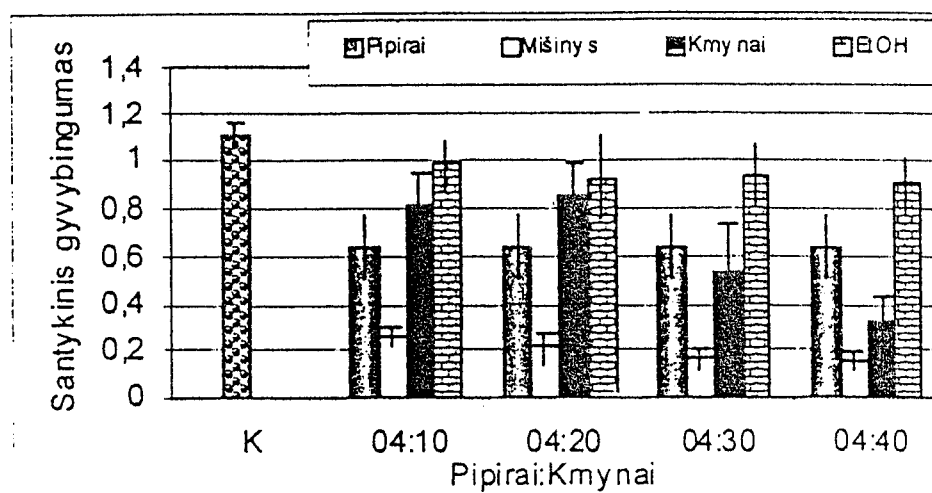
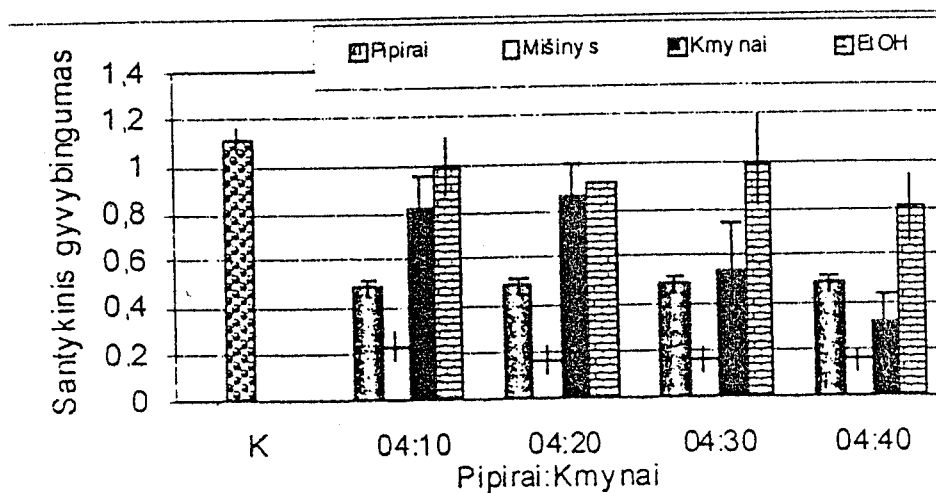


Fig. 2

C



D

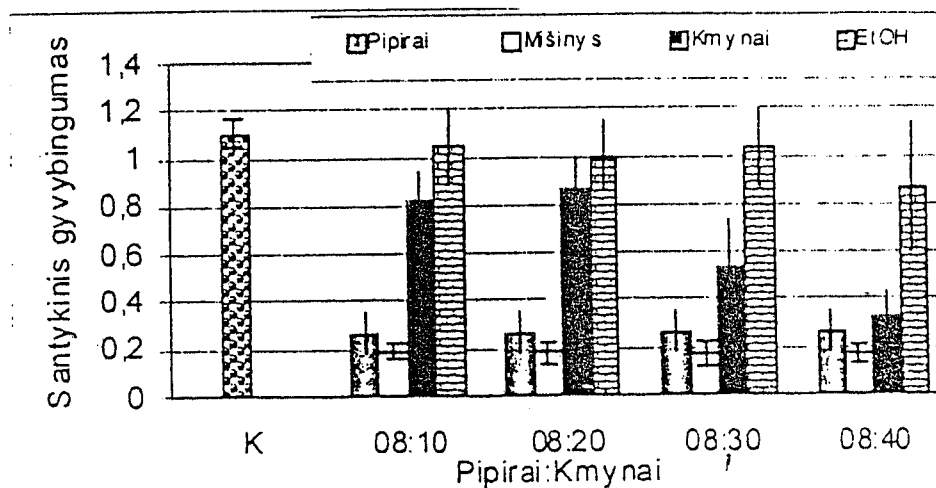


Fig. 2

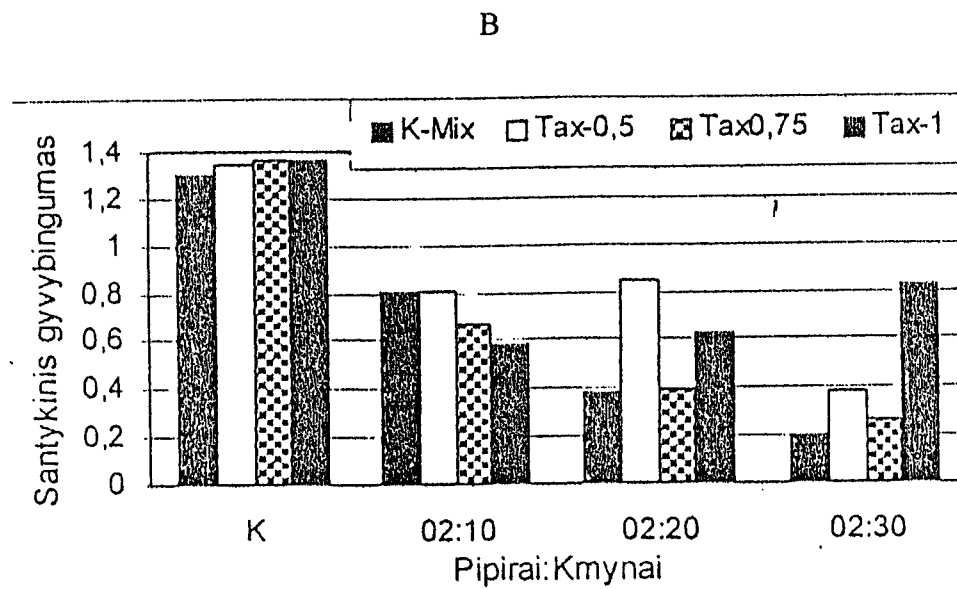
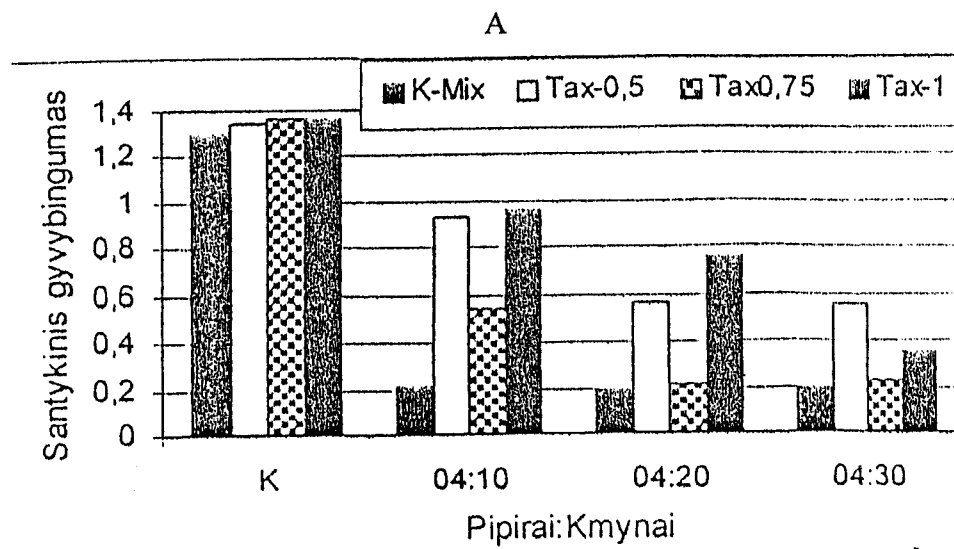


Fig. 3

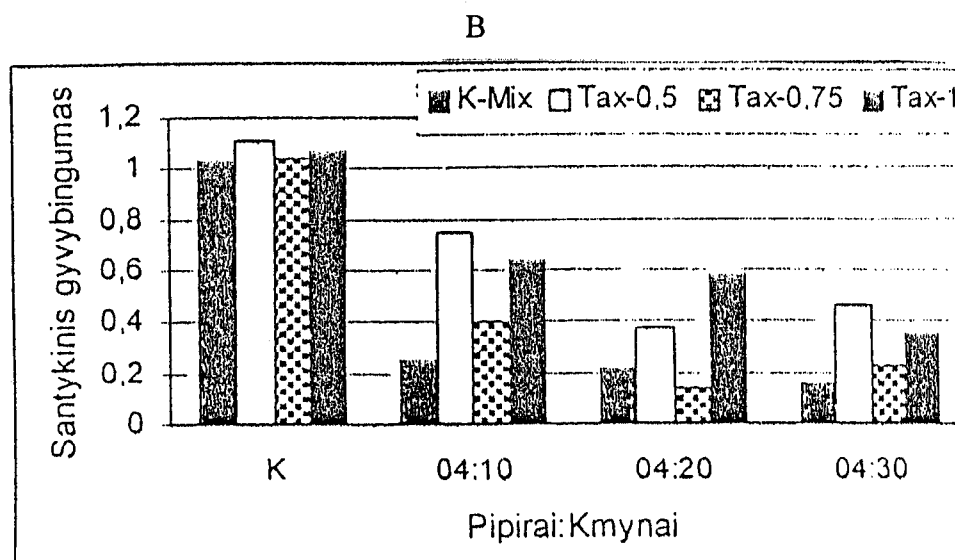
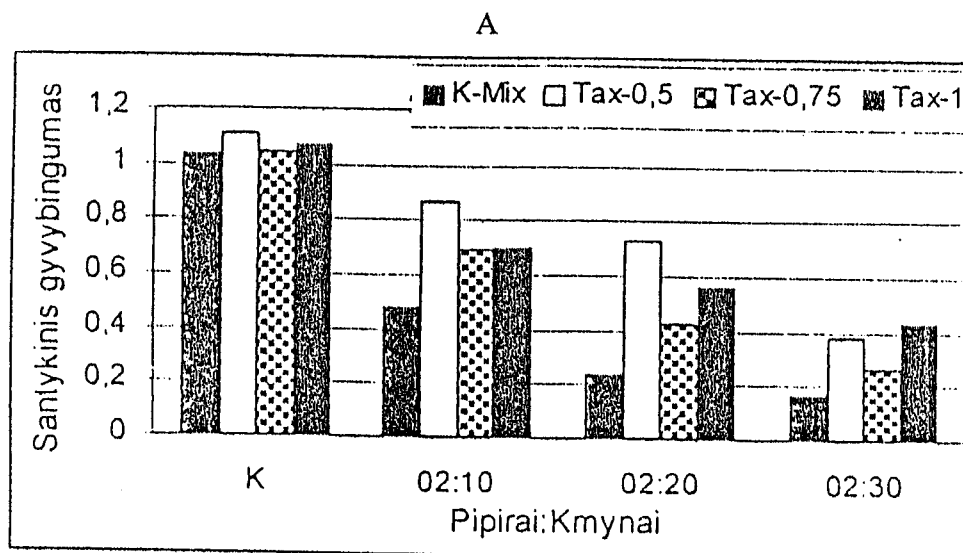


Fig. 4

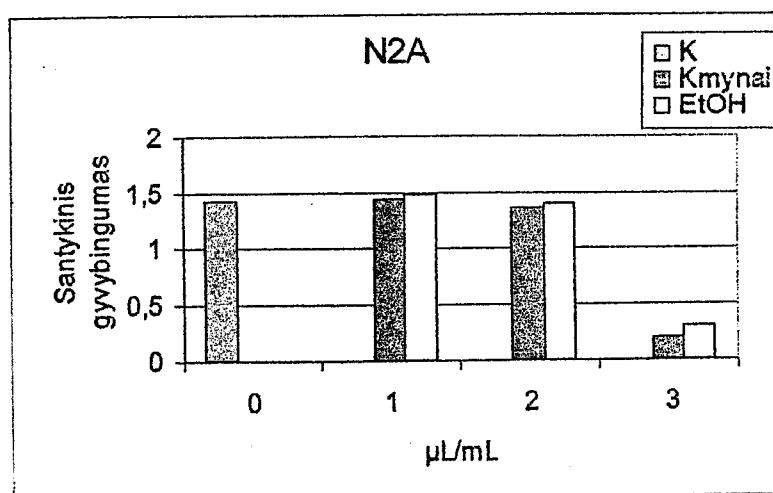


Fig. 5