



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **141358** (13) **U**
(51) МПК

A61K 36/739 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2019 08235</p> <p>(22) Дата подання заявки: 15.07.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2020</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2020, Бюл.№ 7</p>	<p>(72) Винахідник(и): Шульга Людмила Іванівна (UA), Безкровна Катерина Сергіївна (UA), Пімінов Олександр Фомич (UA), Осолодченко Тетяна Павлівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</p>
---	--

(54) ЗАСТОСУВАННЯ РОДОВИКА КОРЕНІВ ЕКСТРАКТУ СУХОГО ЯК СУБСТАНЦІЇ З АНТИХЕЛІКОБАКТЕРНОЮ ДІЄЮ

(57) Реферат:

Застосування родовика коренів екстракту сухого як субстанції з антихелікобактерною дією.

UA 141358 U

Корисна модель належить до фармації та медицини, а саме до використання рослинних субстанцій при розробці лікарських засобів, що ефективні при виразковій хворобі шлунка та дванадцятипалої кишки, асоційованої з *Helicobacter pylori*.

5 На сьогоднішній день на фармацевтичному ринку наявні препарати різних фармакологічних груп, які призначаються у комплексній терапії виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої
кишки: антисекреторні засоби, гастропротектори, антибактеріальні, антацидні та обволікаючі
засоби та інші. Однак, виникають складнощі при підборі дози антисекреторних засобів в межах
стандартних схем лікування, що призводить як до зниження терапевтичної ефективності, так і
до розвитку виражених побічних ефектів, пов'язаних з глибоким і тривалим пригніченням
10 секреторної функції шлунка. Застосування антибактеріальних препаратів як складових у різних
за тривалістю схемах ерадикації хелікобактерної інфекції (терапія першої лінії: стандартна
трикомпонентна терапія або послідовна терапія; терапія другої лінії чи "квадротерапія"; терапія
"порятунку") спричиняє низку побічних ефектів, що ускладнює процес лікування, може сприяти
поширенню резистентних штамів *Helicobacter pylori*, не вирішує проблему виникнення рецидивів
15 захворювання.

При виразковій хворобі шлунка та дванадцятипалої кишки, хронічному гастриті, у тому числі
спричинених *Helicobacter pylori*, у складі схем антихелікобактерної терапії застосовуються
препарати вісмуту, одним з яких є препарат "Де-Нол" (Astellas Pharma Europe B. V.,
Нідерланди), що містить вісмуту субцитрат. Препарат має бактерицидну дію щодо *Helicobacter*
20 *pylori*, у кислому середовищі шлунка на поверхні виразок, ерозій утворює захисну плівку,
захищаючи від впливу шлункового соку, що сприяє їх рубцюванню; збільшує синтез
простагландину E2, стимулює утворення слизу і бікарбонатів, призводить до накопичення
епідермального фактора росту в зоні дефекту, знижує активність пепсину і пепсиногену. Однак,
не рекомендується прийом антацидних лікарських засобів та вживання молока за півгодини до
25 та через півгодини після прийому препарату (наявний шлунковий сік потрібен для формування
захисного шару), також слід уникати тривалого вживання високих доз сполук вісмуту через
виникнення у рідкісних випадках зворотної енцефалопатії. Серед побічних реакцій при
застосуванні препарату - нудота, блювота, запор, діарея.

У терапії хвороб шлунково-кишкового тракту здавна використовують препарати рослинного
походження, які забезпечують вимоги раціональної фармакотерапії, особливо при лікуванні
станів, що супроводжуються порушенням процесів репарації та виразкоутворенням. Існує
лікарський засіб "Стилен" (Dong-A ST Co., Ltd., Республіка Корея), що у складі містить екстракт
листя полину *Artemisiae Argui*, м'який (20:1), та рекомендується для лікування уражень слизової
35 оболонки шлунка (ерозії, геморагії, гіперемія, набряк) при гострих і хронічних гастритах, а також
гастритах, викликаних інфекцією *Helicobacter pylori*, у комплексній терапії одночасно з
призначенням лікарських засобів, які використовуються для ерадикації *Helicobacter pylori*.
Стилен чинить загоювальну дію на слизову оболонку шлунка при гастритах шляхом посилення
репаративних процесів в уражених клітинах слизової оболонки, що забезпечується
стимулюванням флавоноїдами синтезу білка та покращенням місцевого кровопостачання;
40 протизапальну активність, яка реалізується через виражені антиоксидантні властивості,
зокрема запобігання пероксидації ліпідів і блокування утворення біореактивних форм кисню,
пригнічуючи вивільнення лейкотрієну D4, спричиненого *Helicobacter pylori* *in vitro*, і зниження
активації транскрипційного фактора NF- κ B, асоційованого із запаленням; захищає слизову
оболонку шлунка від пошкоджень різних ульцерогенів (алкоголю, 2 нестероїдних
45 протизапальних засобів), стимулює секрецію слизу епітелієм шлунка, не впливаючи на
базальну секрецію шлункового соку та вироблення соляної кислоти. Недоліком даного
лікарського засобу є неможливість його застосування при спадковій непереносимості галактози,
дефіциті лактази або синдромі мальабсорбції глюкози-галактози.

В основу корисної моделі поставлено задачу пошуку субстанцій для створення нових
50 лікарських засобів, призначених для застосування у гастроентерологічній практиці для
покращення ефективності терапії виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки,
асоційованої з *Helicobacter pylori*.

Поставлена задача вирішується шляхом застосування родовика коренів екстракту сухого як
субстанції з антихелікобактерною дією при створенні оригінальних лікарських засобів.

55 Об'єкт дослідження - родовика коренів екстракт сухий, що отримано шляхом багаторазової
екстракції сировини 50 % розчином етанолу.

Всі параметри заявленого способу визначені експериментальним шляхом при проведенні
численних дослідів.

Суть запропонованої корисної моделі ілюструється прикладами.

60 Приклад 1. Визначення протимікробної дії родовика коренів екстракту сухого.

Визначення протимікробної дії проводилося на базі лабораторії біохімії та біотехнології ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. 1.1. Мечникова НАМН України" під керівництвом к. біол. н., ст. н. с. Осолодченко Т. П.

5 Як препарат порівняння використовували лікарський засіб Де-Нол (Astellas Pharma Europe B. V., Нідерланди) та рослинний препарат Стилен (Dong-A ST Co., Ltd., Республіка Корея).

Як тест-культуру використовували циркулюючі клінічні ізоляти *Helicobacter pylori*, які були вилучені з біоптатів слизової оболонки антрального відділу шлунка від хворих на запально-виразкові захворювання гастродуоденального тракту:

10 штам № 1 - вилучений від хворого на гострий гастрит (за Міжнародним класифікатором хвороб 10 (МКХ 10) - К 29.10);

штам № 2 - вилучений від хворого на гострий гастрит (за МКХ 10 -К 29.10);

штам № 3 - вилучений від хворого на гостру виразку шлунка у стадії рубцювання (за МКХ 10 - К 25.30);

штам № 4 - вилучений від хворого на гострий геморагічний гастрит (за МКХ 10-К 29.00);

15 штам № 5 - вилучений від хворого на гостру виразку дванадцятипалої кишки (за МКХ 10 - К 26.30);

штам № 6 - вилучений від хворого на гострий гастрит (за МКХ 10 -К 29.10);

штам № 7 - вилучений від хворого на гострий геморагічний гастрит (за МКХ 10-К 29.00);

штам № 8 - вилучений від хворого на гострий гастрит (за МКХ 10-К 29.10).

20 При дослідженні користувались спеціалізованим транспортним середовищем "Portagerm pylori" (bioMerieux, Франція), елективним середовищем "Pylori agar" (bioMerieux, Франція), середовищем PVX (bioMerieux, Франція), середовищем шоколадний агар на основі агару Мюллер-Хінтон (Biolife Italiana Sri, Італія) лабораторного приготування, середовищем Мюллер-Хінтон бульон (Biolife Italiana Sri, Італія) із додаванням 1 % дріжджового діалізату та 5 % дефібринованої крові. Мікроаерофільні умови культивування створювали у спеціальному боксі GENbox Jar 2,5 L за допомогою газогенеруючих пакетів Generator GENbox мікроаер (bioMerieux, Франція). Ідентифікація вилучених культур хелікобактерів здійснювалась за допомогою API системи виробництва bioMerieux, Франція - api Camru за 20 біохімічними мікротестами.

30 Прилад Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія) використовували для приготування суспензії мікроорганізмів з визначеною концентрацією мікробних клітин певного оптичного стандарту густини за шкалою McFarland.

Біоптати, відібрані при проведенні стандартної фагогастродуоденоскопії, асептично вносили у транспортне середовище "Portagerm pylori" та доставляли в лабораторію. Біоптат асептично переносили в біологічний гомогенізатор і розтирали, додаючи 1 мл фізіологічного розчину. 35 Гомогенізатор висівали на елективне середовище "Pylori agar". Посіви культивували у GENbox контейнері у мікроаерофільних умовах із використанням газогенеруючих пакетів упродовж 48-72 годин при 37 °С. Наявність антихелікобактерної дії у заявленому екстракті та препаратах порівняння визначали напівкількісним методом "колодязів". Оптична щільність мікробної суспензії перелічених мікроорганізмів відповідала за шкалою McFarland 0,5 одиниць, згідно з 40 наказом № 167 МОЗ України від 05.04.2007 р.

Облік результатів проводили шляхом вимірювання діаметрів зон пригнічення росту тест-штамів, включаючи діаметр лунок.

Результати визначення протимікробної дії зразків родовика коренів екстракту сухого та препаратів порівняння щодо клінічних штамів *Helicobacter pylori* наведені у таблиці 1.

45 Визначено, що всі досліджені штами *Helicobacter pylori* проявили різний рівень чутливості до родовика коренів екстракту сухого та лікарського препарату Де-Нол. Рослинний засіб Стилен пригнічував розмноження лише одного штаму, що вилучено від хворого на гострий геморагічний гастрит у максимальній, вибраній для дослідження, концентрації. Слід зазначити, що отримані результати є орієнтовними, оскільки значення зон затримки росту тест-штамів залежать від 50 зони дифузії активних речовин у товщі агарового середовища.

Протимікробна дія досліджуваних об'єктів по відношенню до клінічних штамів *Helicobacter pylori*

№ п/п	Досліджуваний об'єкт	Досліджена концентрація, мг/мл	Наявність/відсутність зони затримки росту клінічних штамів № штаму							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1	Родовика коренів екстракт сухий	6	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,6	+	+	-	+	+	+	+	+
		0,06	+	-	-	+	+	+	+	-
2	Де-Нол	6	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,6	-	-	-	+	+	-	-	-
		0,06	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Стилен	6	-	-	-	+	-	-	-	-
		0,6	-	-	-	-	-	-	-	-
		0,06	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітки:

1. + наявність зони затримки росту штаму;
2. - відсутність зони затримки росту штаму.

Приклад 2. Визначення мінімальних інгібуючих та бактерицидних концентрацій родовика коренів екстракту сухого.

5 Визначення мінімальних інгібуючих та бактерицидних концентрацій зразків сухого екстракту родовика, лікарських препаратів Де-Нол та Стилен у рідкому поживному середовищі щодо штамів, які виявили чутливість до тест-зразків, проводили методом серійних розведень у рідкому живильному середовищі.

10 З робочих розчинів досліджуваних зразків або препаратів-порівняння у пробірках з середовищем Мюллер-Хінтон бульйон готували дворазові розведення у об'ємі 2 мл. Додатково готували контроль середовища - 2 пробірки з 2 мл використаного середовища в кожній та контроль росту тест-культур - 2 пробірки з 2 мл використаного середовища. У кожен пробірку, окрім контролю середовища, вносили по 0,2 мл відповідної мікробної зависі ($2 \cdot 10^8$ КУО/мл бактерій). Інкубували при 35 °С у GENbox контейнері у мікроаерофільних умовах із використанням газогенеруючих пакетів упродовж 48 годин.

15 Облік результатів проводили візуально за наявністю або відсутністю каламутності середовища в пробірках. Концентрація препарату в останній пробірці (з ряду двократних розведень одного зразка) з прозорим середовищем (відсутність видимого неозброєним оком росту тест-штаму) відповідає мінімальній інгібуючій концентрації (МІК) препарату за умови 20 росту тест-штаму в контрольних пробірках і прозорості середовища у пробірках з контролем середовища.

25 Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБК) з 2-3 пробірок з прозорим середовищем робили висіви по 0,1 мл вмісту з кожної пробірки на чашки з PVX агаром. Інкубували при 35 С у GENbox контейнері у мікроаерофільних умовах із використанням газогенеруючих пакетів упродовж 48 годин та відмічали МБК препарату, висів з якої не дав росту на агарі. Результати наведені у таблиці 2.

Визначення МІК та МБК у досліджуваних об'єктах (n=3)

№ штаму Helicobacter pylori	Межі протимікробних концентрацій досліджених зразків стосовно клінічних штамів, мкг/мл					
	Родовика коренів екстракт сухий		Де-Нол		Стилен	
	МІК	МБК	МІК	МБК	МІК	МБК
1	64-128	256-512	32-64	64	н/п	н/п
2	256	512	128-256	256	н/п	н/п
3	256-512	512-1024	256-512	512	н/п	н/п
4	16-32	64-128	8-32	32-64	2048	**
5	64	256	32-64	64	н/п	н/п
6	128	512	128-256	256	н/п	н/п
7	64	256	64	64	н/п	н/п
8	256-512	512-1024	64	64-128	н/п	н/п

Примітки:

1. МІК - мінімальна інгібуюча концентрація;
2. МБК - мінімальна бактерицидна концентрація;
3. н/п - не проводили;
4. ** - у межах концентрацій для даного методу не виявлено.

За результатами кількісного визначення протимікробної дії зразків встановлено, що межі МІК родовика коренів екстракту сухого для циркулюючих клінічних-штамів становили 16-512 мкг/мл, медіана 128 [64; 256] мкг/мл; межі МБК - 64-1024 мкг/мл, медіана 512 [256; 512] мкг/мл.

Препарат порівняння Стилен виявив протимікробну дію лише до одного тест-штаму (вилученого від хворого на гострий геморагічний гастрит), інгібував розмноження Helicobacter pylori у концентрації 2048 мкг/мл, визначити МБК у межах концентрацій для даного методу було неможливо. Межі МІК лікарського препарату порівняння - Де-Нол становили 8-512 мкг/мл, медіана 64 [64; 256] мкг/мл; межі МБК - 32-512 мкг/мл, медіана 64 [64; 256] мкг/мл. Таким чином, встановлено, що родовика коренів екстракт сухий володіє протимікробною дією щодо актуальних клінічних штамів Helicobacter pylori.

У даному дизайні дослідження встановлено, що за показниками антихелікобактерної дії (спектр дії, значення МІК та МБК) досліджений об'єкт значно перевищує препарат порівняння рослинного походження -Стилен ($p < 0,001$). За спектром дії та значеннями МІК родовика коренів екстракт сухий можна співставити з лікарським засобом Де-Нол, проте за бактерицидною активністю досліджуваний зразок сухого екстракту поступається лікарському засобу ($p < 0,05$).

На підставі отриманих даних мікробіологічних досліджень доведено антихелікобактерну дію родовика коренів екстракту сухого, яка поряд з гастропротекторною та антимікробною дією, є підставою для наукової діяльності зі створення оригінальних ефективних та нешкідливих лікарських засобів у різних лікарських формах для гастроентерології на основі родовика коренів екстракту сухого, що можуть бути застосовані для покращення фармакотерапії виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, асоційованої з Helicobacter pylori.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Застосування родовика коренів екстракту сухого як субстанції з антихелікобактерною дією.

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601