



(51) МПК

A23L 1/30 (2006.01)*A23L 1/325* (2006.01)*A61K 35/56* (2006.01)*A61P 1/16* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009141862/13, 12.11.2009**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.11.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **12.11.2009**(45) Опубликовано: **20.08.2011** Бюл. № 23(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2271820 C1, 20.03.2006. RU 2236155 C1, 20.09.2004. RU 2215532 C2, 10.11.2003. RU 2289956 C1, 27.12.2006. JP 2004-242651, 02.09.2004.**

Адрес для переписки:

**690022, г. Владивосток, пр-кт 100-летия
Владивостока, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко**

(72) Автор(ы):

**Стоник Валентин Аронович (RU),
Агафонова Ирина Григорьевна (RU),
Аминин Дмитрий Львович (RU),
Антонов Александр Сергеевич (RU),
Иващенко Вера Федоровна (RU),
Макарьева Татьяна Николаевна (RU),
Ребачук Николай Михайлович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК ТИХООКЕАНСКИЙ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ
ХИМИИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК (ТИБОХ ДВО РАН)
(RU)**

(54) СПОСОБ ПЕРЕРАБОТКИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ КУКУМАРИИ *Cucumaria japonica* И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ПРОДУКТ, ПОЛУЧАЕМЫЙ ЭТИМ СПОСОБОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической и пищевой промышленности и касается способа переработки дальневосточной промысловой голотурии *Cucumaria japonica* и биологически активного продукта, получаемого этим способом. Способ включает измельчение кожно-мышечного мешка кукумарии, экстракцию 96% этиловым спиртом при нагревании, отделение экстракта, повторное экстрагирование остатка, отделение супернатанта центрифугированием и объединение экстрактов. Затем остаток ткани кукумарии высушивают на воздухе при комнатной температуре и вакуумируют. Далее

измельчают в течение 3-5 часов и просеивают через сито до размера частиц готового продукта не более 0,08 мм. Получаемый продукт обладает гепатопротекторными свойствами и содержит в качестве основных компонентов, в мас. %: белок - не менее 70, углеводы - 4,5-4,9, кальций - 1,5-1,9, натрий - 0,9-1,3, магний - 0,5-0,9, калий - 0,2-0,6, спирт - не более 0,5%, влагу - не более 10% и золу - не более 8%. Изобретение позволяет более полно переработать ценное биологическое сырье, а также получить новый продукт, являющийся источником незаменимых аминокислот и пищевых волокон, который используют для профилактики токсических поражений печени 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 3 ил., 5 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01)*A23L 1/325* (2006.01)*A61K 35/56* (2006.01)*A61P 1/16* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009141862/13, 12.11.2009**(24) Effective date for property rights:
12.11.2009

Priority:

(22) Date of filing: **12.11.2009**(45) Date of publication: **20.08.2011 Bull. 23**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Stonik Valentin Aronovich (RU),
Agafonova Irina Grigor'evna (RU),
Aminin Dmitrij L'vovich (RU),
Antonov Aleksandr Sergeevich (RU),
Ivashchenko Vera Fedorovna (RU),
Makar'eva Tat'jana Nikolaevna (RU),
Rebachuk Nikolaj Mikhajlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**UChREZhDENIE ROSSIJSKOJ AKADEMII
NAUK TIKHOOKEANSKIJ INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KHIMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh DVO
RAN) (RU)**

(54) **METHOD FOR PROCESSING Cucumaria japonica (JAPANESE CUCUMARIA) AND BIOLOGICALLY ACTIVE PRODUCT PRODUCED BY THIS METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: invention relates to chemical and pharmaceutical and food industries and deals with a method for processing commercial Japanese sea cucumber (*Cucumaria japonica*) and a biologically active product produced by this method. The method involves milling cucumaria skin-muscular sac, its extraction with 96% ethyl alcohol under heating conditions, the extract separation, repeated extraction of the residue, supernatant separation by way of centrifugation and the extracts combination. Then the cucumaria tissue residue is air-dried at room temperature and vacuumised. Then the tissue residue is milled during 3-5 hours and strained

through a sieve till the end product particles size is no more than 0.08 mm. The produced product has hepato-protective properties and contains the following basic components (wt %): protein- no less than 70, carbohydrates - 4.5-4.9, calcium - 1.5-1.9, sodium - 0.9-1.3, magnesium - 0.5-0.9, potassium - 0.2-0.6, alcohol - no more than 0.5%, moisture - no more than 10% and ashes - no more than 8%.

EFFECT: invention allows to more completely process a valuable biological raw material as well as manufacture a new product (being a source of indispensable amino acids and food fibres) used for prevention of toxic liver diseases.

3 cl, 3 dwg, 5 tbl, 5 ex

Изобретение относится к химико-фармацевтической и пищевой промышленности и касается способа переработки ценного биологического сырья - дальневосточной промысловой голотурии *Cucumaria japonica* с получением биологически активных продуктов, в частности продукта, обладающего гепатопротекторным действием.

Известен способ получения комплекса биологически активных веществ из голотурии *Cucumaria frondosa*, обитающей в Баренцевом море [RU 2112527 C1, 10.06.1998]. Способ предусматривает измельчение сырья, многократную экстракцию биомассы, объединение экстрактов, разделение и очистку полученных соединений и получение целевых продуктов, таких как комплекс сапонинов, обладающих противоопухолевым и иммуномоделирующим действием, антимикробной и антивирусной активностью; каротиноидов - пигментов, синтезируемых морскими организмами, которые необходимы в пищевой промышленности, и белковой кормовой добавки, которая может быть использована при приготовлении корма для рыб и животных или в качестве субстанции для получения таких веществ, как коллаген, используемый в косметике и медицине.

Описаны новые липиды, получаемые из класса Холофуридия (*Holothuridid*) или морского огурца и особенно из его разновидности Кукумария фрондоза (*Cucumaria frondosa*). Эти препараты подавляют ферменты липоксигеназу и/или связывают рецепторы лейкотриена. Масла некоторых видов таких морских огурцов могут быть использованы для пигментации морских видов животных путем включения их в состав водного корма, а также для лечения болезней и облегчения течения болезней, при которых продукты активности фермента липоксигеназы или реакции лейкотриенов ухудшают патологическое состояние [RU 2234928 C2, 27.08.2004].

Известен способ получения сульфатированного полисахарида из дальневосточного трепанга и использование этого вещества для лечения сосудистой гиперплазии [US 5993797, 30.11.1999]. Патентованы методы, включающие получение фракций B1000 и T2000 из эпителиального слоя и «венчиков» «морского огурца» (*Cucumaria frondosa*, *Cucumaria echinata*, *Cucumaria chronhjelmi*) и использование этих фракций в различных концентрациях и вариациях для лечения различных артритных воспалительных ревматоидных процессов [US 5985330, 16.11.1999; US 5989592, 23.11.1999; US 5770205, 23.06.1998; US 5876762, 02.03.1999].

Известен способ комплексной переработки голотурий, при котором сырье (трепанг или кукумария) разделяют, удаляют внутренности, венчики и внутрибрюшную пленку и варят в морской, пресной или подсолонной воде [RU 2236155 C2, 20.09.2004]. Сушку термически обработанной кукумарии производят при температуре от 10 до 65°C до содержания воды в продукте, равного 5-12%, минеральных веществ 4-8% с получением полуфабриката для производства пищевого продукта. Внутренности голотурии подвергают стечке, легкой подпрессовке, подмораживанию, измельчению и сушке.

Полученную кормовую биологически активную добавку используют как средство, повышающее устойчивость животных к инфекционным заболеваниям в виде добавки к корму. Варочные среды собирают и высушивают до содержания воды 5-12% с получением биологически активной добавки к пище «Акмар». Полученный продукт используют как адаптогенное средство в виде порошка, таблеток, а также в капсулированной форме. Биологически активная добавка «Акмар» представляет собой порошок серого с различными оттенками коричневого цвета, полученный из высушенных вод при комплексной переработке голотурии, и состоит из белка - 32,0-42,0%, воды - 5,0-12,0%, минеральных веществ - 50,0-55,0%

(преобладающими элементами являются кальций, калий, натрий, магний), липидов - 0,05-0,2%, сумма тритерпеновых гликозидов находится в пределах 5000-7000 мкг/г, аминокислот - 0,5-2,0%.

К недостаткам БАД, получаемой путем высушивания варочных сред голотурий, относится присутствие липидов, которые содержатся в варочной воде и, соответственно, содержатся в готовом продукте. Присутствие окисляемых липидов снижает качество и срок хранения продукта.

Известен способ комплексной переработки внутренностей голотурий с получением биологически активных добавок к пище «ТИНГОЛ-2» и «ЭРОГОЛ» [RU 2215532 С2, 10.11.2003]. Способ характеризуется тем, что внутренности голотурий измельчают до частиц величиной не более 0,5 мм, экстрагируют этиловым спиртом в соотношении от 1:1 до 1:3 при температуре от минус 5 до плюс 60°C в течение от 5 ч до 10 суток, отделяют жидкую часть с получением водно-спиртового экстракта, затем остаток внутренностей голотурий с содержанием воды от 55 до 75% высушивают при 60-75°C в течение 2,5-4 ч, измельчают до порошкообразного состояния, таблетуют или капсулируют.

БАД «ТИНГОЛ-2» представляет собой водно-спиртовой экстракт из внутренностей голотурии, содержащий тритерпеновые гликозиды в количестве 700-3500 мкг/мл с содержанием спирта 10-50% и липидов 0,5-4%. БАД «Эрогол» представляет собой сухой порошок, содержащий 3-12% воды, тритерпеновые гликозиды в количестве 800-4500 мкг/мл, белка 35-45%, марганца 13,5-24,5 мг/кг, цинка 44,0-82,0 мг/кг, железа 481,2-893,5 мг/кг, меди 5,6-10,4 мг/кг, никеля 2,4-4,2 мг/кг, а также суммы элементов кальция, магния, калия 6500-12000 мг/кг. Получаемые биологически активные добавки повышают концентрацию и подвижность сперматозоидов у людей и животных и их физическую работоспособность.

Недостатком известного способа является то, что используемые для переработки внутренности голотурий содержат большое количество липидов, которые при экстракции переходят в водно-спиртовой экстракт и окисляются. Присутствие окисляемых липидов снижает качество и срок хранения известных биологически активных добавок к пище.

Заявителем - Тихоокеанским институтом биоорганической химии ДВО РАН разработан ряд способов получения биологически активных веществ из голотурий и их использование.

Тритерпеновые гликозиды, обладающие антигрибковым действием, получены из голотурии *Stichopus japonicus* [SU 900588, 21.09.1981; SU 1062921, 22.08.1983]. Гликозиды, обладающие цитостатическим действием, выделены из голотурии *Astichopus multifidus* [SU 902356, 01.10.1981]. Из отвара голотурии *Cucumaria Japonica* получены тритерпеновые гликозиды, обладающие антифунгальной активностью [SU 1166371, 01.03.1985]. В дальнейшем был разработан усовершенствованный способ получения суммы тритерпеновых гликозидов из выварочных вод - промышленных отходов переработки дальневосточной голотурии, согласно которому гликозиды либо осаждают совместно с полисахарид-белковым комплексом при подкислении выварочных вод до pH 2,8 или при добавлении 1%-ного хитозана в качестве флокулянта, либо выварочные воды подвергают высушиванию до порошка, экстрагируют сумму гликозидов из осадка или порошка этиловым спиртом или смесью среднеполярных растворителей и очищают их путем обращенно-фазовой хроматографии на колонках

с гидрофобным сорбентом, а затем с силикагелем [RU 2110522 C1, 10.05.1998].

Заявителем запатентованы средства, представляющие собой сумму тритерпеновых гликозидов из кукумарии японской - кукумариозиды, для лечения лучевой болезни [RU 2141833 C1, 27.11.1999], для профилактики и лечения алеутской болезни норка [RU 2036654 C1, 09.06.1995]. Предложено применение кукумариозидов в качестве средства, обладающего противовирусной активностью [RU 2184556 C1, 10.07.2002], а также в качестве средства, обладающего профилактическим и лечебным действием при заражении вирусом клещевого энцефалита [RU 2242238 C1, 20.12.2004].

Исследование гликозидов дальневосточной голотурии *Cucumaria Japonica*, проводимые в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН, показали, что в составе кукумарии присутствуют также токсические, обладающие гемолитическими свойствами тритерпеновые гликозиды, причем наиболее полярные трисульфатированные гликозиды, хорошо растворимые в воде и водных спиртах, обладают иммуносупрессивным действием [Aminin D.L. et. al. Immunomodulatory Properties of Cucumariosides from Edible Far-Eastern Holothurian *Cucumaria japonica*. J. Med. Food. 2001. V.4, №3. P.127-135].

Заявителем создано иммуномодулирующее средство «кумазид», которое в значительной мере лишено недостатков, присущих суммарным фракциям кукумариозидов, но сохраняет хорошую иммуностимулирующую активность, характерную для моносulfатированных соединений, и способ его получения [RU 2271820 C1, 20.03.2006]. В одном из вариантов выполнения способа кумазид получают из кожно-мышечных мешков (филе) кукумарии японской. Для этого потрошенную кукумарию измельчают и экстрагируют спиртом, экстракт отделяют декантацией, а остаток повторно экстрагируют спиртом. Объединенный экстракт центрифугируют, супернатант отделяют, упаривают до воды и экстрагируют бутанолом. Верхнюю фазу отделяют, профильтровывают и добавляют к ней раствор стерина. Реакционный раствор концентрируют и центрифугируют. Образующийся осадок, представляющий собой кукумариозид - холестеринавый комплекс, отделяют от надосадочной жидкости и трижды промывают комплекс равными объемами охлажденного растворителя с последующим центрифугированием. Затем осадок отмытого комплекса несколько раз промывают равными объемами серного эфира с последующим центрифугированием и высушиванием сначала на воздухе до отсутствия запаха эфира, а затем в вакуум-эксикаторе до постоянного веса.

Недостатком такой переработки промысловой голотурии является то, что используется ценное пищевое сырье - филе дальневосточной кукумарии, которое после экстракции гликозидов далее не используется и является промышленным отходом.

Поэтому была поставлена задача комплексной переработки филе кукумарии японской с получением нового биологически активного продукта.

Сущность заявляемого способа переработки кукумарии японской заключается в следующем.

Свежевыловленное или замороженное сырье - промысловые голотурии *Cucumaria Japonica* освобождают от внутренних органов. Кожно-мышечный мешок измельчают и экстрагируют 96% этиловым спиртом при нагревании в течение 5-6 часов. Экстракт отделяют декантацией, остаток повторно экстрагируют такой же порцией спирта в тех же условиях. Объединенный водно-спиртовый экстракт, содержащий сумму моносulfатированных гликозидов, используют для получения кумазида, как

описано в патенте РФ №2271820. Экстракция дальневосточной кукумарии 96% этиловым спиртом обеспечивает удаление значительной части липидов, содержащих полиеновые жирные кислоты. Это препятствует процессам перекисного окисления как биологического материала, так и целевого продукта.

Оставшийся после экстракции биологический материал высушивают на воздухе при комнатной температуре до отсутствия запаха спирта, а затем вакуумируют до предельно допустимых в пищевых продуктах концентраций спирта, но не выше 0,5% от веса полученного продукта (по данным ГЖХ). Получают твердый материал серого цвета, который подвергают механическому измельчению на дробилке шарового типа в течение 3-5 часов и просеивают через сито до размера частиц готового продукта не более 0,08 мм.

Получают биологически активный продукт, обладающий гепатопротекторными свойствами, в виде сухого порошка, который содержит, мас. %:

Белок	не менее 70,0
Углеводы	4,5-4,9
Кальций	1,5-1,9
Натрий	0,9-1,3
Магний	0,5-0,9
Калий	0,2-0,6
Спирт	не более 0,5
Влага	не более 10,0
Зола	не более 8,0

Продукт назван «кукумариовит». Он может быть использован для приготовления биологически активной добавки к пище, являющейся источником незаменимых аминокислот и пищевых волокон и применяемой для профилактики токсических поражений печени.

Изучение химического состава и физиологической активности заявляемого продукта проведено в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН.

Суммарное содержание белка определено с использованием спектрофотометра 2800UV/VIS "Unico" (Россия) по известному методу при 750 нм [Lowery O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. J. Biol. Chem. 1951. V.193. P.265-275].

Аминокислотный анализ кукумариовита выполнен обычным способом с использованием аминокислотного анализатора Biochrom-30 (Великобритания), колонка Ultraras, 8 мкм, Li-цитратные буферы, pH 2.8-3.55. Результаты анализа представлены в таблице 1.

Аминокислотный состав «кукумариовита» (нг/мг) по данным аминокислотного анализа			
Аминокислота	Содержание	Аминокислота	Содержание
Аспарагиновая кислота	585	Метионин*	44
Гидроксипролин	235	Изолейцин	185
Треонин	355	Лейцин	300
Серин	490	Тирозин	100
Глутаминовая кислота	1110	Фенилаланин	130
Пролин	510	Гидроксизин	41
Глицин	1540	Орнитин	2
Аланин	750	Лизин	142
Валин	290	Гистидин*	55
Цистеин*	24	Аргинин	350

Примечание: * - содержание занижено из-за деградации соответствующей аминокислоты в условиях кислотного гидролиза, используемого в анализе.

Массовая доля белка составляет не менее 70,0%. Аминокислотный анализ кукумариовита показал, что в нем содержится практически полный набор аминокислот. Как видно из таблицы 1, белок содержит много глицина, глутаминовой кислоты, аланина, аспарагиновой кислоты и серина, богат незаменимыми и условно незаменимыми аминокислотами (аргинин, валин, лейцин, изолейцин и другие), причем из последних наиболее высоко содержание аргинина. Известно, что аргинин применяется в препаратах, используемых для лечения заболеваний печени.

Кроме того, аминокислотный анализ показал образование в условиях гидролиза небольших количеств глюкозамина и галактозамина, полученных, очевидно, из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина - полисахаридов, присутствующих в кукумариовите.

Содержание углеводов установлено фенол-серным методом после гидролиза 2 мг навески препарата в 2 н. HCl при 100°C в течение 2 часов [Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Anal. Chem. 1956, V.28. P.350-356]. Осадок отделяли центрифугированием на центрифуге Min310 (Польша) при 5000 об/мин, 10 минут. Аликвоту супернатанта обрабатывали фенолом и серной кислотой, как описано в этом методе, оптическую плотность замеряли при 480 нм, используя спектрофотометр 2800UV/VIS "Unico" (Россия). Сахара идентифицировали с помощью ГЖХ в виде перацетатов альдононитрилов и перацетатов альдитолов на ГЖ хроматографе при сравнении с соответствующими производными, полученными из стандартных образцов моносахаридов. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2			
Результаты моносахаридного анализа кукумариовита			
Моносахарид	Относительное содержание	Моносахарид	Относительное содержание
Глюкоза	+++	N-ацетилглюкозамин	+
Галактоза	++	N-ацетилгалактозамин	+
Фукоза	+++	Ксилоза	следы

Высокое содержание фукозы подтверждает присутствие в препарате фукоидана - полисахаридного компонента, характерного для голотурий. Такие полисахариды относят к пищевым волокнам. Для фукоиданов морских беспозвоночных известны антикоагулянтные и антитромботические свойства [Mourao P.A.S. Curr. Pharmaceut. Design, 2004, V.10. P.967-981].

Определение элементного состава выполнено методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на спектрометре iCAP 6500Duo (Thermo Electron Corporation, США).

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в более полной переработке ценного биологического сырья, в расширении спектра биологически активных веществ, получаемых из кукумари японской, а именно в получении биологически активного продукта, обладающего гепатопротекторными свойствами. Технический результат также заключается в расширении ассортимента биологически активных добавок к пище.

На фиг.1 представлена сравнительная оценка изменения объема печени у крыс на фоне токсического гепатита через 5 дней после начала эксперимента (мм³). По горизонтали: 1 - интактные животные, 2 - токсический гепатит, 3 - кукумариовит, 4 - эссенциале. По вертикали: объем печени (мм³).

На фиг.2(а-г) даны томограммы печени в аксиальной проекции.

Фиг.2а - печень интактных животных, 2б - индукция токсического гепатита, 2в -

лечение кукумариовитом; 2г - лечение эссенциале.

На фиг.3 показаны сагиттальные срезы печени экспериментальных животных из контрольных и опытной групп, показывающие изменение формы и объема долей печени на фоне токсического гепатита.

5 Пример 1. Получение кукумариовита.

1 кг потрошенной дальневосточной кукумарии (*Cucumaria japonica*) (кожно-мышечный мешок) измельчают и экстрагируют 2 л 96% этилового спирта высшей очистки при нагревании на водяной бане (80-90°C) в течение 4 часов. Экстракт
10 отделяют декантацией, остаток ткани кукумарии повторно (дважды) экстрагируют 96% этиловым спиртом в тех же условиях. Экстракты отделяют декантацией и объединяют. Объединенный экстракт, содержащий сумму моносulfатированных гликозидов, далее используют для получения кумазида, как описано в патенте РФ №2271820. Затем остаток ткани кукумарии высушивают на
15 воздухе при комнатной температуре до отсутствия запаха спирта. Затем полученный материал переносят в вакуумную сушилку и сушат при остаточном давлении 150-50 мм Hg до постоянного веса. Получают 150-180 г твердого материала серого цвета, который подвергают механическому измельчению на дробилке шарового типа в
20 течение 4 часов и просеивают через сито до размера частиц готового продукта не более 0,08 мм.

Получают 130-150 г биологически активного продукта в виде светло-серого порошка без запаха, нерастворимого в воде.

25 Пример 2. Продукт, полученный по примеру 1, представляет собой сухой порошок и содержит, в мас. %:

Белок	74,3
Углеводы	4,7
Кальций	1,6
30 Натрий	1,0
Магний	0,6
Калий	0,3
Спирт	0,5
Влага	9,5
35 Зола	7,5

Пример 3. Определение токсичности кукумариовита.

40 Было проведено определение острой токсичности кукумариовита на мышах-самках линии CD-1 массой 20-22 г. Препарат растворяли в 1% суспензии крахмальной слизи, вводили внутривентриально. Животные контрольной группы в количестве 6 особей получали эквивалентное количество крахмальной слизи. Наблюдение за животными вели в течение 2-х недель.

Кукумариовит при внутривентриальном однократном введении мышам в дозе 5000 мг/кг не вызывал гибели экспериментальных животных, а также нарушения
45 координации движений, поведенческих реакций, угнетения дыхания, птоза, нарушения мышечного тонуса. Следовательно, при внутривентриальном введении кукумариовита ЛД₅₀ для мышей превышает 5000 мг/кг. Введение еще больших доз препарата было затруднено в связи с его высокой гигроскопичностью и вязкостью
50 суспензий.

Таким образом, в соответствии с ГОСТ 12.007-76 кукумариовит при внутривентриальном введении относится к IV классу опасности - «вещества практически нетоксичные».

Пример 4. Изучение гепатопротекторных свойств кукумариовита.

Для определения гепатопротекторных свойств кукумариовита использовали белых беспородных крыс-самцов линии «Вистар» массой 180-200 г. Животные находились в стандартных условиях содержания в виварии при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Опытные и контрольные группы состояли из 10 животных каждая. Изучалось влияние перорального введения кукумариовита на животных, у которых был индуцирован экспериментальный токсический гепатит [Саратиков А.С., Венгеровский А.И., Батурина Н.О., Чучалин В.С. Эксп. Клин. Фармакол., 1996. N 1. С.24-26].

Экспериментальный гепатит вызывали введением в желудок крыс тетрахлорметана в дозе 1,25 мл/кг (в виде 50% масляного раствора) ежедневно в течение 4-х дней. Кукумариовит применяли в виде суспензии в 1% растворе крахмальной слизи и вводили перорально с помощью зонда. В качестве препарата сравнения применяли медицинский препарат Эссенциале, который вводили экспериментальным животным с токсическим гепатитом перорально в виде раствора на дистиллированной воде. Контрольные животные получали эквивалентное количество 50% масляного раствора и 1% раствора крахмальной слизи. Режимы назначения препаратов представлены в таблице 3.

Таблица 3	
Группы животных	Режим назначения препаратов
Интактные животные (контроль)	1% раствор крахмальной слизи за 2 ч и спустя 2 ч после введения масляного раствора (оливковое масло) в суммарной дозе 1,25 мл/кг (первые 4 дня), затем 2 дня - только крахмальная слизь
CCl ₄ -гепатит	1,25 мл/кг тетрахлорметана в 50% масляном растворе, однократно в течение 4 дней
Кукумариовит	10 мг/кг (суммарная доза) за 2 ч и спустя 2 ч после введения тетрахлорметана (первые 4 дня), затем 2 дня - только препарат
Эссенциале	Суммарная доза 100 мг/кг за 2 ч и спустя 2 ч после введения тетрахлорметана (первые 4 дня), затем 2 дня - только препарат

На 5 сутки после последнего введения препаратов крыс из каждой группы перед сканированием усыпляли наркозом: 5,5 мг/кг рометара (Xylazine 2% LOSPHARM) и 37 мг/кг реланиума внутривенно, и проводили прижизненное томографическое исследование печени. Одновременно исследовали и другие органы животных - почки, селезенку, желудочно-кишечный тракт.

Применяли магнитно-резонансный томограф «PharmaScan US 70/16», Bruker (Германия) со сверхпроводящим магнитом мощностью 7 Тесла и частотой 300 МГц, операционный модуль «Avance», рабочая станция HP («Hewlett Packard»), программное обеспечение ParaVision 3.0.2. В эксперименте были получены послойные изображения печени и других органов крыс в режиме FISP в аксиальной, сагиттальной и фронтальной проекциях со следующими параметрами: TR=3,2 мс; TE=1,6 мс; FOV=6 см, матрица -192×192; толщина среза - 2 мм; расстояние между срезами - 2 мм; угол отклонения 60°; количество срезов от 16 до 18. Для идентификации изменения интенсивности сигнала от паренхимы печени были получены T1- и T2-взвешенные изображения (ВИ) в режимах: для T1-ВИ: TR=T00 мс; TE=3 мс; FOV=6×6 см, матрица - 192×192; толщина среза - 2 мм; угол отклонения FA 30°, количество срезов от 10 до 18; для T2-ВИ: TR=2579.8 мс; TE=44.5 мс; FOV=6×6 см, матрица - 256×256; толщина среза - 2 мм; количество срезов от 10 до 18. С помощью программного обеспечения томографа ROI (Region of Interest) были выполнены измерения объемов печени экспериментальных и интактных крыс, а также изучены изменения в интенсивности сигнала от паренхимы печени.

Результаты исследования обрабатывались по правилам вариационной статистики

с использованием пакета программы MS Office Excel 2003 и пакетом программ STATISTICA 5.5. Достоверность различий между группами вычисляли с использованием t-критерия Стьюдента, с определением средней арифметической (M) и ее стандартной ошибки (m). Достоверными считали значения с $p < 0,05$. Динамику изменения структуры ткани анализировали по изменению интенсивности сигнала от паренхимы печени. Данные получены с помощью программного обеспечения томографа ParaVision 3.0.2.

Томография выявила изменения в размере печени и особенностях печеночной ткани, но не выявила изменений в почках, селезенке, желудочно-кишечном тракте у животных из групп отрицательного (токсический гепатит) и положительного (гепатит, леченный эссенциале) контроля и обработанных кукумариовитом.

Как видно из фиг.1, токсический гепатит приводит к увеличению объема печени более чем на 20%, а введение животным как кукумариовита, так и эссенциале нормализует объем печени, причем это нормализующее действие в выбранных условиях эксперимента было практически одинаковым для обоих препаратов.

На фиг.2(а-г) представлены аксиальные виртуальные «срезы» печени животных из контрольных и опытной групп, показывающие изменения плотности печеночной ткани животных. При токсическом гепатите происходит морфологическое изменение паренхимы печени - структура ткани разрыхлена, доли печени увеличены, края долей печени неровные и просматриваются нечетко (фиг.2б). О воспалительных изменениях ткани печени свидетельствует гиперинтенсивность сигнала от паренхимы на T2-ВИ, которая составляет 225 отн.ед. по сравнению с 153 отн.ед. в интактном контроле (таблица 5). Гиперинтенсивность сигнала с подавлением жира говорит о жировой инфильтрации печени, что согласуется с биохимическими показателями [Саратиков А.С., Буркова В.Н., Венгеровский А.И., Кураколова Е.А. Новые гепатопротективные и противовоспалительные препараты пелоидов. Томск: ТГУ, 2004. - 178 с.]. При такой форме токсического гепатита появляются диффузные воспалительно-дистрофические поражения печени, нарушение обмена липопротеидов, жировой гепатоз.

Введение животным как эссенциале, так и кукумариовита, уплотняет паренхиму (фиг.2в, г).

Как следует из фиг.3(а-г), края долей и формы печени изменены, что хорошо просматривается на сагиттальной проекции. Жировой гепатоз (жировая инфильтрация печени) происходит тогда, когда скорость образования в печени триглицеридов превышает скорость их утилизации. Жировой гепатоз, в принципе, является обратимой патологией, если устраняется причина, обуславливающая ее развитие, и проводятся соответствующие лечебные мероприятия.

Выводы о положительном влиянии обоих препаратов на структуру печени животных с токсическим гепатитом подтверждают и количественные измерения интенсивности сигнала от паренхимы на T1- и T2- взвешенных изображениях, полученных с помощью МР томографии. Результаты представлены в таблицах 4 и 5.

Изменение интенсивности сигнала от паренхимы печени крыс на T1-ВИ на фоне токсического гепатита (в относительных единицах)				
Животные, № п/п	контроль	гепатит	«кукумариовит»	«эссенциале»
1	63,32	95,27	61,02	60,81
2	53,54	112,62	79,84	72,11
3	47,29	115,28	68,36	66,29
4	48,37	119,21	71,31	71,65
5	42,64	98,64	65,67	70,45

6	56,19	88,98	64,19	84,27
7	59,34	94,97	69,02	59,41
8	67,56	126,62	89,84	81,11
9	39,29	123,28	64,36	67,29
10	49,36	128,21	69,31	74,65
M±m	52,69±6,46	110,308±14,59*	70,292±8,57*	70,804±7,94*

*p<0,05

Таблица 5

Изменение интенсивности сигнала от паренхимы печени крыс на T2-ВИ на фоне токсического гепатита (в относительных единицах)

Животные, № п/п	Контроль	Гепатит	«кукумариовит»	«эссенциале»
1	137,12	203,23	111,01	138,05
2	145,41	252,54	116,21	145,28
3	142,51	227,25	121,30	154,74
4	155,24	214,24	118,15	144,73
5	164,37	215,26	105,73	141,69
6	154,28	236,65	112,19	135,91
7	142,12	203,23	111,01	138,05
8	162,41	252,54	116,21	145,28
9	159,51	227,25	121,30	154,74
10	168,24	214,24	118,15	144,73
M±m	153,121±10,74	224,643±18,06*	115,126±5,03*	144,32±6,46*

*p<0,05

Таким образом, все полученные при исследовании данные показывают достоверное гепатопротекторное действие препарата кукумариовит при пероральном введении, а также, что его применение предотвращает дальнейшее перерождение ткани до стадии фиброза и цирроза печени.

Пример 5. Приготовление биологически активной добавки к пище на основе кукумариовита.

Соответствующее количество кукумариовита с помощью капсульного аппарата вносят в капсулы, которые тарируют в банки или другую подходящую тару по 30-200 капсул в одной упаковке. БАД на основе кукумариовита может содержать разрешенные к применению в составе БАД компоненты или наполнители, например крахмал, сорбит, целлюлозу, янтарную кислоту и другие.

Формула изобретения

1. Способ переработки дальневосточной кукумарии *Cuscutaria japonica*, включающий измельчение кожно-мышечного мешка кукумарии, экстракцию 96%-ным этиловым спиртом при нагревании, отделение экстракта, повторное экстрагирование остатка, отделение супернатанта центрифугированием и объединение экстрактов, отличающийся тем, что остаток ткани кукумарии высушивают на воздухе при комнатной температуре до отсутствия запаха спирта, затем подвергают вакуумной сушке, далее измельчают в течение 3-5 ч, затем просеивают через сито до размера частиц готового продукта не более 0,08 мм.

2. Продукт, обладающий гепатопротекторными свойствами, характеризующийся тем, что он представляет собой сухой порошок, полученный по п.1, содержащий, мас. %:

Белок	не менее 70,0
Углеводы	4,5-4,9
Кальций	1,5-1,9

Натрий	0,9-1,3
Магний	0,5-0,9
Калий	0,2-0,6
Спирт	не более 0,5
Влага	не более 10,0
Зола	не более 8,0

5

3. Продукт, обладающий гепатопротекторными свойствами по п.2, который может быть использован для приготовления биологически активной добавки к пище.

10

15

20

25

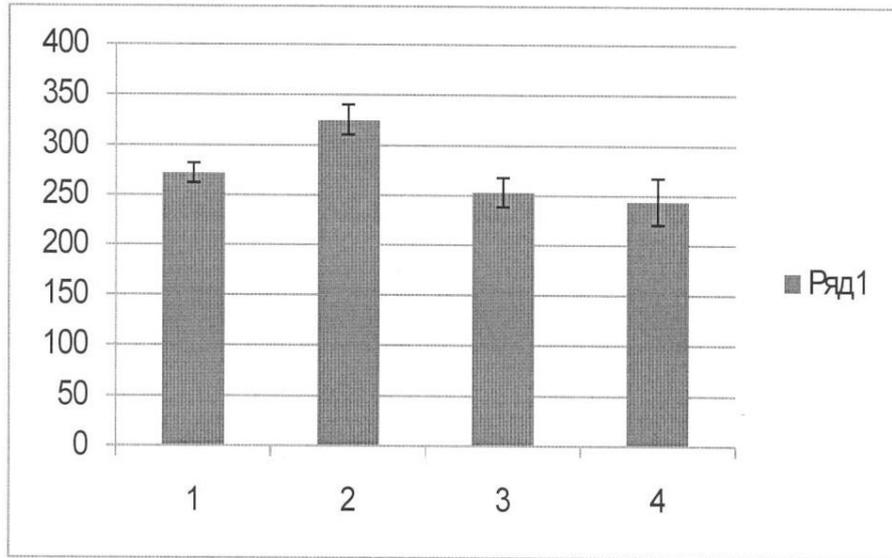
30

35

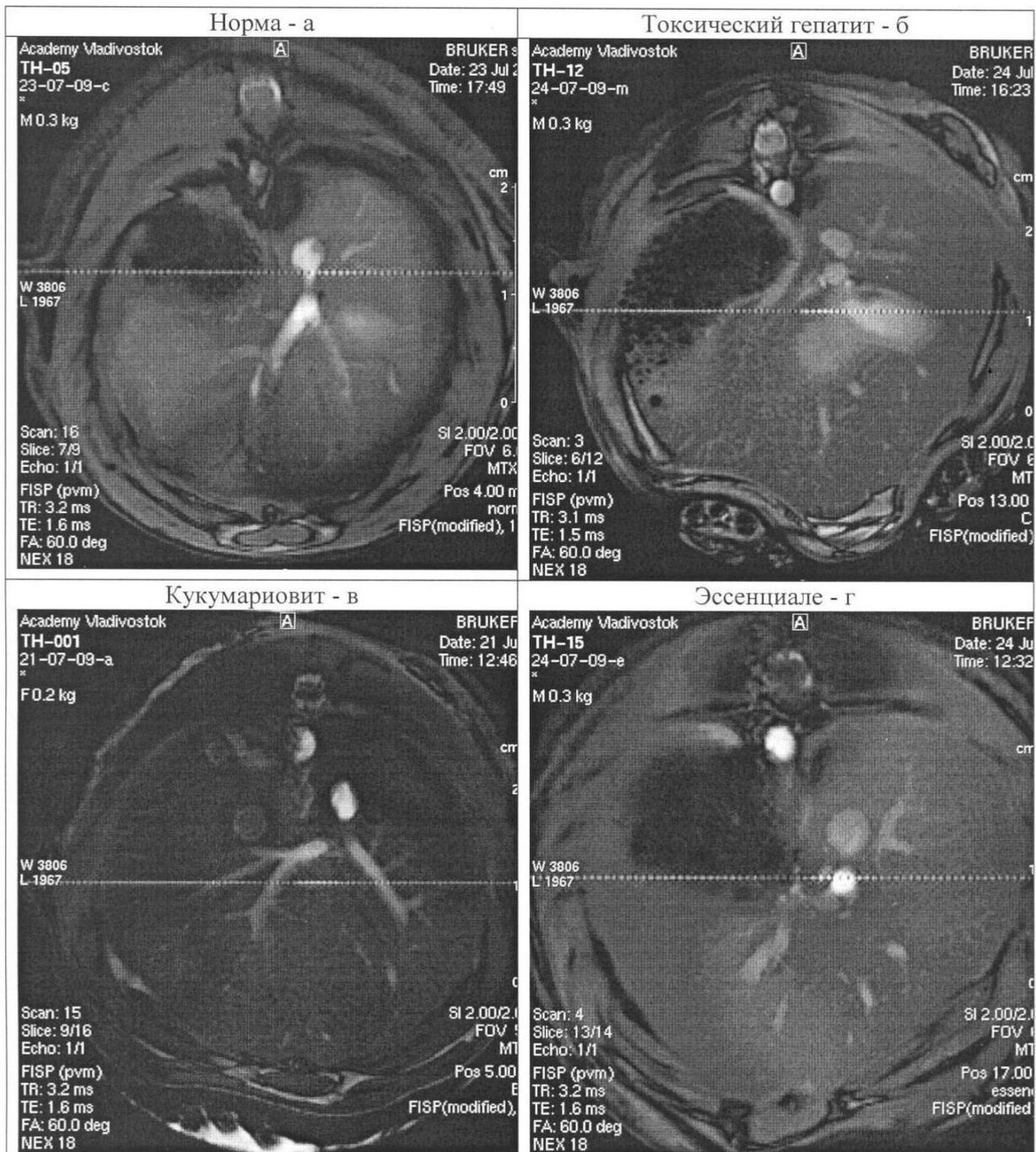
40

45

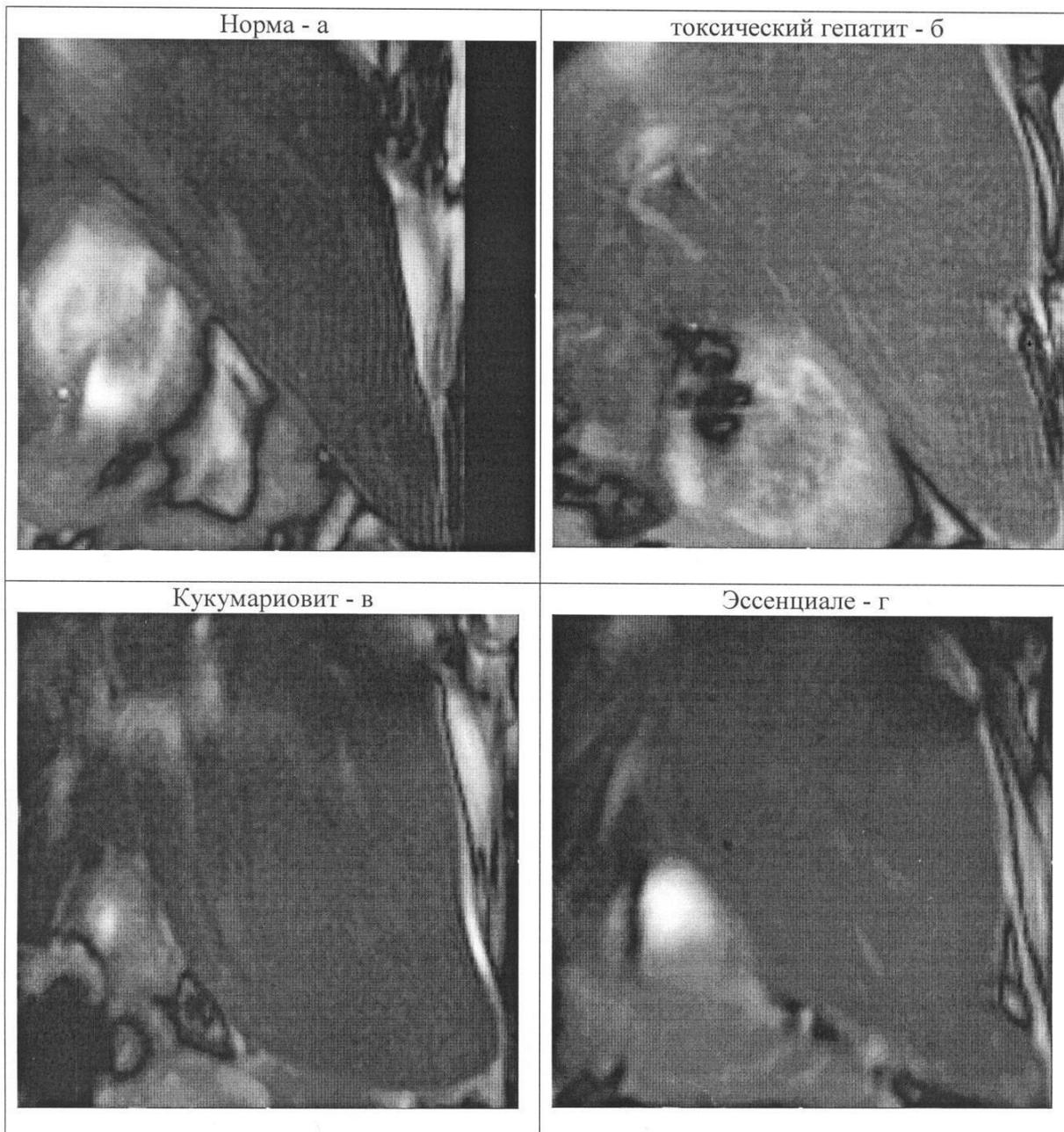
50



Фиг. 1



Фиг. 2(а,б,в,г)



Фиг. 3(а,б,в,г)