



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/00 (2006.01); G01N 33/48 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016145027, 16.11.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.11.2016Дата регистрации:
24.01.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.11.2016

(45) Опубликовано: 24.01.2018 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО
"Алтайский государственный университет",
отдел охраны интеллектуальной собственности

(72) Автор(ы):

Кейно Виктор Викторович (RU),
Горячева Ксения Валерьевна (RU),
Смирнов Иван Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: В.В. Кейно и др. **НОВЫЕ
ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ
РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СЫРЬЯ
ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ /
БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОБЩЕСТВО В
XXI ВЕКЕ. Сборник статей
Международной научно-практической
конференции, 2015, стр.32-36. ГОСТ 4227-76
Панты марала и изюбра консервированные.
Технические условия, "Госстандарт", 1977.
RU 2421720 C2, 20.06.2011.**

(54) Способ оценки гемостимулирующей активности пантов марала

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармакологии, фармакогнозии. Способ оценки гемостимулирующей активности пантов марала, включающий изучение его влияния на колониеобразующую активность стволовых клеток-предшественников костного мозга мыши *in vitro*, отличается тем, что готовят водное извлечение из пантов марала путем выдерживания

одной части пантов в трех частях воды деионизированной на водяной бане с обратным холодильником при 80°C в течение одного часа, при этом активность сырья считается достаточной, если извлечение, полученное из этого сырья, стимулирует рост колоний не менее чем в 1,5 раза по сравнению с группой контроля. 2 ил., 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 33/00 (2006.01); *G01N 33/48* (2006.01)

(21)(22) Application: **2016145027, 16.11.2016**

(24) Effective date for property rights:
16.11.2016

Registration date:
24.01.2018

Priority:

(22) Date of filing: **16.11.2016**

(45) Date of publication: **24.01.2018** Bull. № 3

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet", otdel
okhrany intellektualnoj sobstvennosti**

(72) Inventor(s):

**Kejno Viktor Viktorovich (RU),
Goryacheva Kseniya Valerevna (RU),
Smirnov Ivan Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**

(54) **METHOD FOR ESTIMATION OF HEMOSTIMULATING ACTIVITY OF MARAL VELVET ANTLERS**

(57) Abstract:

FIELD: pharmacology.

SUBSTANCE: method for estimation of the hemostimulating activity of maral velvet antlers, including the study of its effect on the colony-forming activity of mouse bone marrow progenitor stem cells in vitro, is characterized by preparation of an aqueous extract from maral antlers by keeping one part of the antlers in three parts of water deionized in a water bath

with a reflux condenser at 80°C for one hour. The raw material activity is considered sufficient if the extraction obtained from this raw material stimulates the growth of colonies not less than 1.5 times as compared to the control group.

EFFECT: accuracy increase.

2 dwg, 1 tbl

Изобретение относится к фармакологии, фармакогнозии.

В настоящее время оценка качества пантов марала (далее - ПМ) как сырья достаточно затруднена. Существуют ГОСТы для оценки качества консервированных ПМ [1, 2]. При консервации теряется значительная часть биологически активных веществ [3].

5 Однако не разработана соответствующая документация для оценки качества неконсервированных (сырых, замороженных) ПМ.

Известен способ стандартизации сырых ПМ [5], он заключается в визуальной оценке качества пантов по количеству отростков, толщине охвата ствола, признакам окостенения, цвету и натянутости кожи самого панта. Недостатки: оценка внешнего
10 вида не может дать полное и объективное представление о качестве ПМ, а также их биологической активности, поскольку не оцениваются действующие вещества и величина их биологического эффекта.

В «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» Миронов А.Н. М., 2012. Ч. I. Глава 49. С. 759 [4] (прототип) описаны культуральные
15 методы оценки гемостимулирующей активности фармакологических веществ, недостатком которых являются необходимость использования цитостатика, а также исследование содержания различных видов стволовых кроветворных клеток, что является достаточно сложной задачей, необходимой лишь в доклинических исследованиях лекарственных средств.

20 Задачей, решаемой настоящим изобретением, является расширение арсенала способов оценки биологической активности пантов марала, в частности их гемостимулирующей активности.

Известно, что ПМ обладают способностью стимулировать кроветворение [7]. Известно, что ПМ содержат группы веществ, способных стимулировать процессы
25 пролиферации и дифференцировки стволовых клеток [7].

При добавлении водного извлечения из ПМ к культуре клеток костного мозга мыши активные вещества, входящие в состав этого извлечения, стимулируют процесс колониеобразования клеток. Активность сырья (ПМ) считается достаточной, если
30 извлечение, полученное из этого сырья, стимулирует рост колоний не менее чем в 1,5 раза по сравнению с группой контроля.

Способ основан на способности биологически активных веществ, содержащихся в ПМ, стимулировать процесс колониеобразования кроветворных стволовых клеток костного мозга мыши *in vitro*. Предлагаемым способом оценивается активность суммы биологически активных веществ из пантов марала, продуктов и препаратов, получаемых
35 из этого сырья, в отношении изменения количества колоний гемопоэтических клеток. В качестве экстрагента используется вода деионизированная, поскольку для экспериментов на культуре клеток необходимы именно водные растворы веществ. Сырьем служат свежзамороженные панты марала.

Изобретение поясняется фигурами.

40 Фиг. 1 - схема забора образца панта марала, где 1 - средняя часть панта.

Фиг. 2 - схема засеивания планшета, где ряды с 1 по 11 - опытные, ряд 12 - контрольный.

Для забора пробы используется средняя часть панта марала (фиг. 1), от которой отпиливают пластинку массой 2 г. Измельчают ПМ до размера 0,5×0,5 см, выдерживают в течение 1 часа на водяной бане с обратным холодильником при 80°C в соотношении
45 сырье / экстрагент - 1/3. После извлечение процеживают через тройной слой марли, охлаждают до комнатной температуры, центрифугируют при 3000 оборотов в течение 10 мин, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм и используют для исследования.

Для оценки гемостимулирующей активности *in vitro* используются белые лабораторные мыши либо мыши линии СВА. Бедренную кость мыши извлекают в стерильных условиях, после чего костный мозг асептически эксплантируют и суспендируют в среде RPMI-1640. Количество клеток доводят до 2×10^5 на 1 мл питательной среды следующего состава: 80% RPMI-1640, 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/мл L-глутамин, 50 мг/л гентамицин. Засевают (фиг. 2) 96-луночные планшеты, по 200 мкл среды в каждую лунку, после чего добавляют по 10 мкл извлечения из ПМ. Каждый ряд планшета соответствует определенному извлечению. Также засевадается контрольный ряд, где вместо изучаемых извлечений в лунки добавляется по 10 мкл воды в качестве контроля растворителя. Таким образом в 1 планшете можно проанализировать 11 проб пантов марала.

Планшеты культивируются в инкубаторе в течение 7 суток при 5% CO₂, 100% влажности. После производят подсчет числа колоний и кластеров (колония - скопление клеток количеством 40 и более; кластер - скопление от 20-40 клеток), статистическую обработку проводят с использованием критерия Манна - Уитни. Разница сравниваемых средних считается достоверной, если показатель достоверности $p < 0,05$.

Согласно «Руководству по проведению доклинических исследований» [4] критерием достаточности гемостимулирующей активности является превышение количества колоний в исследуемых образцах не менее чем в 1,5 раза по сравнению с контролем. В связи с этим был взят этот критерий качества сырья и достаточности биологической активности: сырье считается качественным, если полученное извлечение будет стимулировать рост гемопоэтических колоний в исследуемом планшете не менее чем в 1,5 раза по сравнению с контролем. При этом превышение роста колоний на каждые 10% по сравнению с контролем принято за 1 колонию-стимулирующую единицу действия (КЕД).

Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Условия получения извлечения	Количество колоний и кластеров по отношению к контрольной группе, %
1 час при t 80 °С, соотношение сырьё / экстрагент - 1/3.	300

Таблица 1. Рост колоний и кластеров, по отношению к контрольной группе.

Количество колоний и кластеров в исследуемой группе составило 300% по сравнению с контролем. В результате извлечение имеет активность, равную 20 КЕД. Поскольку для приготовления извлечения использовали 2 г ПМ, содержание единиц действия в 1 г сырья будет следующим: извлечение, полученное в результате настаивания в течение 1 часа, имеет активность, равную 10 КЕД.

Источники информации

1. ГОСТ 4227-76 «Панты марала и изюбра консервированные. Технические условия». М.: Госстандарт, 1976.

2. ГОСТ 3573-76 «Панты пятнистого оленя консервированные. Технические условия». М.: Госстандарт, 1976.

3. Луницын В.Г. Продукция пантового оленеводства: (способы консервирования, переработка, использование): монография / В.Г. Луницын, Н.А. Фролов. Рос. акад. с/х. наук, Сиб. отд-ние Всерос. науч.-исслед. ин-т пантового оленеводства. - Барнаул:

Азбука, 2006. - 270 с.

4. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М., 2012. Ч. I. Глава 49. С. 759.

5 5. Павлова А.В. Научное и практическое обоснование рационального использования продукции мараловодства в условиях Тувы: дис. - Барнаул: Алт. гос. аграр. ун-т, 2000.

6. Патент РФ №2009125095/15, 30.06.2009. Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Першина О.В., Андреева Т.В., Хмелевская Е.С. Способ определения эффективности гемостимуляторов при цитостатической миелосупрессии // Патент России №2421720. 2011.

10 7. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: A review of its traditional uses, chemistry and pharmacology / Feifei Wu, Huaqiang Li, Liji Jin // Journal of Ethnopharmacology. - 2013. - №145. - P. 403-415.

(57) Формула изобретения

15 Способ оценки гемостимулирующей активности пантов марала, включающий изучение его влияния на колониюобразующую активность стволовых клеток-предшественников костного мозга мыши *in vitro*, отличающийся тем, что готовят водное извлечение из пантов марала путем выдерживания одной части пантов в трех частях воды деионизированной на водяной бане с обратным холодильником при 80°C в течение одного часа, при этом активность сырья считается достаточной, если извлечение,
20 полученное из этого сырья, стимулирует рост колоний не менее чем в 1,5 раза по сравнению с группой контроля.

25

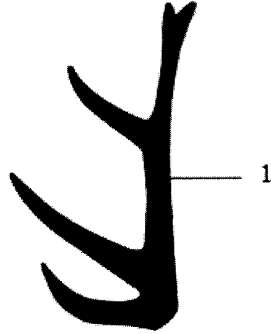
30

35

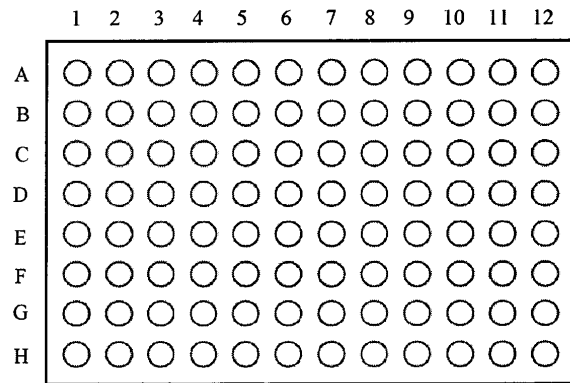
40

45

Способ оценки гемостимулирующей активности пантов марала



фиг. 1. Схема забора образца панта



фиг. 2. Схема засеивания планшета.

Ряд 1 – 11: опытный. Ряд 12: контрольный.