

Preparat roślinny z żurawiny wielkoowocowej (*Vaccinium macrocarpon L.*), sposób jego wytwarzania oraz zastosowanie

Przedmiotem wynalazku jest preparat roślinny z żurawiny wielkoowocowej (*Vaccinium macrocarpon L.*) posiadający zdolność do rozpuszczania szczawianu wapnia. Wynalazek dotyczy również sposobu jego otrzymywania oraz zastosowania w leczeniu schorzeń układu moczowego, w szczególności kamicy nerkowej.

Kamica nerkowa jest przewlekłą chorobą charakteryzującą się tworzeniem i obecnością w układzie moczowym nieorganicznych zlogów, powstałych ze składników obecnych w prawidłowym lub patologicznie zmienionym moczu. Większość kamieni moczowych stanowią kamienie nerkowe, w skład wchodzi nieorganiczne sole głównie wapniowe w postaci szczawianu wapnia (Moe O.W; *Kidney Stones: pathophysiology and medical management*, Lancet, 2006, Vol 367, pp 333-344).

W ostatnich kilkunastu latach ubiegłego stulecia nastąpił dynamiczny rozwój inwazyjnych metod leczenia kamicy dróg moczowych. Obecnie u większości chorych stosuje się metody inwazyjne takie jak kruszenie kamieni falami uderzeniowymi ESWL (Mousavi-Bahar S.H., Mehrabi S, Moslemi M.K., *Int Urol Nephrol*, 2011, 43, pp 983–987), oraz zabiegi endourologiczne PCNL (Róžański W., Klimek L, Lipiński M, Kliś R., *Selected examples of complications after minimally invasive treatment for urolithiasis*, *Central European Journal of Urology*, 2012, 65/2, pp 80-83). Te nowoczesne metody powodują jednak powikłania pooperacyjne oraz charakteryzują się wysokim procentem reemisji w ciągu najbliższych 5 lat od chwili zabiegu (Coe F.L, Evan A, Worcester E., *Kidney stone disease*, *J Clin Invest.*, 2005,115(10), pp 2598-608). W związku z tym pożądane jest znalezienie alternatywnej metody leczenia kamicy nerkowej. W ostatnich latach szczególnie interesujące stają się poszukiwania związków chemicznych pochodzenia naturalnego o właściwościach przeciwkamicowych.

Surowce roślinne odgrywają dużą rolę w profilaktyce chorób układu moczowego, w tym kamicy nerkowej. Na rynku obecne były dwa preparaty roślinne Rubinex i Rubiolizyna, posiadające w swym składzie ekstrakt z korzenia marzanny barwierskiej. Były one stosowane na szeroką skalę w leczeniu kamicy nerkowej, aż do momentu wykrycia mutagennego działania jednego ze składników. Zostały one wówczas całkowicie wycofane z rynku, a mutagennym związkiem okazała się lucydyna – 1,3-dihydroksy-2-hydroksymetylo-9,10-antrachinon (Westendorf J., Pfau W, Schulte A., *Carcinogenicity and DNA adduct formation observed in ACI rats after long-term treatment with madder*

root, *Rubia tinctorum* L., *Carcinogenesis*, 1998, 19 (12), pp 2163-2168). Prowadzone badania wskazują, że za hamowanie procesu tworzenia kamieni nerkowych odpowiedzialne są pochodne antrachinonowe, mające zdolność kompleksowania jonów wapniowych, dzięki obecności grup C=O i OH (Yasui Y., Takeda N., Identification of a mutagenic substance, in *Rubia tinctorum* L. (madder) root, as lucidin, *Mutation Research*, 1983, 121 (3-4), pp 185-190). Źródła literaturowe donoszą, iż także inne związki zawierające grupę ketonową oraz hydroksylową posiadają właściwości kompleksujące, szczególnie w odniesieniu do metali dwuwartościowych i mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w leczeniu kamicy nerkowej (Wai C.M., Wang S., Supercritical fluid extraction: metals as complexes, *Journal of Chromatography A*, 1997, 785, 369-383).

Przykładem takim jest grupa związków polifenolowych, sklasyfikowana jako flawony, gdzie kompleksowanie wapnia w glukozydzie -7-O-luteoliny, jak i samej luteolinie, zachodzi w pozycji 4 (CO) pierścienia C i 5 (-OH) pierścienia A.

Z drugiej strony wiadomo, że związki tego typu są biodostępne i łatwo przenikają do krwioobiegu i potem są wydalane z moczem. Zatem ich właściwości zmierzone *ex vivo* powinny przekładać się na ich aktywność *in vivo*.

Poszukiwanie takich związków jest bardzo pożądane ze względu na to, iż większość obecnych na rynku preparatów, stosowanych w terapii kamicy nerkowej, ma jedynie działanie objawowe (przeciwzapalne, moczopędne) i nie likwiduje przyczyn schorzenia. W związku z powyższym ważnym jest poszukiwanie i pozyskiwanie z roślin związków o charakterze glikozydowych pochodnych hydroksyketonów, w tym antrachinonów, flawonoidów i pochodnych cukrowych posiadających zdolność do kompleksowania jonów wapnia, a co za tym idzie do rozpuszczania złożeń wapniowych obecnych w układzie moczowym. W toku przeprowadzonych badań w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej nad oceną właściwości kompleksujących jony wapnia przez ekstrakty i frakcje roślinne stwierdzono, że preparaty aktywne zawierają znaczne ilości cukrów, alkoholi cukrowych i kwasów. Biorąc pod uwagę te wyniki, jak również fakt, że glikozydy antrachinonów (odpowiedzialnych za kompleksowanie jonów Ca²⁺ w wycofanych preparatach Rubinex i Rubiolizyna) są mniej toksyczne niż ich aglikonowe formy (Gebhardt M., Erste vorläufige Ergebnisse einer Studie über die litholytische Wirksamkeit von Urol auf Calcium-Oxalatsteine, *Fortschr. Urol. Nephrol. Suppl.*, 1979, 14, pp 34-40).

Żurawina wielkoowocowa (*Vaccinium macrocarpon* L.) jest popularną rośliną uprawną pochodzącą z terenów Ameryki Północnej. Jej owoce są używane od stuleci do

różnych celów, zarówno, jako środek leczniczy głównie przy schorzeniach układu moczowego, ale także wykorzystywana jest do celów spożywczych w postaci suszu, dżemów i soków.

Owoce żurawiny od setek lat były cenione, jako naturalne remedium na schorzenia układu moczowego. Działanie to wynika z różnorodności składników zawartych w owocach żurawiny i ich funkcjonalności. Należą do nich: zakwaszanie moczu, obecność kwasu hipuronowego o działaniu antybakteryjnym, oraz obecność składników utrudniających przyleganie bakterii *Escherichia coli* (*E.Coli*) do ścian układu moczowego.

Dzięki braku możliwości osiadania bakterii *E. Coli* na ścianach układu moczowego są one wyplukiwane wraz z moczem, a ze względu na to, iż między 80 a 90 % infekcji układu moczowego powodowanych jest przez te bakterie, ochrona, jaką daje żurawina jest bardzo istotna. Ostatnie badania wykazały także, że substancje zawarte w owocach żurawiny posiadają także pozytywne działanie na układ pokarmowy oraz jamę ustną. Substancje zawarte w żurawinie nie tylko ograniczają przyleganie do tkanek gospodarza bakterii *E. Coli*, ale także innych, a dodatkowo posiadają działanie probiotyczne, niszcząc szkodliwe bakterie, tworząc jednocześnie przyjazne środowisko to rozwoju mikroflory jelitowej. Wykazano także, iż owoce żurawiny zapobiegają powstawaniu płytki nazębnej i wspomagają skuteczność leczenia zakażeniem *Helicobacter pylori*. Owoce żurawiny zawierają w swoim składzie kwas chinowy, który nadając kwaśny odczyn moczu, hamuje tworzenie się nieorganicznych nierozpuszczalnych soli wapnia i fosforu, a tym samym powstawania kamieni nerkowych. Przeprowadzone badania pokazują także, iż preparaty żurawinowe przyczyniają się do podniesienia poziomu cholesterolu HDL, który posiada działanie ochronne na układ sercowo-naczyniowy. Zawarte w żurawinie antyoksydanty zapobiegają utlenianiu cholesterolu LDL, który to odkładając się na ścianach tętnic i żył może prowadzić do zawału. Ponadto odnotowano, iż związki zawarte w żurawinie wielkoowocowej zwalczają wirusa opryszczki (typ HSV-2), przyczyniającego się do powstania opryszczki narządów płciowych. Mechanizm działania w przypadku jest podobny do tego w przypadku zapobiegania zakażeniom układu moczowego poprzez utrudnienie wirusowi penetracji i przylegania do tkanek. Ponadto sok z żurawiny posiada działanie synergistyczne względem warfaryny – leku o działaniu przeciwzkrzepowym[8-12].

Z polskiego opisu patentowego nr PL216222 B1 znany jest preparat roślinny, mający zdolność rozpuszczania i hamowania powstawania szczawianu wapnia, głównego składnika kamieni nerkowych, który zawiera jako substancję aktywną biologicznie frakcję

alkoholową ekstraktu z ziela dziurawca zwyczajnego lub szyszek chmielu, wyekstrahowaną kolejno roztworem NaOH w temperaturze pokojowej, rozpuszczalnikiem niemieszającym się z wodą i alkoholem alifatycznym o długości łańcucha C1-C3. Sposób otrzymywania preparatu roślinnego przeciwko kamicy nerkowej polega na tym, że ziele dziurawca zwyczajnego lub szyszki chmielu poddaje się ekstrakcji 0,1 - 1M roztworem NaOH, użytych w stosunku wagowym 1:4-1:8, w czasie 6-24h, w temperaturze pokojowej, a następnie ekstrahuje się rozpuszczalnikiem nie mieszającym się z wodą, reguluje się pH do wartości 3-6 i powtórnie ekstrahuje się rozpuszczalnikiem niemieszającym się z wodą. Otrzymaną warstwę wodną po odparowaniu wytrawia się alkoholem alifatycznym o długości łańcucha C1-C3.

Europejski opis patentowy nr EP2858654 (B1) dotyczy skoncentrowanego ekstraktu z żurawiny (*Vaccinium macrocarpon*), którego złożona kompozycja umożliwia zwiększenie jego działania przeciwbakteryjnego i jest stosowana do profilaktyki lub leczenia infekcji dróg moczowych. W/w wynalazek dotyczy także sposobu wytwarzania takiego ekstraktu, jako składnik żywności lub kompozycji farmaceutycznych oraz jego zastosowania w leczeniu lub profilaktyce infekcji dróg moczowych.

Ze zgłoszenia patentowego nr LT2011039 (A) znany jest suplement diety zwiększający ochronę nabłonka dolnych dróg moczowych przed wielokrotnym występowaniem zakażeń, zawierający nie więcej niż 99,999975% wag. liofilizowanych owoców żurawiny amerykańskiej (*Vaccinium macrocarpon*) i/lub jego soku i/lub ich liofilizowanego soku i/lub ich ekstraktów i od 0,0000025 do 0,0694% wag witaminy D w postaci ergokalcyferolu D2 lub cholekalcyferolu D3 lub ich mieszaniny D2 / D3.

Znane ze stanu techniki preparaty czy ekstrakty z żurawiny amerykańskiej (*Vaccinium macrocarpon*) miały zazwyczaj działanie przeciwbakteryjne i przeciwzapalne, żaden z nich jednakże nie wykazał ich właściwości w rozpuszczaniu kamieni nerkowych.

Żurawina wielkoowocowa (*Vaccinium macrocarpon*) to pochodząca z Ameryki Północnej zimozielona krzewinka będąca jedną z najpowszechniej używanych i najdokładniej przebadanych roślin leczniczych. Porasta ona głównie kwaśne i wilgotne gleby, przeważnie występuje na torfowiskach oraz w borach bagiennych. Żurawina kwitnie w czerwcu i lipcu. Jej kwiaty mają różowo - białe zabarwienie. Owocami żurawiny wielkoowocowej są ciemnoczerwone jagody, które osiągają pełnię dojrzałości około sto dni po okresie kwitnienia. Roślina ta jest uprawiana głównie w Ameryce Północnej, w Holandii i Wielkiej Brytanii¹⁵⁶⁻¹⁵⁷. Ze względu na swój bogaty skład chemiczny preparaty z żurawiny wielkoowocowej posiadają właściwości: przeciwgrzybiczne,

przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe, przeciwzakrzepowe oraz antyoksydacyjne¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Żurawina w swym składzie zawiera głównie kwasy organiczne, związki fenolowe, glikozydy i terpeny. W swym składzie wyróżnia się dużą zawartością kwasów cytrynowego i jabłkowego (należących do hydroksykwasów) oraz kwasu benzoowego (należącego do kwasów aromatycznych), oraz kwasu szkimowego, kwasu chinowego kwasu glukuronowego kwasu-hydroksymasłowego. Z owoców żurawiny wielkoowocowej wyizolowano również szereg polifenoli zarówno w postaci aglikonów, jak i form cukrowych. Główne grupy związków polifenolowych to fenolokwasy, glikozydy flawonolowe, glikozydy antocyjanowe i proantocyjanidyny. Stwierdzono obecność kwasu salicylowego, kwasu egalowego, kwasu 2,3-dihydroksybenzoowego, kwasu 2,4-dihydroksybenzoowego, kwasu felurowego, kwasu synapinowego. Wybrane flawonoidy, procyjanidy i ich glikozydy obecne w żurawinie to cyjanidina, delfinidina, peonidina, pelargonidyna, malwidyna.

Tak duża liczba kwasów obecnych w żurawinie nadaje jej kwaśny smak, powodując przy dużym spożyciu zakwaszenie moczu, co wykorzystywane jest w terapii schorzeń układu moczowego. W żadnym opracowaniu oprócz niniejszego jednakże nie wykazano, że najbardziej efektywnym składnikiem w rozpuszczaniu kamieni nerkowych są glikozydy hydroksykwasów alifatycznych.

Istota preparatu roślinnego z żurawiny wielkoowocowej według wynalazku polega na tym, że zawiera frakcję otrzymaną z żurawiny wielkoowocowej zawierającą w szczególności glikozydy hydroksykwasów organicznych.

Korzystnie glikozydy hydroksykwasów organicznych zawierają 50-80% wag. hydroksykwasów wybranych z grupy: kwas chinowy, kwas cytrynowy, kwas askorbinowy, kwas jabłkowy, kwas szkimowy.

Korzystnie glikozydy hydroksykwasów organicznych zawierają 25-30% wag. sacharydów, w szczególności: glukozę, fruktozę, galaktozę, arabinozę, ksylozę.

Sposób otrzymywania preparatu roślinnego z żurawiny wielkoowocowej zawierającego frakcję zawierającą w szczególności glikozydy hydroksykwasów organicznych polega na tym, że materiał roślinny z żurawiny wielkoowocowej poddaje się dwustopniowej ekstrakcji szeregiem rozpuszczalników, kolejno rozpuszczalnikiem organicznym, alkoholem i mieszaniną alkoholu i wody.

Korzystnie jako rozpuszczalnik organiczny stosuje się chloroform, chlorek metylenu lub heksan.

Korzystnie jako alkohol stosuje się metanol, etanol lub propanol.

Korzystnie ekstrakcję mieszaniną alkoholu i wody wykonuje się trzykrotnie mieszaninami o odpowiednich proporcjach: 95:5, 50:50, 5:95, po czym z połączonych ekstraktów odparowuje się alkohol i wodę.

Istotą wynalazku jest również zastosowanie preparatu roślinnego z żurawiny wielkoowocowej zawierającego frakcję zawierającą w szczególności glikozydy hydroksykwasów organicznych do leczenia i zapobiegania kamicy nerkowej, w szczególności poprzez rozpuszczanie oraz hamowanie powstawania szczawianu wapnia.

Glikozydy hydroksykwasów mają większą zdolność wchłaniania się do układu krwionośnego a tym samym transportu do układu moczowego. Ponadto niniejsze opracowanie wykazuje, że mechanizm oddziaływania to tworzenie kompleksów a nie jak do tej pory uważano zakwaszanie moczu. Takie oddziaływania wzmacnia skuteczność rozpuszczania złożeń w układzie moczowym. W miarę wzrastającego stężenia jonów wapniowych roztworu zawierającego ekstrakt z żurawiny (preparat otrzymany według sposobu 1) zmiany na widmie w zakresie $1000-1300\text{ cm}^{-1}$ (zakres częstości dla ugrupowania **C-O-H** – cukry), $1500-1800\text{ cm}^{-1}$, ¹ (zakres częstości dla ugrupowania **C=O** - kwasy), $3000-3600\text{ cm}^{-1}$ (zakres częstości dla ugrupowania **C-O-H** – cukry, kwasy) świadczą o wzajemnym oddziaływaniu jonów wapniowych i glikozydów na zasadzie tworzenia rozpuszczalnych kompleksów. Rysunek 1

Niezależne pomiary dla samych cukrów i samych kwasów, a także stosowanego dawniej w terapii kamicy nerkowej Rubinexu, wykazywały mniejszą zdolność do kompleksowania. Taka zdolność glikozydów do kompleksowania została potwierdzona obliczeniami teoretycznymi.

Pozyskiwanie tych frakcji przebiega w dwustopniowej ekstrakcji. Pierwszy etap to usuwanie hydrofilowych składników poprzez ekstrakcję chloroformem lub węglowodorami alifatycznymi a następnie wielostopniową ekstrakcję mieszaninami alkoholu etylowego o różnym stosunku wody do alkoholu (jak przedstawiono w przykładach). Uzyskane frakcje zawierają głównie glikozydy hydroksykwasów organicznych. Nie są toksyczne, nie są mutagenne i mają udokumentowane właściwości usuwania złożeń nieorganicznych posiadają zarówno zdolność do rozpuszczania szczawianu wapnia, jak i hamowania jego powstawania.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach jego realizacji oraz na rysunku, na którym:

fig 1 ilustruje wykres zmiany absorbancji w podczerwieni preparat z żurawiny linia dolna i w obecności jonów wapnia (CaCl_2) linia górna,

fig. 2 ilustruje widm ^1H NMR preparatu otrzymanych sposobem wg przykladu 1.1,
fig. 3 ilustruje widm ^1H NMR preparatu otrzymanych sposobem wg przykladu 1.2,
fig. 4 ilustruje widm ^1H NMR preparatu otrzymanych sposobem wg przykladu 1.3,
fig. 5 ilustruje widm ^1H NMR preparatu otrzymanych sposobem wg przykladu 1.4,
fig. 6 przedstawia widmo ^1H NMR preparatu w zakresie sygnalów od glikozydów polifenoli,

fig. 7 przedstawia wykres żywotności komórek HEK-293 inkubowanych w obecności ŻUEW (Ż3),

fig. 8 przedstawia wykres zmiany stężeń związków o charakterze hydroketonów metodą FC w moczu u szczurów po podaniu preparatu z żurawiny wielkoowocowej,

fig. 9 przedstawia Wykres zmiany stężeń związków o charakterze hydroketonów metodą LC w moczu u szczurów po podaniu preparatu z żurawiny wielkoowocowej,

fig. 10 przedstawia mikrofotografię szczawianu wapnia zadanego preparatem przed (lewa) i po inkubacji (prawa),

fig.11 ilustruje fotografię USG przedstawiająca wyindukowane złogi nerkowe w nerce u szczura,

fig. 12 ilustruje zdjęcia USG szczura po indukcji kamicy,

fig. 13 ilustruje zdjęcia USG szczura po indukcji kamicy oraz po podaniu wody z dodatkiem preparatu wg wynalazku.

Przykład 1. Sposób otrzymywania preparatów zawierających glikozydy hydroksykwasów

- 1.1. Do kolby okrągłodennej wprowadzono 250g rozdrobnionego materiału roślinnego i dodano 1l chloroformu. Całość ogrzewano pod refluksiem przez 2 godziny. Rozpuszczalnik przesączono, a materiał roślinny ponownie zalano mieszaniną metanol woda (95:5) i ekstrahowano przez 2 godzinny po czym ponownie zalano mieszaniną etanol woda (5:5) i ekstrahowano przez 2 godzinny po czym ponownie zalano mieszaniną etanol woda (5:95) i ekstrahowano przez 2 godzinny. Rozpuszczalniki usunięto na próżniowej wyparce rotacyjnej, otrzymują preparat o pożądanych właściwościach poszukiwanych właściwości.
- 1.2. Do kolby okrągłodennej wprowadzono 250g rozdrobnionego materiału roślinnego i dodano 1l heksanu. Całość ogrzewano pod refluksiem przez 2 godziny. Rozpuszczalnik przesączono, a materiał roślinny ponownie zalano mieszaniną propanol woda (95:5) i ekstrahowano przez 2 godzinny poczym ponownie zalano mieszaniną etanol woda (5:5) i ekstrahowano przez 2 godzinny poczym ponownie

zalano mieszaniną etanol woda (5:95) i ekstrahowano przez 2 godzinny. Rozpuszczalniki usunięto na próżniowej wyparce rotacyjnej, otrzymują preparat o pożądanym właściwościach poszukiwanych właściwości.

1.3. Do kolby okrągłodennej wprowadzono 250g rozdrobnionego materiału roślinnego i dodano 1l chlorku metylenu. Całość ogrzewano pod refluksiem przez 2 godziny. Rozpuszczalnik przesączono, a materiał roślinny ponownie zalano mieszaniną etanol woda (95:5) i ekstrahowano przez 2 godzinny po czym ponownie zalano mieszaniną etanol woda (5:5) i ekstrahowano przez 2 godzinny po czym ponownie zalano mieszaniną etanol woda (5:95) i ekstrahowano przez 2 godzinny. Rozpuszczalniki usunięto na próżniowej wyparce rotacyjnej, otrzymują preparat o pożądanym właściwościach poszukiwanych właściwości.

1.4. Do kolby okrągłodennej wprowadzono 250g rozdrobnionego materiału roślinnego i dodano 1l chlorku metylenu. Całość ogrzewano pod refluksiem przez 2 godziny. Rozpuszczalnik przesączono, a materiał roślinny trzykrotnie ekstrahowano przez 2 godzinny etanolem po czym rozpuszczalnik usunięto na próżniowej wyparce rotacyjnej, otrzymują preparat o pożądanym właściwościach poszukiwanych właściwości.

Przykład 2. Badanie inhibicji powstawania nierozpuszczalnych soli szczawianu wapnia

W fiolece o objętości 10ml umieszczono 300 μ l 3% roztworu badanego preparatu otrzymanego według sposobu 1.1, w nasyconym roztworze CaCl_2 zawierającym 0.01M/dm³ NaOH oraz 300 μ l nasyconego roztworu CaCl_2 . Całość mieszano na mieszadle magnetycznym. Do roztworu wprowadzono elektrodę konduktometryczną i całość miareczkowano 0.05 M roztworem $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ porcjami po 100 μ l przy użyciu Elektronicznego Miernika Uniwersalnego EMU aż do momentu, gdy całkowita objętość tritranta wynosiła 1200 μ l. Podobny pomiar wykonano dla próby ślepej użyciem 300 μ l 0.01M NaOH gdzie zamiast ekstraktu, użyto 300 μ l nasyconego roztworu CaCl_2 zawierającym 0.01M/dm³ NaOH. Zdolność do hamowania tworzenia nierozpuszczalnych soli wapnia oceniano na podstawie zmiany punktu przegięcia krzywej, ΔPK , w przypadku użycia badanego ekstraktu w stosunku do próby ślepej. Im większa wartość dodatnia tym silniejsze właściwości badanego ekstraktu w hamowaniu tworzenia nierozpuszczalnych soli wapnia. Wyniki przedstawiono w Tabeli nr 1.

Tabela nr 1. Wyniki miareczkowania konduktometrycznego

| | Końcowy punkt miareczkowania próbki [μl] | Końcowy punkt miareczkowania krzywej standardowej [μl] | Δ PK [μl] |
|-----------------------|--|--|--------------|
| Preparat przykład 1.1 | 280-320 | 277 | 3-43 |
| Preparat przykład 1.2 | 275-290 | | -2-23 |
| Preparat przykład 1.3 | 285-310 | | 8-33 |
| Preparat przykład 1.4 | 300-3310 | | 23-33 |

Przykład 3. Badanie właściwości rozpuszczania soli wapnia

Próbka testowa: W szklanej fiołce umieszczono 25mg szczawianu wapnia i 10ml 1,5% roztwór ekstraktu w 0.01 M NaOH. Próbkę poddano inkubacji przez okres 5 dni na wytrząsarce o szybkości obrotów 110 rpm. Po 5 dniach odwirowano supernatant i zmierzono stężenie jonów wapnia w warunkach nasycenia w nieobecności ekstraktu Ca^l. Próba ślepa: W szklanej fiołce umieszczono 10ml 1,5% roztwór ekstraktu w 0.01M NaOH. Próbkę poddano inkubacji przez okres 5 dni na wytrząsarce o szybkości obrotów 110 rpm. Po 5 dniach odwirowano supernatant i zmierzono stężenie wapnia w roztworze po rozpuszczeniu samego czystego ekstraktu Ca^e.

Odnośnik: W szklanej fiołce umieszczono 25mg szczawianu wapnia i 10ml 0.01M NaOH

Próbkę poddano inkubacji przez okres 5 dni na wytrząsarce o szybkości obrotów 110 rpm. Po 5 dniach odwirowano supernatant i zmierzono stężenie jonów wapnia w warunkach nasycenia pod nieobecność ekstraktu Ca^o.

Właściwość rozpuszczania nierozpuszczalnych soli wapnia określono jako różnicę ΔCa. wyrażona jako stężenie Ca mg/ml dla Absorpcyjnej Spektroskopii Atomowej. Im większa wartość emisji tym lepsze właściwości rozpuszczania nierozpuszczalnych soli wapnia

$$\Delta Ca = Ca^l - Ca^e - Ca^o$$

Tabela 2. Wyniki Absorpcyjnej Spektroskopii Atomowej

| | Ca ^l [mg/ml] | Ca ^e [mg/ml] | ΔCa [mg/ml] |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| Preparat przykład 1.1 | 86.76-91.44 | 25.67-54.62 | 34.23-58.67 |
| Preparat przykład 1.2 | 45.2-67.21 | 23.4-51.22 | 21.3-43.12 |
| Preparat przykład 1.3 | 18.34-22.43 | 13.21-14.38 | 10.11-12.03 |
| Preparat przykład 1.4 | 56.3-75.34 | 23.45-43.11 | 23.13-50.18 |

Ca^o = 0.11 mg/ml

Przykład 4. Analiza składu

Skład preparatu określono w oparciu o analizę GC/MS i stwierdzono obecność glikozydów kwasów organicznych a po hydrolizie odpowiednio cukry: glukoza, fruktoza, galaktoza, arabinoza, ksyloza, które razem stanowią 25-30 % masy preparatu oraz hydroksykwasy kwas chinowy, kwas cytrynowy, kwas askorbinowy, kwas jabłkowy, kwas szikimowy które stanowią 60-80% masy.

Taki skład preparatu potwierdza widmo ^1H NMR przedstawione na fig. 6.

Wszystkie otrzymane preparaty, charakteryzują się podobnymi widmami co świadczy o podobnym składzie: fig. 2-fig. 5

Przykład 5. Analiza cytotoksyczności preparatu

Badania cytotoksyczności otrzymanego preparatu według sposobu 1.1, zostały wykonane przez firmę Selvita na linii komórkowej HEK -293 (linia komórkowa wyprowadzona z embrionalnych ludzkich komórek nerek). Komórki HEK-293 wysiano po 4000 komórek na dołek i hodowano przez 24 godziny w 100 μl medium EMEM (Eagle's minimal essential medium). Po całonocnej hodowli dodano 100 μl medium EMEM, które zawierało 9 stężeń każdej z badanych substancji. Najwyższe stężenie w hodowli wyniosło 250 $\mu\text{g/ml}$. Seryjne dwukrotne rozcieńczenia przygotowano w DMSO.

Komórki HEK-293 hodowano w obecności badanych substancji przez 48 godzin. Po czasie inkubacji oceniono mikroskopowo żywotność komórek a następnie przeprowadzono test MTS, który oparty jest na zdolności enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania pomarańczowej, soli tetrazolowej MTS do formazanu. Zdolność do produkcji formazanu posiadają tylko żywe komórki, co pozwala na szybkie i dokładne określenie procentu funkcjonalnych komórek oraz wpływu badanego czynnika na żywotność dowolnej linii komórkowej. Jako kontrolę odniesienia zastosowano komórki hodowane w obecności 0,5% DMSO/H₂O. Wyniki przedstawiono jako % komórek żywych w odniesieniu do kontroli (100%). Według normy PN-EN ISO 10933-5, za efekt cytotoksyczny uznaje się spadek liczebności komórek żywych poniżej 70%.

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano cytotoksycznego wpływu ekstraktu (Ż3) w badanym zakresie stężeń. Żywotność komórek dla każdego stężenia badanego preparatu wynosiła powyżej 92%. Ocena mikroskopowa hodowli komórek nie wykazała zmian w morfologii i ilości komórek w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Przykład 6. Przenikalność składników aktywnych do krwi i moczu

Ważnym aspektem wyboru preparatu była także przystępność dla zwierząt (chęć jego spożywania w postaci dodatku do wody). Badania przenikalności składników aktywnych z preparatu do krwioobiegu, a co za tym idzie również do moczu przeprowadzono na grupie 14 szczurów rasy Wistar o masie około 300g. Szczurom podawano preparat z żurawiny wielkoowocowej wraz z wodą do picia jako 3% wodny roztwór preparatu przez okres 7 dni. Przyjmując dzienne zapotrzebowanie szczura na płyny w postaci 30ml, można przyjąć, że dzienna dawka preparatu, jaką przyjmowało zwierzę to 1.2 mg. Próbkę moczu zbierano kolejno w 0 (próbka kontrolna), 1, 3, 5 i 7 dniu po podaniu preparatu. Każdą z próbek analizowano pod kątem składu preparatu niezależnie metodami Folina-Ciocalteu (FC), Lamaison-Carnat (LC) oraz ASA (absorpcyjna spektrometria atomowa) na zawartość jonów Ca^{2+} .

Wyniki zmian stężeń poszczególnych składników przedstawiono na wykresach na fig. 8 i fig. 9.

Przykład 7. Analiza mikroskopowa kryształów szczawianu wapnia po zadaniu ekstraktami

Kryształy szczawianu wapnia przesianego przez sito o średnicy oczek 710 μm (25 mg) zadano 10 ml 3% preparatu otrzymanego według sposobu 1.1 i inkubowano przez 5 dni. Roztwór przesączono na sączku bibułowym a kryształy szczawianu wapnia poddano analizie mikroskopowej mikroskopem OLYMPUS CX41 przy powiększeniu 4 krotnym. Jako odnośnik użyto kryształów szczawianu wapnia (25 mg, średnica $<710 \mu\text{m}$) zadanego 10 ml wody. Średnica szczawianu wapnia po 5 dniach inkubacji wodą wyniosła 606.8 μm i rozmiar ten został uznany jako standard. Poniższe analizy poszczególnych metod zawierają fotografie aktywnych preparatów przedstawione na fig. 10.

Tabela 3. Zmiany średnicy szczawianu wapnia zadanego uzyskanymi preparatami (wzorzec= 606.8 μm).

| Próbka | Średnica kryształów szczawianu wapnia po 5 dniach inkubacji [μm] | Zmiana rozmiaru względem wzorca [μm] | Zmiana rozmiaru [%] |
|-----------------------|---|---|---------------------|
| Preparat przykład 1.1 | 257.2 | -349.6 | -57.6 |

Przykład 8. Indukcja kamicy nerkowej

Kamicę nerkową w postaci szczawianu wapnia u szczurów rasy Wistar indukowano przez okres 16 dni 0.5% wodnym roztworem glikolu etylenowego

podawanym wraz z wodą do picia. Dawkę dobrano na podstawie badań literaturowych w celu zminimalizowania efektu cytotoksyczności. Zmierzono zawartość wolnego wapnia w moczu po 0, 5, 10 i 16 dniach indukcji metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej, a następnie zwierzętom wykonano badanie ultrasonograficzne, pod kątem obecności złożeń w układzie moczowym.

Zdjęcia USG przedstawione na fig. 11-13 wykonane w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu prezentują złoże wyindukowane według metody opisanej powyżej.

Przykład 9. Rozpuszczalność wyindukowanych złożeń moczowych

Do terapii szczurów wybrano preparat etanolowy z żurawiny wielkoowocowej otrzymany według sposobu 1.1, który wcześniej przebadano pod kątem przenikania składników aktywnych do krwioobiegu. Szczurom podawano preparat wraz z wodą do picia (zawartość preparatu w wodzie wynosiła 3% wagowych). Połowa szczurów po indukcji otrzymała do 3% ekstrakt metanolowy z żurawiny wielkoowocowej (szczury 5-8 oraz 13-16), a grupa kontrolna zamiast ekstraktu żurawiny otrzymała do picia czystą wodę (szczury 1-4 oraz 9-12). Zwierzęta miały stały dostęp do wody z preparatem, a średnie spożycie wody wynosiło 40 ml* (1,2 mg preparatu). Próbkę moczu pobrano po 7 i 14 dniach terapii. Po 14 dniach zwierzęta zostały poddane badaniu ultrasonograficznemu w celu kontroli obecności złożeń w układzie moczowym.