



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **109948**

(13) **C2**

(51) МПК

**A61K 31/415** (2006.01)  
**A61K 31/202** (2006.01)  
**A61K 33/30** (2006.01)  
**A61K 33/04** (2006.01)  
**A61K 33/06** (2006.01)  
**A61K 31/593** (2006.01)  
**A61K 31/51** (2006.01)  
**A61K 31/525** (2006.01)  
**A61K 31/4415** (2006.01)  
**A61K 31/355** (2006.01)  
**A61K 31/455** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 3/02** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2014 00618</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>22.01.2014</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>26.10.2015</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>27.07.2015, Бюл.№ 14</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.10.2015, Бюл.№ 20</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Пасічна Ельвіра Павлівна (UA), Донченко Георгій Вікторович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601 (UA)</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Витаминный комплекс LifePak. - 11с. [Інтернет-публікація], ULR: <a href="http://web.archive.org/web/20120508033711/http://nuskinguide.com/catalog-nuskin-pharmanex/pharmanex/lifepak">http://web.archive.org/web/20120508033711/http://nuskinguide.com/catalog-nuskin-pharmanex/pharmanex/lifepak</a> (збережено WayBack Machine 08.05.2012, знайдено 22.06.2015) MarineOmega. - 8 с. [Інтернет-публікація], ULR: <a href="http://web.archive.org/web/20120508033745/http://nuskinguide.com/catalog-nuskin-pharmanex/pharmanex/marineomega">http://web.archive.org/web/20120508033745/http://nuskinguide.com/catalog-nuskin-pharmanex/pharmanex/marineomega</a> (збережено WayBack Machine 08.05.2012, знайдено 23.06.2015) Витамины в комплексной терапии невропатий. - 3 с. [Інтернет-публікація], ULR: <a href="http://web.archive.org/web/20120618221628/http://www.ortho.ru/doct or/doctor_sh7.html">http://web.archive.org/web/20120618221628/http://www.ortho.ru/doct or/doctor_sh7.html</a> (збережено WayBack Machine 18.06.2012, знайдено 23.06.2015) RU 2460149 C1, 27.08.2012 RU 2443422 C2, 27.02.2012 WO 2012131493 A1, 04.10.2012</p>
---	---

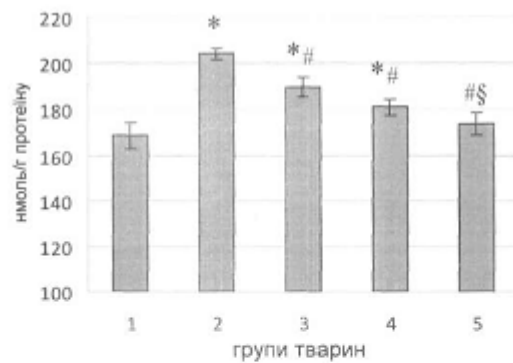
**(54) ЗАСІБ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ Й ПРОФІЛАКТИКИ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ Й ПРОФІЛАКТИКИ АУТОІМУННИХ ДЕМІЄЛІНІЗАЦІЙНИХ ТА НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЦЕНТРАЛЬНОЇ І ПЕРИФЕРІЙНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ (РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ)**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до медицини і фармакології і стосується засобу та способу лікування й профілактики демієлінізаційних захворювань, зокрема розсіяного склерозу, де засіб містить

**UA 109948 C2**

вітамін D<sub>3</sub>, вітамін E, вітаміни групи B - B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, мінерали Zn, Se та Mg, нікотинамід, α-ліпоєву кислоту та α-ліноленову кислоту.



Рівень ТБК-активних продуктів у мозку щурів на 21-у добу розвитку ЕАЕ за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - інтактні тварини; 2 - ЕАЕ; 3 - ЕАЕ+D<sub>3</sub>; 4 - ЕАЕ + засіб (варіант 2); 5 - ЕАЕ + засіб (варіант 1); (M+m, n=30).

\* - достовірні зміни відносно інтактних тварин, # - достовірні зміни відносно контрольних тварин, \$ - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub>.

Фіг. 1

Винахід належить до медицини і фармакології, а саме до комплексних вітамінно-мінеральних препаратів і способів лікування демієлінізаційних захворювань, таких як розсіяний склероз, гострий розсіяний енцефаломієліт, дифузно-дисимінований склероз, гостра та хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія тощо), що має імуномодельючу та антиоксидантну дію та здатний покращувати трофіку ушкоджених клітин центральної нервової системи (ЦНС).

Демієлінізаційні захворювання (ДЗ) належать до ряду аутоімунних захворювань, головною патоморфологічною ознакою яких вважається руйнування мієліну білої речовини центральної або периферичної нервової системи (ЦНС, ПНС). До таких захворювань належать розсіяний склероз (РС), гострий розсіяний енцефаломієліт (хвороба Марбурга), дифузно-дисимінований склероз, гостра та хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія, синдром Міллера-Фішера та деякі інші [1].

З групи ДЗ найбільш серйозну медичну та соціальну проблему представляє РС, вражаючи людей працездатного віку та призводячи до швидкої інвалідизації хворих. Частота захворюваності на цю хворобу в світі становить до 30-50 випадків на 1000 осіб. РС належить як до хронічних ДЗ, так і до нейродегенеративних захворювань. При цьому розвиток нейродегенерації зумовлює швидке прогресування хвороби та інвалідизацію хворих [2, 3].

У розвитку демієлінізації та нейродегенерації провідну роль відіграє активація генерації радикальних сполук кисню й нітрогену та пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), що сприяє ушкодженню мітохондрій клітин ЦНС. [4].

Активація процесів вільнорадикального ушкодження клітин ЦНС за умов ДЗ, зокрема РС, тісно пов'язана з порушенням метаболізму деяких вітамінів і макро- та мікроелементів, зокрема, вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР, В<sub>12</sub>, цинку, магнію та ін. як в тканині мозку, так і в цілому організмі [5, 6]. Все це призводить до порушення мітохондріальної функції, зниження енергетики клітини і її антиоксидантних механізмів та порушення гомеостазу кальцію в клітинах ЦНС, що сприяє розвитку хвороби та її прогресуванню. Недостатність речовин, обмін яких порушується за умов розвитку хвороби, зумовлює поступове заглиблення патологічного стану та неухильний процес інвалідизації хворих.

Успішне лікування РС залежить від корекції як імунологічного стану, так і функціонального стану мітохондрій і адекватної антиоксидантної терапії хворих.

Відомі антиген-неспецифічні імуносупресорні препарати та способи лікування РС. Вони становлять більшість терапевтичних заходів, що використовуються і вивчаються для терапії ДЗ [7]. Прикладами є адренкортикотропний гормон, кортикостероїди, преднізон (преднізолон), метилпреднізон, 2-хлордезоксиденозін (кладрибін), мітоксантрон, сульфасалазин, метотрексат, загальне опромінення лімфоїдних тканин, а також статеві гормони [8] та бета-інтерферон (IFN-β) [9]. Проте застосування деяких імунодепресантів було безуспішним; наприклад азатіоприну, циклофосфаміду і циклоспорину [10]. Недоліками такого підходу є ризик зараження під час неспецифічної імуносупресії і токсичні побічні ефекти деяких цитостатиків. Крім цього, недоліками використання кортикостероїдів є розвиток симптомів, пов'язаних із розвитком гіперкортицизму та його лікуванням, а саме підвищення маси тіла, розвиток артеріальної гіпертензії, остеопорозу, інфекцій шлунка й дванадцятипалої кишки тощо, а також те, що пацієнти стають повністю залежними від екзогенних кортикостероїдів, і хоча їх стан частково поліпшується, наступні загострення таке лікування не попереджує.

Відомо, що для лікування РС вивчаються антиген-специфічні імуносупресивні препарати та способи лікування, проте вони здебільшого знаходяться в стадії розробки [7]. До таких способів лікування входять: пероральне введення в організм антигенів ЦНС, зокрема мієлінових, з метою викликати толерантність енцефалітогенних Т-клітин [11], ін'єкції патогенних Т-клітин (Т-клітинна вакцинація) або синтетичних Т-клітинних рецепторних пептидів з метою викликати імунну елімінацію патогенних Т-клітин [12], ін'єкції толерогенних пептидів, що пов'язані з енцефалітогенними пептидами антигенів ЦНС, зокрема основного протеїну мієліну як, наприклад, глатирамеру ацетат (Копаксон) [13], а також внутрішньовенне введення імуноглобуліну (IVIg). Обмеженість цього підходу полягає в тому, що епітопи аутоантигенів значною мірою є невизначеними в людей [14], і ці епітопи можуть різнитися між пацієнтами з РС, а також можуть бути різними в одного пацієнта, оскільки аутоімунні реакції поширюються на додаткові епітопи одного протеїну та інших протеїнів [15]. Тому лікування такими препаратами часто є неефективним у значної частини хворих. Так, наприклад, вищезазначений Копаксон, що є поширеним засобом, спеціально розробленим для лікування РС, скорочує частоту рецидивів на 35 % лише в половини пацієнтів з гострим перебігом РС [16]. Недоліком його є й те, що препарат діє лише за ремісивного типу захворювання і є неефективним за первинно- та вторинно-прогресуючого типу РС [17].

Відомо про цитокін-специфічну терапію із застосуванням нейтралізуючих антитіл проти TNF- $\alpha$ , розчинних TNF-рецепторів, розчинних антагоністів IL-1 та інших [7]. Такий підхід знаходиться в стадії розробки і обмеження його полягає в проблемі доставки нейтралізуючих агентів у кількості, достатній для ділянки тканини ЦНС, де це потрібно, й у наявності імунологічних побічних ефектів довгострокової дії нейтралізації цитокінів.

Відомо про застосування для покращання нейротрофіки та підвищення внутрішніх захисних резервів організму в процесі лікування РС неспецифічних протекторних препаратів, таких як церебролізин, солкосерил, вітамін Е, берлітрон ( $\alpha$ -ліпоева кислота), нікотинамід, полівітамінні препарати та ін., які призначають як додаткові і необов'язкові компоненти комплексного лікування [18]. Комбінацію вітамінів групи В традиційно призначають для покращання обмінних процесів у нервовій тканині за різних патологічних станів. Традиційно така комбінація складається з вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> та В<sub>12</sub>. Хворим на РС, наприклад, часто призначають вітамінні препарати, що мають такий склад (Неуробекс, Неуробекс-форте, Нейрорубін Форте-Лактаб, Нейробіон) [19]. Однак у склад зазначених вище препаратів, не входять вітаміни В2, нікотинамід та  $\alpha$ -ліпоева кислота, що, поряд з активною формою тіаміну (вітаміну В<sub>1</sub>) необхідні для нормалізації порушених енергетичних процесів у мітохондріях ушкоджених клітин [20], та антиоксидантні та імуномодельючі компоненти. Одним з найбільш адекватних для сповільнення нейродегенеративних змін у хворих на РС та близьких до засобу, що заявляється, з існуючих на сьогодні фармакопейних препаратів є Неуробекс-нео, що окрім вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> та В<sub>12</sub>, містить вітамін В2, нікотинамід, пантотенат кальцію, фолієву та аскорбінову кислоти, однак він також не передбачає вплив на імунологічні механізми хвороби.

Застосування вітамінів та біологічно активних речовин при цьому часто недооцінюють у лікуванні РС, оскільки вважається, що воно не приводить до вагомих результатів лікування та профілактики рецидивів. Частково це зумовлено тим, що на сьогодні немає чітких схем використання таких речовин у комплексному лікуванні подібних захворювань, тому застосування їх часто є незбалансованим та не відповідає потребам організму за умов хвороби. У зв'язку з цим розробка способів лікування РС на основі біологічно активних речовин та їх комбінацій з метою корекції та зупинки прогресування неврологічного дефіциту в хворих є актуальною.

В останні роки з'явилося багато способів лікування РС на основі вітамінів і біологічно активних речовин. Відомо про спосіб лікування РС препаратами на основі вітамінів та мінеральних речовин, яка включає вітаміни групи В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> і фолієву кислоту), а також цинку хлорид, саліцилат натрію та статеві гормони (естроген у жінок та тестостерон у чоловіків) [8]. Таке лікування передбачає вплив на мітохондріально опосередковані механізми розвитку патологічного процесу та зменшення окисного ушкодження макромолекул за рахунок іонів цинку (вплив на регуляцію активності супероксиддисмутази). Саліцилат натрію та гормональна терапія у складі даного препарату націлені на регуляцію імунологічних функцій організму, однак при цьому мають ряд побічних ефектів, таких як головний біль, слухові та зорові розлади, розлади шлунково-кишечного тракту, алергічні реакції, слабкість, схильність до кровотеч, ожиріння тощо.

Відомо про використання різних аналогів вітаміну D<sub>3</sub> для лікування аутоімунних запальних захворювань ЦНС [10, 16], а також вітаміну D<sub>3</sub> у комбінації з відомими імуномодуляторами, такими як IFN- $\beta$  та Копаксон (глацирамеру ацетат) [21, 22]. Такий підхід виявляє певну ефективність у зниженні симптомів захворювання, але не зупиняє прогресування нейродефіциту.

Відомо, що щоденне введення великих доз вітаміну D (20000-100000 МЕ і вище) [16, 22], а також застосування 14000 МЕ вітаміну D<sub>3</sub> у комбінації зі стандартним лікуванням інтерфероном-бета відзначається особливою клінічною ефективністю у лікуванні РС [21]. Введення вітаміну у такій кількості може бути корисним певній групі хворих з низьким статусом вітаміну D, насамперед носіям варіантного гену CYP24A1, що зумовлює генетичну обумовленість такого статусу вітаміну [23]. Однак для іншої групи хворих така доза за тривалого застосування виявляється токсичною, призводячи до гіперкальціємії.

Відомо, що в умовах надмірної активації пероксидних процесів, що супроводжують запальні реакції, активні форми кисню та азоту знижують ефекти вітаміну D<sub>3</sub> і його нейропротекторні властивості значно послаблюються. Ці активні сполуки здатні інгібувати асоціацію ядерних рецепторів вітаміну D<sub>3</sub> з DNA, при цьому синглетний кисень, супероксид, а також пероксинітрид викликають незворотне інгібування, ефект пероксиду є частково оборотним, а оксид азоту викликає оборотне інгібування асоціації рецептора з ДНК. [24]. Зниження фізіологічної активності вітаміну D<sub>3</sub> за умов запалення частково пов'язано також із здатністю таких сполук суттєво інгібувати цитохром P450, що необхідний для утворення активної форми вітаміну D<sub>3</sub>.

Тому в умовах запалення й розвитку оксидативного стресу введення вітаміну D<sub>3</sub>, навіть і в комбінації з відомими імуномодуляторами, виявляється недостатнім для успішного лікування хворих.

Недоліком існуючих спроб лікування з використанням вітаміну D<sub>3</sub> є недостатнє врахування мітохондріально-опосередкованих та неопосередкованих вільнорадикальних змін у ЦНС, що відбуваються вже на ранніх стадіях захворювання, послаблюючи дію вітаміну D<sub>3</sub> і зумовлюючи прогресування нейродегенерації й інвалідизації хворих.

Найбільш близьким аналогом засобу та способу, що заявляються, є засіб та спосіб лікування РС на основі есенціальних поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) у великих дозах, до яких додаються антиоксиданти та деякі вітаміни, зокрема вітаміни D<sub>3</sub>, E та B<sub>6</sub> [25]. Такий спосіб лікування є досить успішним та дає стійкі результати, зменшуючи кількість рецидивів захворювання. Однак недоліком його є те, що він потребує додаткового застосування антиоксидантів та речовин для корекції імунологічного статусу хворих, оскільки не включає імуномодуляторних речовин, окрім ПНЖК, а застосування вітаміну D<sub>3</sub>, що має вплив на імунологічні механізми хвороби, передбачається в ньому лише як один із додаткових і необов'язкових компонентів.

Аналіз сучасних існуючих засобів і способів лікування РС, таким чином, показує, що вони є обмеженими, не враховують всіх аспектів патогенезу захворювання, мають ряд недоліків і не можуть використовуватися для всіх категорій хворих на РС.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу створити ефективний засіб на основі біологічно активних речовин (БАР) та мінералів для лікування ДЗ, зокрема РС, та відповідний спосіб лікування із застосуванням засобу, що заявляється, який запобігатиме розвитку імунного дисбалансу, оксидативного стресу та ушкодженню електрон-транспортних ланцюгів клітини, що призводять до мітохондріальної дисфункції та змін функціонального стану системи цитохрому P450. Це дозволить не тільки полегшити стан хворих на подібні до РС захворювання та сприяти збільшенню періодів ремісії, а й запобігатиме розвитку ускладнень та побічних ефектів, характерних для використовуваних на сьогодні ліків, та призупинятиме неухильне прогресування хвороби та інвалідизацію хворих за рахунок попередження нейродегенеративних змін у ЦНС.

Задачу винаходу вирішують шляхом використання в засобі, що заявляється, комбінації БАР, які є нормальними компонентами обміну речовин в організмі, що порушується за таких станів, і які, діючи на різні ділянки патологічних механізмів, проявляють синергічні протизапальні й нейропротекторні властивості, у підібраних оптимально ефективних дозах, збалансованих для компенсації метаболічних порушень у таких хворих, зниження ризику ускладнень та побічних ефектів при лікуванні та профілактиці подібних захворювань. Для покращання неврологічного стану хворих і зупинки прогресування хвороби імуномодельюча та нейропротекторна дія вітаміну D<sub>3</sub> доповнюється дією речовин, що потенційно здатні знижувати активність оксидативних процесів у ЦНС та регулювати цитохром 450-залежні процеси гідроксилування в організмі таких хворих. Для досягнення синергічної дії компонентів разом з вітаміном D<sub>3</sub> використовують вітаміни E, Nam, α-ліпоєву, α-ліноленову кислоти, вітаміни групи B, а також мінерали Mg, Zn, Se, що входять до ферментних систем антиоксидантного захисту.

Склад і дози компонентів засобу, що заявляється, на 1 кг маси тварини на добу:

вітамін D <sub>3</sub>	1-10, мг
нікотинамід	1,5-6,5, мг
вітамін E	1,5-12, мг
α-ліпоєва кислота	2,5-10, мг
α-ліноленова кислота	100-1000, мг
вітамін B <sub>1</sub>	1-5 мг
вітамін B <sub>2</sub>	1-2,5 мг
вітамін B <sub>6</sub>	1,5-3,5 мг
Mg <sup>2+</sup>	2-10 мг
Zn <sup>2+</sup>	0,2-1,5 мг,
Se <sup>4+</sup>	0,002-0,01 мг.

Технічний результат, одержаний при здійсненні винаходу, полягає в запобіганні або уповільненні розвитку імунного дисбалансу, оксидативного стресу та ушкодженню електронтранспортних ланцюгів клітин ЦНС з одержанням протизапального та протекторного ефекту на ЦНС, що виражається в збільшенні періодів ремісії, попередженні нейродегенеративних змін, призупиненні прогресування хвороби та інвалідизації хворих зі зниженням ризику ускладнень та побічних ефектів за профілактики та лікування ДЗ, подібних до РС. Використання разом із вітаміном D<sub>3</sub> інших компонентів, що проявляють антиоксидантну,

мембраностабілізаційну й мітохондріотропну дію, дозволяє нормалізувати обмін речовин в організмі хворих на ДЗ, і зокрема РС, та стабілізувати їх стан при використанні помірних, нетоксичних доз вітаміну D<sub>3</sub>, що не призводять до гіперкальціємії в організмі хворих.

Коротка характеристика властивостей компонентів, що входять до засобу, що заявляється.

Вітамін D<sub>3</sub>. Вітаміни групи D є біологічно неактивними попередниками гормоноподібних активних речовин, що відіграють важливу роль у регуляції балансу кальцію та фосфату в організмі. Найбільш важливим, хоч і не єдиним, з метаболічно активних метаболітів вітаміну D є 1,25-дигідроксихолекальциферол (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) або кальцитріол, що зв'язуючись з відповідним рецептором, регулює транскрипцію специфічних генів органами і тканинами-мішенями дії вітаміну D, такими як кістки, кишечник, нирки та парашитовидна залоза. При цьому дані останніх років свідчать, що кальцитріол відіграє важливу роль в системному гомеостазі кальцію і інших біохімічних процесах у різних тканинах, включаючи нервову систему [26].

Відомо, що низький рівень 25-гідроксивітаміну D (25(OH)D) в організмі асоціюється з підвищенням розповсюдженості та ризику захворюваності на РС [27].

Відомо, що функціональний метаболіт вітаміну D<sub>3</sub> (кальцитріол), має виражені нейропротекторні властивості, сприяючи зниженню рівня кальцію в клітинах ЦНС та ПНС [28]. Високий рівень цього іона збільшує прояви нейротоксичності [29], що зменшується при введенні кальцитріолу [30]. Фізіологічні концентрації кальцитріолу в мозку близько 10 pM; цей вітамін може перетинати гематоенцефалічний бар'єр і зв'язуватися з ядерними та мембранними рецепторами вітаміну D<sub>3</sub> в клітинах ЦНС та ПНС [31]. Вітамін D<sub>3</sub>, таким чином, розглядається як пара- і аутокринний гормональний нейростероїд, що відіграє важливу роль у нервовій системі [30].

До того ж вітамін D<sub>3</sub> бере участь в імунологічних процесах захисту нервової системи [32], інгібуючи проліферацію прозапальних Т-лімфоцитів та регулюючи продукцію та баланс цитокінів, що важливо для лікування запальних ДЗ, таких як РС. Кальцитріол також зменшує експресію білків головного комплексу гістосумісності II класу і кофактора CD4, що грають важливу роль в аутоімунних процесах у нервовій системі [32].

Відомо, що кальцитріол сприяє активації процесів антиоксидантного захисту завдяки збільшенню глутатіону в мозку та у концентрації 1-100 pM здатен знижувати рівень перекису водню і виявляти нейропротекторний ефект під час мозкового пошкодження різними агентами за умов ішемії [30]. Нейропротекторна роль вітаміну D<sub>3</sub> також пов'язана зі здатністю взаємодіяти з реактивними формами кисню та азоту. Кальцитріол у наномолярних концентраціях (0,1-100 нм) захищає нейрони від прямих ефектів супероксиду і перекису водню [30]. При цьому кальцитріол має здатність зменшувати рівень NO, інгібуючи експресію індукційної NO-синтази у спинному і головному мозку [30]. Таким чином він може сприяти зменшенню утворення дуже реактивних АМО, таких як пероксинітрит, моноксид та діоксид нітрогену (NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), а також збільшенню рівня відновленого глутатіону та активації глутатіонової антиоксидантної системи в астроцитах. Нейропротекторна роль вітаміну D<sub>3</sub> також пов'язана з індукцією нейротрофінів. Індукція нейротрофінів лежить в основі нейропротекторної дії вітаміну D<sub>3</sub> в мозку при ішемії і загальних антинейродегенеративних властивостей цього вітаміну [34].

На моделі ЕАЕ (у мишей і щурів), кальцитріол інгібує аутоімунне ушкодження нервової системи, в той час як дефіцит цього вітаміну збільшує аутоімунні пошкодження [32, 33]. При цьому відомо [35], що введення мишам низьких доз кальцію та ін'єкції 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> до і після індукції захворювання знижує частоту захворюваності і тяжкість захворювання, але не запобігає розвитку ЕАЕ.

Перші клінічні дані досліджень, проведених у пацієнтів з дефіцитом вітаміну D, що не страждали на РС, передбачають, що щоденний необхідний рівень для досягнення достатнього рівня 25(OH)D в сироватці крові є між 7000 та 14000 МЕ вітаміну D<sub>3</sub> щоденно [36]. За іншими даними необхідна щоденна доза вітаміну складає 2000-5000 МЕ, а для пацієнтів з РС дози до 10000/д є корисними та нетоксичними [37, 38]. У будь-якому разі потреба організму людини у вітаміні D значно перевищує добове надходження зі звичайного раціону. Навіть додаткове введення вітаміну у складі полівітамінних препаратів, у яких доза вітаміну D не перевищує 400-500 МЕ, мало вирішує проблему в країнах із помірним кліматом.

Вітамін Е (токоферол), має антиоксидантну й мембраностабілізаційну дію та здатен модулювати фізико-хімічні властивості мембран.

У фізіологічних умовах окислених токоферол здатен відновлюватись шляхом взаємодії з відновлюючими агентами, такими як аскорбінова кислота (вітамін С), дигідроліпоева кислота та глутатіон. Цей процес може відбуватись також ферментативним шляхом із залученням NADH-цитохрома b5. Рівень глутатіону в клітинах, як зазначалося вище, регулюється вітаміном D<sub>3</sub>. Таким чином, вітаміни D та Е діють синергійно, позитивно впливаючи на функціонування один

одного. Існують дані, що підтверджують синергізм дії вітамінів D<sub>3</sub> та E на гомеостаз кальцію, оскільки відомо, що вітамін E активує реакції гідроксилювання вітаміну D<sub>3</sub> [39].

Протекторний вплив вітаміну E на клітини ЦНС проявляється завдяки його здатності впливати на мікрров'язкість мембрани, захищати жирні кислоти у складі фосфоліпідів від вільнорадикального ПОЛ, а також взаємодіяти із вільними жирними кислотами та лізофосфоліпідами - продуктами гідролізу ліпідів фосфоліпазами, котрі здатні модифікувати структуру мембран [40]. Стабілізуючи мембранні структури ЦНС та захищаючи їх від оксидативного ушкодження, вітамін E попереджує активацію рецепторів та ензимів, що здатні передавати патологічні сигнали, зокрема, Fas-рецептору та протеїнкінази C, що залучені до активації клітинної загибелі.

Токоферол захищає не тільки плазматичну мембрану, а й стабілізує мітохондріальну мембрану, захищаючи клітинний простір від виходу факторів, які можуть запускати ПОЛ та процеси апоптозу в клітині. Відомо також, що вітамін E бере участь у відновленні убіхінону, необхідного компонента електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, тому є необхідним для підтримання енергетичних процесів у мітохондріях.

Нікотинамід (NA) має здатність підвищувати аеробні процеси в мітохондріях, сприяючи підвищенню енергетичного потенціалу клітин, активувати синтез ліпідів, знижувати активність вільнорадикального ушкодження мембранних ліпідів та компонентів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, знижуючи гіперпродукцію NO, захищає DNA клітини від ушкодження вільними радикалами, має здатність інгібувати експресію астроцитами факторів клітинної адгезії та антигенів головного комплексу гістосумісності II класу *in vitro* і, а також підвищувати активність мікосомальних цитохром P-450-залежних ферментів (монооксигеназ) [41]. Нашими дослідженнями показано істотне зниження рівня нікотинамідних кофакторів в тканині мозку тварин за умов EAE [42], що свідчить про його важливу роль у механізмах розвитку демієлінізаційних захворювань та необхідність додаткового забезпечення організму цією сполукою за подібних станів.

$\alpha$ -ліпоєва кислота є ефективною антиоксидантною сполукою, що використовується для лікування патологій печінки, нейродегенеративних хвороб та цукрового діабету [43]. Разом з мультикомпонентними ензимними системами ліпоєва кислота формує в організмі динамічну редокс-систему, що задіяна у транспорті ацильних груп. Вона здатна легко долати гематоенцефалічний бар'єр і сприяти підтриманню аеробного метаболізму в мітохондріях. Будучи кофактором, задіяним в оксидативному декарбоксілюванні  $\alpha$ -кетокислот у складі піруватдегідрогеназного комплексу, вона сприяє забезпеченню мітохондрій достатнім рівнем Ко-А та NADH і підвищенню енергетичного потенціалу клітин.

Антиоксидантний ефект ліпоєвої кислоти пов'язаний з наявністю в її структурі двох тіолових груп та її здатністю зв'язувати радикальні сполуки та вільні йони заліза [44]. Ліпоєва кислота не тільки має власні антиоксидантні властивості, а й підтримує функціонування інших антиоксидантних компонентів в організмі [45], зокрема, системи глутатіону та вітаміну E.

$\alpha$ -Ліноленова кислота (АЛК), подібно до ейкозапентаєнової та докозагексаєнової кислот, що є омега-3 поліненасиченими жирними кислотами (ПНЖК), має стабілізаційний вплив на мембрани клітин, знижує рівень холестеролу у складі ліпопротеїнів низької щільності та інгібує продукцію моноцитами прозапальних цитокінів, залучених у патогенез ДЗ. Знижуючи експресію декількох генів, в тому числі TNF- $\alpha$ , що активуються за різних захворювань запального характеру, АЛК знижує рівень посередників запальних реакцій – протеїнів гострої фази та молекул клітинної адгезії, сприяючи гальмуванню запальних реакцій [46], подібно до вітаміну D<sub>3</sub>.

Вітамін B<sub>1</sub> (тіамін) є незамінним при лікуванні неврологічних розладів різного ґенезу. Він бере участь у вуглеводному та енергетичному обміні, особливо у нервових та м'язових тканинах, а також у ліпідному, протеїновому та водно-сольовому обміні.

Відомо, що за умов запалення та активації процесів ПОЛ рівень вітаміну B<sub>1</sub> знижується. А недостатність його в свою чергу сприяє активації вільнорадикальних процесів мітохондріями. Тіаміндифосфат (ТРР), що є активною формою вітаміну B<sub>1</sub> входячи до складу піруватдегідрогеназного комплексу та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази, сприяє синтезу АТФ і підтриманню фізіологічного співвідношення АТФ/АДП, що регулює вхід Ca<sup>2+</sup> в клітину. Тіамін не тільки регулює вхід Ca<sup>2+</sup> в клітину, але і вихід його із внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup>-го депо ендоплазматичного ретикулуму [47], запобігаючи активації процесів загибелі клітин та руйнування компонентів мієліну, що важливо для підтримання організму за ДЗ запального ґенезу.

Входячи до складу транскетолази, тіамін грає значну роль у функції забезпечення достатньою кількістю NADPH для підтримання окисно-відновних процесів в клітині, рівня відновленого глутатіону (GSH) та синтезу жирних кислот, таким чином сприяючи

антиоксидантним механізмам та процесу ремієлінізації. Тіамін є необхідним у процесі синтезу ацетилхоліну, нормалізуючи процеси збудження у синапсах. Він може діяти, як прямий антиоксидант, попереджуючи ПОЛ, а також здатний до нейтралізації активних форм нітрогену (NO) та зниження процесів їх індукованого синтезу.

Вітамін B<sub>2</sub> (рибофлавін) є необхідним для підтримання процесів аеробного дихання. В комплексному застосуванні його з іншими вітамінами, що модулюють енергетику клітини, він бере участь у регуляції статусу АТР в клітині. Його активна форма FAD залучена до багатьох реакцій ЦТК, в тому числі і у функціонуванні ПДК, а також є компонентом ЛТЕ в мітохондріях. Застосування вітаміну B<sub>2</sub> особливо ефективне за дефіциту ацетил-CoA-дегідрогеназ. При цьому він покращує комплекс I і II мітохондріального ланцюга перенесення електронів [48]. Рибофлавін бере опосередковану участь у антиоксидантній системі. Входячи до складу глутатіонредуктази (NADPH: глутатіон оксидоредуктази), ензиму, що відновлює глутатіон, його активна форма виконує важливі антиоксидантні функції, сприяючи активації глутатіонової антиоксидантної системи та підтриманню функціональної активності вітаміну E. За дефіциту рибофлавіну також відбувається зниження активності глутатіонпероксидази (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оксидоредуктази), каталази, альдозоредуктази (альдитол: NADP оксидоредуктаза) та сорбітолдегідрогенази, що призводить до зниження внутрішніх резервів для регенерації та антиоксидантного захисту.

Вітамін B<sub>6</sub> (піридоксин) грає важливу роль в обміні речовин і є необхідним для нормального функціонування центральної та периферичної нервової системи. Піридоксин має здатність поліпшувати функцію нервових клітин і клітин печінки. Він, як і інші вітаміни цієї групи, бере участь в метаболізмі вуглеводів і є важливим для підтримання енергетичного статусу клітини, оскільки є необхідним для функціонування ензиму гліколізу глюкозо-6-фосфатдегідрогенази.

Піридоксин бере участь в обміні протеїнів, особливо в обміні триптофану, метіоніну, цистеїну, глутамінової та інших амінокислот, має велике значення у синтезі нейромедіаторів, обміні гистаміну. Він також грає важливу роль у обміні ліпідів та нікотинамідних кофакторів. Таким чином, вітамін B<sub>6</sub> є необхідним для підтримання процесів синтезу ліпідних та протеїнових компонентів мієлінової оболонки, інтенсивність яких різко знижується за ДЗ. Тому структурна роль вітаміну B<sub>6</sub> дуже важлива для процесу ремієлінізації за ДЗ.

Вітамін B<sub>6</sub> сприяє механізмам антиоксидантного захисту, оскільки бере участь у транспорті сульфгідрильних груп та відновленні глутатіону, а також контролює продукцію внутрішньоклітинного оксиду азоту (NO) та рівень позаклітинного Mg, що є необхідним для вивільнення NO з клітини [49].

Отже, вітаміни групи B приймають участь в енергетичному обміні, регулюючи рівень АТР, включаються в регуляцію рівня Ca<sup>2+</sup> в клітині, попереджуючи його вхід та виникнення патологічних процесів, впливають на вуглеводний, ліпідний та амінокислотний обмін. При цьому вітаміни B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> та α-ліпоєва кислота мають незалежні від мітохондріально-опосередкованих процесів антиоксидантні функції. А вітаміни B<sub>1</sub> B<sub>6</sub> та РР також мають антинітрозативними властивостями, що можуть посилювати дію вітаміну D<sub>3</sub>. При зниженні рівня цих вітамінів в клітині за умов патологічних процесів відбувається зниження енергетики, вмикаються механізми апоптозу, посилюються процеси ПОЛ та порушується метаболізм вітаміну D<sub>3</sub>. Тому всі вищезазначені вітаміни разом з іншими БАР у комплексі є необхідними для компенсації метаболічних порушень в організмі хворих та реалізації нейропротекторної та імунomodulatory дії вітаміну D<sub>3</sub> за умов аутоімунних та нейродегенеративних ДЗ.

Магній (Mg<sup>2+</sup>) є необхідним для регуляції іонного гомеостазу і нормалізації мітохондріального дихання, оскільки задіяний у механізмах підтримання фізіологічного співвідношення Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> як в мітохондріях, так і загалом в клітині [50]. Зниження мітохондріального рівня Mg<sup>2+</sup> та підвищення Ca<sup>2+</sup>, що відбувається за ДЗ та нейродегенеративних захворюваннях, сприяє пригніченню аеробного метаболізму в клітині та розвитку обумовлених розвитком мітохондріальної дисфункції патологічних змін у ЦНС. Регулюючи активність ПДК та N<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-АТР-ази, Mg<sup>2+</sup> здатний запобігати механізмам розвитку оксидативного ушкодження клітин ЦНС та їх апоптозу.

Цинк (Zn<sup>2+</sup>) є необхідним для формування та функціонування мозку й порушення регуляції рівня Zn<sup>2+</sup> у мозку спостерігається за багатьох психіатричних та неврологічних захворюваннях, таких як хвороба Паркінсона та Альцгеймера, шизофренія, депресія, латеральний аміотрофічний склероз, синдром Дауна, РС, епілепсія, хвороба Вільсона та хвороба Піка. За умов цих захворювань відбувається зниження рівня цього іону у мозку.

Zn<sup>2+</sup> впливає на різноманітні клітинні функції. Він задіяний у функціонуванні більш ніж 300 ензимів в клітині [51]. Іони Zn<sup>2+</sup> грають важливу роль у регуляції біологічних функцій, включаючи активність транскрипційних факторів, метаболізму нуклеїнових кислот, репарації та транскрипції



ДНК, є необхідними для формування цитоскелету клітин мозку [52]. Цинк грає важливу роль в синаптичній передачі та виступає як ендogenousний нейромодулятор. До того ж,  $Zn^{2+}$  є важливим для підтримання постсинаптичної щільності. В центральній нервовій системі виявлено вплив  $Zn^{2+}$  на N-метил-D-аспартат-опосередковану сигналізацію (NMDA-рецептори) та вважається, що він може бути посередником вищих когнітивних функцій, таких як навчання та пам'ять, а також пластичність емоціональних мереж [53].

$Zn^{2+}$  бере безпосередню участь у регуляції окислювальної реакції на стрес, проявляючи антиоксидантні властивості, оскільки є необхідним для функціонування ензиму антиоксидантного захисту супероксиддисмутази.

За умов окисдативного стресу та інших аспектів демієлінізаційних та дегенеративних процесів, таких як мітохондріальна дисфункція, ексайтотоксичність, токсичність оксиду нітрогену та запалення, підвищення рівня генерації оксиду нітрогену, як вважають, безпосередньо впливає на рівень  $Zn^{2+}$  у мозку, сприяючи вивільненню його з внутрішньоклітинних депо і подальшому втрачання клітиною. Відомо, що глутатіон поліпшує доставку  $Zn^{2+}$  в клітини та підвищує мозковий рівень  $Zn^{2+}$  [54]. До таких відносяться N-ацетил цистеїн, вітамін D<sub>3</sub>, Nam, вітаміни B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> та B<sub>6</sub>. Останній також додатково підвищує швидкість поглинання  $Zn^{2+}$  та доведено, що ефективність застосування  $Zn^{2+}$  у вигляді харчових домішок разом з вітаміном B<sub>6</sub> є більшою [55].

Селен ( $Se^{4+}$ ) в організмі взаємодіє з вітамінами, ензимами і біологічними мембранами, бере участь в регуляції обміну речовин, в обміні ліпідів, білків і вуглеводів, а також в окислювально-відновних процесах. Селен входить до складу більше ніж 30-ти життєво важливих біологічно активних сполук організму, зокрема, протеїнів та ензимів, що входять до системи антиоксидантно-антирадикального захисту організму (селензалежна глутатіон пероксидаза, фосфоліпід-гідропероксид-глутатіонпероксидаза) [56]. При цьому він є синергистом вітаміну E і є необхідним для підтримання його антиоксидантної функції [57].

Селен входить до складу DNA-полімерази I, при порушенні якої виникають онкозахворювання. Він застосовується як потужний протипухлинний засіб, а також для профілактики широкого спектра захворювань. Малі концентрації селену проявляють антидистрофічний ефект і чинять протиалергічну дію за рахунок пригнічення синтезу гістаміну. Селен стимулює проліферацію тканин, покращує функцію багатьох типів клітин, а також імунної системи.

Термін "лікування", що використовується в описі винаходу, передбачає зменшення, або полегшення симптомів, усунення етіології симптомів на тимчасовій або постійній основі. Лікування розладу може проявлятися, наприклад, у зменшенні кількості/полегшенні симптомів, пов'язаних з порушенням нервових функцій, у зменшенні частоти рецидивів (появи симптомів) розладу або зменшенні патологічних біохімічних змін, що мають важливе значення у патогенезі ДЗ, зокрема РС. Термін "профілактика", що використовується тут, означає попередження розладу, що наприклад, може проявлятися у попередженні чи сповільненні, чи затримці появи симптомів зазначеного розладу, або стану, а також попередженні патологічних біохімічних змін, що мають значення у патогенезі ДЗ, зокрема РС, значною мірою.

Перша відмінність засобу, що заявляється, від існуючих засобів полягає в тому, що склад компонентів засобу та їх ефективні оптимальні дози експериментально підібрані та збалансовані для корекції визначеного експериментально порушення вмісту та обміну біологічно активних сполук та внутрішньоклітинного обміну та забезпечення потреб організму за модельних умов ЕАЕ, що обґрунтовує можливість ефективного використання запропонованого засобу для профілактики та лікування ДЗ, зокрема, РС.

Друга додаткова відмінність засобу, що заявляється, полягає в тому, що експериментально підібрані компоненти засобу проявляють синергічний інгібуючий ефект на розвиток ДЗ.

Третя відмінність полягає у тому, що вітамін D<sub>3</sub> застосовують у оптимально мінімальній ефективній дозі – 1-10 мкг на кг маси тіла тварини на добу, що є меншою від аналогічних засобів на основі цього вітаміну, і тому може застосовуватися тривало для лікування й профілактики у хворих на РС.

Четверта додаткова відмінність полягає в тому, що до складу засобу, що заявляється, додатково входить нікотинамід (Nam) у дозі 1,5-6,5 мг на кг маси тварини на добу.

П'ята додаткова відмінність полягає в тому, що до складу засобу, що заявляється, входить вітамін E у дозі 1,5-12 мг на кг маси тварини на добу.

Шоста додаткова відмінність полягає в тому, що засіб, що заявляється, додатково містить  $\alpha$ -ліпоеву кислоту (вітамін N) у дозі 2,5-10 мг на кг маси тварини на добу.

Сьома додаткова відмінність полягає в тому, що засіб, що заявляється, додатково містить α-ліноленову кислоту (вітамін F) у дозі 100-1000 мг на кг маси тварини на добу.

Восьма відмінність полягає в тому, що засіб, що заявляється, містить вітаміни групи B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>) у дозах відповідно: 1-5; 1-2,5; 1,5-3,5 мг на кг маси тварини на добу.

5 Дев'ята додаткова відмінність полягає у тому, що засіб, що заявляється, додатково містить Mg<sup>2+</sup> у дозі 2-10 мг на кг маси тварини на добу.

Десята додаткова відмінність полягає в тому, що дози використовуваних у складі зазначеної композиції мінералів Zn та Se є 0,2-1,5; 0,002-0,01 мг на кг маси тварини на добу відповідно.

10 Відмінність способу лікування та профілактики, що заявляється, полягає у застосуванні нового засобу, що заявляється.

Сировиною для отримання комплексного лікарського засобу, що заявляється, слугують субстанції як: а) фармацевтичні препарати: вітамін D<sub>3</sub> (водний розчин), вітамін E (токоферолу ацетат, масляний розчин) та α-ліпоєва кислота (берлітін); та б) хімічні реактиви: Na<sub>2</sub>S, тіаміну бромід (вітамін B<sub>1</sub>), рибофлавін (вітамін B<sub>2</sub>), піридоксин (вітамін B<sub>6</sub>), α-ліноленова кислота, 15 магнію хлорид, цинк хлориду та натрію селенат, які мають якість не нижче "хч" (хімічно чисті).

В експериментах на тваринах використовують засіб, що заявляється, у вигляді окремих розчинів – водного і масляного – та водної суспензії нерозчинних компонентів (α-ліпоєва кислота), які застосовують одночасно. Розчини та суспензії для перорального введення готують, змішуючи водорозчинні та жиророзчинні компоненти перед використанням у 20 необхідних пропорціях. Водорозчинні компоненти засобу, що заявляється, розчиняють у воді, жиророзчинні - в очищеній оливковій олії ("Sigma") у співвідношенні, необхідному для дозування вибраних речовин. Добова доза компонентів засобу, що заявляється, міститься у 0,1 мл водного розчину/суспензії та 0,1-0,4 мл масляного розчину. Добову дозу застосовують одноразово.

Експериментальний алергічний (аутоімунний) енцефаломієліт (ЕАЕ) є експериментальною 25 моделлю РС та деяких інших аутоімунних ДЗ, що дозволяє вивчати механізми розвитку демієлінізації та розробляти методи діагностики та лікування цих захворювань [3]. Для експериментальної перевірки ефективності засобу, що заявляється, та його переваги перед відомими лікарськими препаратами антиоксидантної та нейропротекторної дії експерименти на лабораторних моделях ЕАЕ проводять на різних видах тварин (щурах і морських свинках) [58]. 30 Ці моделі дозволяють оцінити профілактичну та лікувальну дію засобу, що заявляється. При цьому оцінюють нейропротекторну (протизапальну, антиоксидантну та мітохондріопротекторну) активність засобу, що заявляється, здатність його впливати на перебіг та термін початку розвитку ЕАЕ.

Для контролю за розвитком патології щодня перевіряють стан тварин на наявність 35 симптомів, таких як втрата маси тіла, млявість, знижений тонус хвоста й задніх кінцівок та їхній частковий парез, парези, паралічі та судоми кінцівок, мимовільне сечовипускання, тощо. Тяжкість неврологічних симптомів характеризують за шкалою (в балах): 1 - слабкість хвоста (парез); 2 - незграбна хода, парез хвоста та парепарез; 3 - параліч хвоста та задніх кінцівок; 4 - параліч задніх та передніх кінцівок; 5 - агонія, смерть [59].

40 Використовуючи модель ЕАЕ на морських свинках, тварин масою 300-350 г однократно імунізують енцефалітогенною сумішшю в повному ад'юванті Фрейнда (ПАФ) з розрахунку 50 мкг ОПМ або 2 мг (суха вага) гетерологічного (бичачого) або гомологічного ліофілізованого мієліну білої речовини мозку, 0,2 мл ПАФ ("Sigma") та 0,15-0,2 мл фізіологічного розчину на одну тварину внутрішньошкірно в подушечки задніх лап під легким ефірним наркозом в об'ємі 0,4 мл. 45 Тварин декапітують на 12-18-у добу після розвитку неврологічних симптомів [60].

Використовуючи модель ЕАЕ на щурах Wistar, тварин 1,5-3 місячного віку і масою 100-200 г однократно імунізують енцефалітогенною сумішшю в ПАФ, що містить 100-200 мкг ОПМ, або 4,5-6 мг (суха вага) гомологічний ліофілізований мієлін білої речовини мозку, або 70-100 мг гомогенат гомологічного спинного мозку, 0,2 мл ПАФ (вміст неактивних мікобактерій 5мг/мл) та 50 0,2 мл фізіологічного розчину на одну тварину. Енцефалітогенну суміш вводять внутрішньошкірно в подушечки лап і підшкірно біля основи хвоста в об'ємі 0,4 мл.

У більшості тварин на 14-у добу експерименту, виникають неврологічні симптоми; а в окремих тварин вони спостерігаються вже з 8-ї д.п.і. [58].

Для визначення профілактичної дії засіб, що заявляється, вводять per os одноразово 55 щодоби з 1-ї по 14-у добу після індукції (д.п.і.) ЕАЕ у відповідних лікувальних та профілактичних дозах.

Для оцінки лікувальної дії засіб, що заявляється, вводять тваринам per os один раз на добу щодня протягом 14 днів, починаючи з 8-ї д.п.і. ЕАЕ після розвитку первинних ознак захворювання по 21-у добу в лікувальних дозах.

Компоненти та дози засобу, що заявляється, підбирають експериментально з урахуванням ЛД<sub>50</sub> діючих речовин для досягнення оптимальної ефективності.

Імунізованих тварин розділяють на декілька груп по 10 щурів у кожній, одну з яких (контрольну) складають імунізовані тварини, які щодня отримують *per os* фізіологічний розчин. Тварини інших груп щодня отримують вітамін D<sub>3</sub> в дозі 5 мкг/кг та різні варіанти засобу, що заявляється, за двома схемами введення: з 1-ої або 8-ої доби після імунізації (д.п.і.) ЕАЕ. У групах порівняння тварини з 1-ої або з 8-ої д.п.і. отримують відомі препарати з антиоксидантними та нейропротекторними властивостями, а саме: Берлітрон в дозі 10 мг/кг, або полівітамінний комплекс Неуробекс-нео у дозі 1/3 капсули на кг маси тіла (дози перераховані з рекомендованих для лікування неврологічних захворювань; в одній капсулі міститься 50 мг тіаміну, 25 мг рибофлавіну, 100 мг нікотинамід, 25 мг пантотенату кальцію, 0,5 мг фолієвої кислоти, 200 мг піридоксину, 5 мкг цианкобаламіну, 175 мг аскорбінової кислоти). Всі препарати вводять *per os* в об'ємі 0,2-0,5 мл (роздільно по 0,1 мл суспензії водорозчинних компонентів та 0,1-0,4 мл масляного розчину жиророзчинних компонентів), використовуючи спеціальні зонди, відповідно для виду тварин. Всі маніпуляції з лабораторними тваринами виконують під легким ефірним наркозом.

Для характеристики функції мітохондрій використовують визначення рівня залізо-сірчаних протеїнів N-2 (ЗСП N-2), убісеміхінону та нітрозильних комплексів заліза (НКЗ). ЗСП N-2 беруть участь у спряженні біологічного окислення з фосфорилуванням і є індикатором стану енергетичної системи мітохондрій, дозволяючи судити про активність процесів клітинного дихання, а також про енергозабезпечення протеїнсинтезуючих систем ендоплазматичного ретикулулу [61]. Ці протеїни є критично важливим компонентом процесу трансформації енергії в І пункті спряження окислення та фосфорилування у дихальному ланцюзі, при пошкодженні якого повністю втрачається здатність мітохондрій синтезувати АТФ, а кисень відновлюється до супероксидних аніон-радикалів. Ще одним інформативним показником, що характеризує стан ланцюгу транспорту електронів (ЛТЕ) мітохондрій, є рівень довгоживучих радикалів убісеміхінону, котрі разом з іонами металів змінної валентності входять до комплексів з оригінальною системою молекулярної електроніки [62]. Убісеміхінон є напіввідновленою формою коензиму Q (CoQ, убіхінону), що утворюється в окисно-відновних перетвореннях CoQ, і в нормі є звичайним компонентом ЛТЕ мітохондрій. Недостатність його свідчить про зниження CoQ у мозку, що також сприяє розвитку мітохондріальної дисфункції [45].

У пошкодженні ЗСП N-2 за умов активації запальних аутоімунних процесів за ДЗ провідну роль відіграє посилення генерації макрофагами супероксид-аніон-радикалу та пероксинітриду, що здатен нітрузувати залізо-сірчані протеїнові комплекси в мітохондріях та призводить до зміни їх функцій, зокрема, вони стають неспроможними підтримувати перенос електронів у дихальному ланцюзі. При зв'язуванні NO із ЗСП утворюються НКЗ. Посилення їх генерації у тканинах є маркером інтенсифікації вільнорадикальних процесів в організмі та ушкодження мембранних і субмембранних структур.

В умовах хронічного запалення знижуються процеси детоксикації та біотрансформації, що обумовлюється пригніченням прозапальними цитокінами системи цитохрому P450 в клітинах. Неконтрольоване зниження метаболізаційних функцій клітин призводить до порушення метаболізму деяких речовин, зокрема вітаміну D, накопичення екзо- і ендотоксинів, особливо в умовах масивної медикаментозної терапії, що веде до ускладнення перебігу хвороби й погіршенні стану хворих.)

Для підтвердження ефективності засобу, що заявляється, визначають:

- кількість тварин із симптомами захворювання, (n);
- день початку захворювання від дня імунізації;
- тяжкість перебігу, яка виражається сумою балів, що відповідають руховим розладам та мозочкової атаксії, які виникають у тварин під час захворювання [63];
- виживання тварин в експерименті;
- рівень нейроспецифічних аутоантитіл у крові тварин [64];
- рівень тіобарбітуративних продуктів (ТБК-активні продукти) як біохімічний показник оцінки статусу ПОЛ [65];
- показники функціонування мітохондрій (рівень компонентів ланцюга транспорту електронів: Fe-S-протеїни N-2, убісеміхінон та нітрозильні комплекси заліза) у тканині мозку імунізованих тварин [66];
- рівень цитохрому P450 у тканинах мозку і печінки імунізованих тварин [65, 66].

Отримані дані обробляють статистично з використанням t-критерію Стюдента [67].

Клінічну ефективність засобу, що заявляється, комплексно оцінюють за результатами експериментів у попередженні розвитку симптомів ЕАЕ та її протизапальні, антиоксидантні та протекторні властивості на компоненти мітохондріального та мікросомального ЛТЕ.

В експериментах використовують три варіанти засобу, що заявляється, з максимальними, середніми та мінімальними дозами компонентів (на кг маси тіла на добу):

варіант 1: вітамін D<sub>3</sub>-10 мкг, вітамін Е - 10 мг, Nam-6,5 мг, α-ліпоєва кислота - 10 мг, α-ліноленова кислота - 1000 мг, вітаміни В<sub>1</sub>-5 мг, В<sub>2</sub>-2,5 мг, В<sub>6</sub>-3,5 мг, Mg-10 мг, Zn-1,5 мг та Se-10 мкг.

варіант 2: вітамін D<sub>3</sub>-5 мкг, вітамін Е - 6,5 мг, Nam-3,5 мг, α-ліпоєва кислота - 2,5 мг, α-ліноленова кислота - 500 мг, вітаміни В<sub>1</sub>-1,25 мг, В<sub>2</sub>-1,2 мг, В<sub>6</sub>-1,5 мг, Mg-5 мг, Zn-0,7 мг та Se-5 мкг.

варіант 3 (варіант 1): вітамін D<sub>3</sub>-1 мкг, вітамін Е - 1,5 мг, Nam-1,5 мг, α-ліпоєва кислота - 2,5 мг, α-ліноленова кислота - 100 мг, вітаміни В<sub>1</sub>-1 мг, В<sub>2</sub>-1 мг, В<sub>6</sub>-1,5 мг, Mg-3 мг, Zn-0,2 мг та Se-2 мкг. Далі суть винаходу пояснюється наступними прикладами:

Приклад 1. Визначення ефективного складу засобу, що заявляється, для лікувальної й профілактичної дії на перебіг ДЗ.

Лікувальну й профілактичну дію засобу що заявляється, з різним складом компонентів на перебіг ЕАЕ оцінюють у тварин порівняно з відомими препаратами, що мають антиоксидантні та нейропротекторні властивості й використовуються для симптоматичної терапії у комплексному лікуванні РС-Берлітіоном і Неуробексом-нео (табл. 1 і 2). Досліди проводять на щурах і морських свинках. Клінічну картину ЕАЕ у тварин в експерименті спостерігають протягом 35 д.п.і.

Імунізованих щурів і морських свинок розділять на групи в залежності від "дієти", що передбачає додаткове введення до раціону харчування засобу, що заявляється, з різним складом його компонентів або відомих препаратів:

1 - контрольна (ЕАЕ без введення БАР);

2-D<sub>3</sub>;

3-D<sub>3</sub> + Е + Nam;

4-D<sub>3</sub> + Е + Nam + α-ліпоєва кислота;

5-D<sub>3</sub> + Е + Nam + α-ліпоєва кислота+ліноленова кислота+Ві+Se;

6-D<sub>3</sub> + Е + Nam + α-ліпоєва кислота+ліноленова кислота+В<sub>6</sub>+Zn;

7-D<sub>3</sub> + Е + Nam+α-ліпоєва кислота+ліноленова кислота+В і +В<sub>2</sub>+В<sub>6</sub>+Se+Zn+Mg (повний склад засобу, що заявляється);

8 - Берлітіон;

9 - Неуробекс-нео.

В експериментах використовують варіант 1 засобу, що заявляється. Профілактична дія всіх застосованих варіантів комбінацій компонентів засобу, що заявляється, (групи 2-7), характеризується зменшенням частоти захворюваності та вираженості симптомів, а також збільшенням латентного періоду значно більшою мірою, ніж відомі препарати (табл. 1, групи 3-7). При цьому найбільш виражену профілактичну дію виявляє засіб, що заявляється, з повним складом компонентів (табл. 1, група 7.).

Таблиця 1

Профілактична дія засобу, що заявляється  
(варіант 1), на розвиток ЕАЕ в залежності від його складу

Групи тварин з відповідною дієтою	День початку і захворювання ЕАЕ від дня імунізації	Пік тяжкості (бали)	Захворюваність, (кількість тварин з симптомам и/загальна кількість 1 тварин, %)	Середній показник тяжкості захворювання (бали)	Летальний результат, (кількість летальних випадків/ загальна кількість тварин, %)
Щури					
1	16±7	5.0	9/10 (90)	3,0±0,5	2/10 (20)
2	24±4	5.0	4/9 (44)	1,7±0,3*	1/9 (11)
3	25±6	2.0	13/10 (30)	1,5±0,3*	0/10 (0)

Продовження таблиці 1

4	30±0	2.0	1/10 (10)	2,0±0	0/10 (0)
5	Ознаки захворювання відсутні	0	0/10 (0)	0±0	0/10 (0)
6	27±2*	2.0	2/10 (20)	1,5±0,5*	0/10 (0)
7	Ознаки захворювання відсутні	0	0/10 (0)	0±0*	0/10 (0)
8	22±5	4.0	7/10 (70)	2,4±0,4	0/10 (0)
9	18±6	4,0	9/10 (90)	2,6±0,3	0/10 (0)
Морські свинки					
1	14±7	5.0	11/11 (100)	3,7±0,5	3/11 (27)
2	21±5	3,5	8/11 (72)	2,25±0,4*	0/11 (0)
3	26±7	2,0 і	4/10 (40)	1,5±0,3*	0/10 (0)
7	Ознаки захворювання відсутні	0,0	0/9 (0)	0±0*	0/9 (0)

\* - статистична різниця достовірна ( $p < 0.05$ ) порівняно з контролем.

Лікувальна дія комбінацій компонентів засобу, що заявляється (групи 2-7), проявляється в зменшенні тяжкості симптомів захворювання ЕАЕ в експериментальних тварин та збільшенні латентного періоду захворювання, проте найбільший ефект проявляє засіб, що заявляється, з повним складом максимальним вмістом його компонентів (табл. 2, група 7). Частота виникнення захворювання при цьому майже не змінюється (табл. 2).

Таблиця 2

Лікувальна дія засобу, що заявляється, на розвиток ЕАЕ в залежності від його складу

Групи тварин з відповідною дієтою	День початку захворювання ЕАЕ від імунізації	Пік тяжкості (бали)	Захворюваність, (кількість тварин з симптомами /загальна кількість тварин, %)	Середній показник тяжкості захворювання (бали)	Летальний результат, (кількість летальних випадків/ загальна кількість тварин, %)
Щури					
1	15±5	5.0	9/10 (90)	3,7±0,5	3/10 (30)
2	20±4	4.0	8/10 (80)	2,5±0,4	0/10 (0)
3	21±6	3.0	7/10 (70)	2,3±0,4*	0/10 (0)
4	24±5	3.0	7/10 (70)	2,1±0,2*	0/10 (0)
5	24±4	2,0	6/10 (60)	1,5±0,3*	0/10 (0)
6	21±6	3,0	8/10 (80)	1,8±0,2*	0/10 (0)

Продовження таблиці 2

7	28±5*	2,0	6/10 (60)	1,2±0,2*	0/10 (0)
8	18±5	4.0	7/10 (70)	2,8±0,4	0/10 (0)
9	16±8	5,0	6/10 (60)	3,1±0,5	1/10 (10)
Морські свинки					
1	16±6	5,0	9/10 (90)	3,4±0,5	2/10 (20)
2	18±4	3,5	7/11 (64)	2,25±0,4*	0/11 (0)
3	21±5	2,0	5/10 (50)	1,5±0,3*	0/10 (0)
7	27±4*	2,0	4/9 (44)	1,3±0,2*	0/10 (0)

\* - статистична різниця достовірна ( $p < 0.05$ ) порівняно з контролем.

Приклад 2. Оцінюють ефект впливу двох варіантів засобу, що заявляється, (варіанти 1 і 2) на зазначені метаболічні порушення порівняно з впливом вітаміну D<sub>3</sub>.

Досліди проводять на щурах на 21-у д.п.і. Тварини 1-ої групи -неімунізовані інтактні тварини, з якими порівнюють імунізованих тварин за зазначеними показниками. Імунізованих тварин розподіляють на чотири групи (групи 2-5), з яких 2-у групу складають тварини, що отримують фізіологічний розчин (контроль), тварини 3-ої групи отримують вітамін D<sub>3</sub> у дозі 5 мкг/кг маси тіла, тварини 4-ої групи отримують засіб, що заявляється, (варіант 2) і в 5-й групі тварини отримують засіб, що заявляється, (варіант 1). Відповідну дієту починають застосовувати з 8-ої д.п.і.

Результати лікувальної дії двох варіантів (1 і 2) засобу наведено на фіг. 1-6. За розвитку EAE відбувається порушення процесів ПОЛ (фіг. 1) та функціональної активності мітохондрій у клітинах мозку (фіг 2-4).

У мітохондріях мозку тварин за EAE спостерігається суттєве зниження рівня ЗСП N-2 (фіг. 2) та убісеміхінону (фіг. 4) та підвищення - НКЗ (фіг. 3), що свідчить про ушкодження мембранних і субмембранних структур, мітохондріального ЕТЛ, роз'єднання клітинного дихання з окислювальним фосфорилуванням та про істотну роль активних форм нітрогену в ушкодженні ЕТЛ мітохондрій мозку. За умов EAE при цьому спостерігається істотне зниження рівня цитохрому P450 в тканині мозку (фіг. 5) і в печінці (фіг. 6), що свідчить про порушення редокс-стану і функціональної здатності детоксикаційних і біотрансформуючих систем ендоплазматичного ретикулуму в цих тканинах тварин.

Доповнення раціону тварин композицією вітамінів і мінеральних речовин, що є компонентами засобу, ефективно запобігає розвитку дисфункції мітохондрій мозку (фіг. 2-4).

Особливою ефективністю відзначається 2-й варіант засобу, що заявляється, з максимальними дозами її компонентів, однак і застосування менших доз ефективно усуває зниження рівня ЗСП N2 (фіг. 2) та убісеміхінону в мозку (фіг. 4), сприяючи нормалізації ЛТЕ мітохондрій і виявляючи тим самим антиоксидантний, антиапоптичний, протекторний ефект на клітини головного мозку щурів в умовах EAE. Засіб, що заявляється, при цьому ефективно запобігає порушенню процесів ПОЛ у мозку (фіг. 1) та зниженню рівня цитохрому P450 у печінці (фіг. 6) та мозку щурів (фіг. 5), зумовлюючи нормалізацію ланцюга транспорту електронів в ендоплазматичному ретикулумі клітин і сприяючи відновленню його функціональної здатності. Вітамін D<sub>3</sub>, який при цьому застосовано окремо, впливає на компоненти ЛТЕ мітохондрій, особливо убісеміхінону, однак його ефект у запобіганні ушкодженню ЗСП N-2 незначний, зокрема, він не запобігає утворенню НКЗ, на відміну від комплексного застосування БАР у засобі, що заявляється.

Для профілактики рецидивів РС доцільним є тривале використання менших доз засобу, що заявляється, в межах діапазону рекомендованих тут доз, в залежності від тривалості лікування, оскільки навіть мінімальні дози засобу достовірно знижують активність патологічного процесу. Це показано на прикладі 3.

Приклад 3. Лікувальну ефективність 1-го, 2-го і 3-го варіантів засобу, що заявляється, які відрізняються вмістом його компонентів, у регуляції процесів запалення у ЦНС та активності

аутоімунного процесу перевіряють на моделі ЕАЕ у щурів на 21-у д.п.і порівняно з дією вітаміну D<sub>3</sub> у відповідних дозах. Лікування проводять, починаючи з 8-ої доби після імунізації.

Імунізовані тварини розподіляють на 6 груп, з яких 1-а група контрольна (ЕАЕ), тварини 2-ої та 3-ої груп отримують вітамін D<sub>3</sub> у дозах відповідно 5 та 10 мкг на кг маси тіла, тварини 4-ої групи отримують варіант 3 засобу, що заявляється з мінімальним вмістом компонентів, тварини 5-ої групи – варіант 2 засобу, що заявляється, тварини 6-ої групи – варіант 1 засобу, що заявляється з максимальним вмістом компонентів.

Стан активації імунної системи та інтенсивність процесів аутоімунного запалення (мієлінотоксичну активність сироватки крові) в організмі щурів за умов ЕАЕ характеризують за рівнем циркулюючих специфічних аутоантитіл до протеїнів мієліну ЦНС, і зокрема, мієлінового основного протеїну (МОП), що є важливим специфічним критерієм (маркером) розвитку процесів демієлінізації. За аутоімунних захворювань рівень аутоантитіл, як відомо, корелює з рівнем прозапальних цитокінів та є відображенням активності та тяжкості патологічного процесу [2].

Застосування вітаміну D<sub>3</sub> на тлі розвитку захворювання ефективно сприяє зниженню рівня специфічних аутоантитіл у крові щурів на 21-у добу ЕАЕ, знижуючи при цьому рівень антитіл, як до МОП, так і до інших компонентів мієліну (фіг. 7-8).

При цьому застосування вітаміну D<sub>3</sub> в дозі 10 мкг/кг відзначається більшою ефективністю порівняно з дозою 5 мкг/кг. Ефективність 3-го варіанта засобу, що заявляється, з мінімальними дозами його компонентів є нижчою, але достовірно значущою. А ефективність засобу із дозою вітаміну D<sub>3</sub> 5 мкг/кг (варіант 2) не відрізняється статистично від окремого використання вітаміну D<sub>3</sub> у дозі 10 мкг/кг, а також застосування разом з вітаміном D<sub>3</sub> у дозі 10 мкг/кг інших компонентів у збільшених дозах (засіб, що заявляється, варіант 1) приводить до достовірного підвищення ефективності у зниженні процесів аутоімунного запалення порівняно з окремим застосуванням вітаміну D<sub>3</sub> у такій же дозі. Отже, показано можливість модулювати нейропротекторну та імуномодельючу дію вітаміну D<sub>3</sub> за умов ЕАЕ за допомогою комбінації ефективних доз БАР, що мають значення у розвитку патологічних змін в організмі за таких умов.

Таким чином, створено засіб для лікування й профілактики демієлінізаційних захворювань центральної нервової системи на основі БАР та мінералів, які є нормальними компонентами обміну речовин в організмі, що порушується за таких станів, і які, діючи на різні ділянки патологічних механізмів, проявляють синергічні протизапальні й нейропротекторні властивості.

Засіб, що заявляється, може бути виготовлений у вигляді порошкової суміші або гранульованої суміші, або таблетки, або капсули, або драже.

Спосіб лікування й профілактики демієлінізаційних захворювань центральної нервової системи полягає в застосуванні засобу, що заявляється, шляхом введення його per os 1 раз на добу в підібраних оптимально ефективних дозах, збалансованих для компенсації метаболічних порушень у хворих на демієлінізаційні захворювання, зокрема розсіяний склероз. Застосування способу лікування, що заявляється, призупиняє/сповільнює розвиток демієлінізаційних та нейродегенеративних змін у ЦНС, знижує ризик рецидивів й ускладнень та побічних ефектів при лікуванні й профілактиці демієлінізаційних захворювань що мають аутоімунні механізми розвитку та характеризуються розвитком оксидативного стресу та дисфункції мітохондрій клітин ЦНС, зокрема розсіяного склерозу.

Джерела інформації:

1. Пономарев В.В. Демиелинизирующие заболевания нервной системы: клиника, диагностика и современные технологии лечения //Медицинские новости. 2002. № 6. С. 3-7.
2. Филиппович Н.Ф., Филиппович А.Н., Лучко В.П. Оценка активности демиелинизации, дифференцированная терапия и реабилитация больных рассеянным склерозом. Методические рекомендации /Минск. 2000. 28 с.
3. Марков Д.А., Леонович А.Л. /Рассеянный склероз. /М.: Медицина, 1976.
4. Штибель В.Г. /Стан антиоксидантного захисту у хворих на розсіяний склероз та його медикаментозна корекція. Автореф. дис. ...канд. мед. наук. Київ. 2001.20 с.
5. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. //Chem Biol Interact. 2006. - Vol. 163, № 1-2. - P. 94-112.
6. Moccigiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M. Brain, aging and neurodegeneration: Role of zinc ion availability //Progress in Neurobiology. 2005. 75. Is 6. P. 367-390.
7. Noseworthy, JH, "Immunosuppressive therapy in multiple sclerosis: pros. And cons" //International MS Journal 1:79-89, 1994.
8. Hristov I.D. Pat. WO2002034199. Medicine intended for treatment of multiple sclerosis/02.05.2002.

9. Panitch H. et al, Journal of the Neurological Sciences 2005; 239(1):67-74.
10. Deluca H.F., Hayes C.E., Cantorna M.T. Multiple sclerosis treatment /Pat. EP0880350/20.12.1998.
11. Einer, HL, et al., Science 259:134, 1993.
- 5 12. Bourdette, DN, і снівавт., J. Immunol.152: 2510,1994.
13. Gaur, A., et al., Science 258:1491, 1992.
14. Van Noort, JM, et al., Nature 375:798, 1995.
15. Lehmann, etal., Nature 358:155, 1992.
16. Hayes C.E., Derks R.A., Nashold F.E. Method of treating multiple sclerosis by administering pulse dose calcitriol /Pat. WO2009097614 / 06.08.2009.
- 10 17. Jonson K.P., Brooks B.R., Cohen J.A. et. al. Copolimer-1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. //Neurology. 1995. 45. P. 1268-1276.
18. Одинак М.М., Бисага Г.Н., Зарубина И.В. Новые подходы к антиоксидантной терапии при рассеянном склерозе. //Журн. Неврологи и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спец. Выпуск 1, 2002. Рассеянный склероз-приложение к журн., 18. Herrera L., Barbax C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. //J. Phisiol. Biochem. 2001. 57. 1. 43-56.
- 15 19. Ахмеджанова Л.Т., Солоха О.А., Строков И.А. Витамин группы В в лечении неврологических заболеваний. РМЖ 2009; 17(11): 776-83.
- 20 20. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. //Chem Biol Interact. 2006. - Vol. 163, № 1-2. - P. 94-112.
21. Beelke Manolo; (IT). Dauvillier Jerome; (CH). Guilleret Isabelle; (CH). Monnet Emmanuel; (FR) Combination treatment of multiple sclerosis. Patent number: WO2012022740 23.02.2012.
- 25 22. Huatan H. Vitamin D composition. /Pat. WO2012117236 /07.09.2012.
23. Fu et al, //Clin Biochem 2009. 42. (10-11): 1174-7. Epub 2009 May 18.
24. Kroncke, K. D., Klotz, L. O., Suschek, C V., and Sies, H. //J. Biol. Chem. 2002, 277, 13294-13301.
25. Pantzaris M. (CY), Patrikios I. (CY), Loukaidis G. (CY) Composition for the treatment of neurologic disorders. /Pat. WO2012131493 / 04.10.2012.
- 30 26. Garcion, E., Wion-Barbot, N., Montero-Menei, C. N., Berger, F., and Wion, D. //Tr. Endocrinol. Metab. 2002, 13, 100-105.
27. Hiremath et al. //Multiple Sclerosis. 2009, 15: 735-740.
28. Cornet, A., Baudet, C, Neveu, I., BaronJVan Evercooren, A., Brachet, P., and Naveilhan, P. //J. Neurosci. Res. 1999. 53, 742-746.
- 35 29. Shinpo, K., Kikuchi, S., Sasaki, H., Moriwaka, F., and Tashiro, K. //J. Neurosci. Res. 2000, 62, 374-382.
30. Ibi, M., Sawada, H., Nakanishi, M., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Shimohama, S., and Akaike, A. //Neuropharmacol. 2001, 40, 761-771.
- 40 31. Garcion, E., Sindji, L., Nataf, S., Brachet, P., Darcy, F., and Montero-Menei, C. N. //Acta Neuropathol. 2003,105, 438-448.
32. Bemiss, C.J., Mahon, B.D., Henry, A., Weaver, V., and Cantorna, M. T. //Arch. Biochem. Biophys. 2002, 402, 249-254.
33. Garcion, E., Sindji, L., Nataf, S., Brachet, P., Darcy, F., and Montero-Menei, C. N. //Acta Neuropathol. 2003, 105, 438-448.
- 45 34. Kalueff A.V., Eremin K.O., and Tuohimaa P. Mechanisms of Neuroprotective Action of Vitamin D<sub>3</sub> //Biochemistry (Moscow), Vol. 69, No. 7, 2004, pp. 738-741.
35. Lemire JM & Archer DC (1991) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. //Journal of Clinical Investigation 87, 1103-1107.
- 50 36. Hathcock соавт. Am J Clin Nutr 2007, 85:6-18; Vieth R., Am J Clin Nutr 1999, 69:842-856.
37. Maalouf J., Nabulsi M., Vieth R., et al. Short-and Long-Term Safety of Weekly High-Dose Vitamin D<sub>3</sub> Supplementation in School Children //J Clin Endocrinol Metab. 2008, 93(7): 2693-2701.,
38. Burton JM, Kimball S, Vieth R, Bar-Or A, Dosch HM, Cheung R, Gagne D, D'Souza C, Ursell M, O'Connor P. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D<sub>3</sub> and calcium in multiple sclerosis. //Neurology. 2010; 13 (23): 1852-1859.
- 55 39. Апуховська Л.І., Великий М.М., Потоцька О.Ю., Хоменко А.В. Роль вітаміну Е в регуляції гідроксилювання холекальциферолу за D-гіповітамінозу та D-гіпервітамінозу. //Укр. біохім. журн., 2009, 81, № 5. С. 50-57.
40. Azzi A., Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. //Prog. Lipid Res. 2000. 39.№ 3.P.231-255.



41. Todd Penberthy W. and Tsunoda Ikuo. The Importance of NAD in Multiple Sclerosis. //Curr Pharm Des. 2009. 15. N1. P. 64-99.
42. Пасічна Е.П., Морозова Р.П. Вплив нікотинаміду та його комплексу з вітамінами В<sub>1</sub> В<sub>2</sub> та В<sub>6</sub> на розвиток метаболічних порушень за умов експериментального аутоімунного енцефаломієліту //Матеріали І Наукової конференції молодих вчених з міжнародною участю 19-20 травня 2010 г.; ВН МУ ім. М.І. Пирогова, Вінниця: 2010. - С. 62-63.
43. Witte ME, Geurts JJ, de Vries HE, et al. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? //Mitochondrion. 2010. - Vol. 10,5. - 411-8.
44. Murphy MP How mitochondria produce reactive oxygen species. //Biochem J. 2009. - Vol. 417, № 1. - P. 1-13.
45. Dhanasekaran M, Ren J. The emerging role of coenzyme Q-10 in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus //Curr Neurovasc Res. 2005. - Vol. 2, № 5. - P. 447-59.
46. Zhao G., Etherton T.D., Martin K.R., et al. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. //American Journal of Clinical Nutrition, 2007, 85, N.2, 385-391.
47. Huang V. Thiamine and Oxidants Interact to Modify Cellular Calcium Stores. //Neurochem. 2010. P. 2107-2116.
48. Gianazza E., Vergani L., Wait R., et. al. Coordinated and reversible reduction of enzymes involved in terminal oxidative metabolism in skeletal muscle mitochondria from a riboflavin-responsive, multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency patient. // Electrophoresis. 2006.27. P. 1182-1198.
49. Peter T. B<sub>6</sub>-responsive disorders: A model of vitamin dependency / Peter T. Clayton //J Inherit Metab Dis. 2006.29. P. 317-326.
50. Нейрохимия. /под ред. Ашмарина И.П. и Стукалова П.В. /Москва: Изд. Институт биомедицинской химии РАМН, 1996, 470 с.
51. Takeda A. Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. // Biometals. 2001. 14(3-4). P. 343-351.
52. Pfeiffer CC, Braverman ER. Zinc, the brain and behavior. //Biol. Psychiatry. 1982. 17(4). P. 513-532.
53. Bitanhirwe BK, Cunningham MG. Zinc: the brain's dark horse. //Synapse. 2009; 63(11): 1029-1049.
54. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. //Ann. Neurol. 2003; 53: 26-36.
55. Evans GW, Johnson EC. Growth Stimulating Effect of Picolinic Acid added to Rat Diets. //Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1980; 165:457.
56. Fu, Y. Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat /Y. Fu, W.H. Cheng, D.A. Ross, X. Lei //Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1999. 222. P. 164-169.
57. Surai. P.F. Selenium in Nutrition and Health /Nottingham University Press. Nottingham, 2006. 974 p.
58. Серебряная Н.Б., Карпенко М.Н., Житнухин Ю.Л., Бисага Г.Н., Абдурасулова И.А. Исследование протективного действия препарата ферровир при остром экспериментальном аллергическом энцефаломиелите. //Цитокины и воспаление. 2010. 9. № 1. С. 33-38.
59. Clayton JP, Gammon GM, Ando DG et al. Peptide-specific prevention of experimental allergic encephalomyelitis. Neonatal tolerance induced to the dominant T cell determinant of myelin basic protein. //J Exp Med. 1989, 169 (5): 1681-91.
60. Давыдова Г.С, Пашковская М.И. К характеристике хронического экспериментального аллергического энцефаломиелита (иммунологические и электронномикроскопические исследования). //Ж. Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 1973. 73. 7. с. 994-1002.
61. Cecchini O. Function and structure of complex II of the respiratory chain //Ann. Rev. Biochem. - 2003. - Vol. 72. - P. 77-109.
62. Lenaz G., Fato R., Geroва M.L. et. al. Mitochondrial Complex I: structural and function aspects //Biochim. Biophys. Acta. 2006. - № 9-10. - P. 1406-1420.
63. Clayton JP, Gammon GM, Ando DG et al. Peptide-specific prevention of experimental allergic encephalomyelitis. Neonatal tolerance induced to the dominant T cell determinant of myelin basic protein. //J Exp Med. 1989, 169 (5): 1681-91.
64. Karlsson J.O., Ostwald K., Kabjorn C, Andersson M. //Anal. Biochem. - 1996. - 219, N 1. - P. 144-146.
65. Современные методы в биохимии. /Под ред. В.Н. Ореховича. - М.: "Медицина", 1977. - 392 с.

66. Бурлака А.П., Сидорик Є.П., Ганусевич І.І. и др. //Новоутворення. Науково-практичний журнал Донецького обласного протипухлинного Центра. - 2009. - № 3-4. - С. 247-253.  
67. Лакин Г.Ф. Биометрия. М. /Высшая школа. 1990. 352 с.

5

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

10

1. Засіб для лікування й профілактики демієлінізаційних захворювань центральної нервової системи, зокрема розсіяного склерозу, що містить вітамін D<sub>3</sub>, вітамін E, вітаміни групи B - B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, мінерали Zn та Se, який **відрізняється** тим, що додатково містить нікотинамід, α-ліпоєву кислоту, α-ліноленову кислоту та мінерал Mg.

2. Засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що дози компонентів (мг/кг маси тіла тварини на добу) складають:

вітамін D <sub>3</sub>	0,001-0,01
вітамін B <sub>1</sub>	1,0-5,0
вітамін B <sub>2</sub>	1,0-2,5
вітамін B <sub>6</sub>	1,5-3,5
вітамін E	1,5-12,0
нікотинамід	1,5-6,5
α-ліпоєва кислота	2,5-10,0
α-ліноленова кислота	100,0-1000,0
магнію хлорид, у перерахунку на Mg <sup>2+</sup>	2,0-10,0
цинку хлорид, у перерахунку на Zn <sup>2+</sup>	0,2-1,5
натрію селеніт, у перерахунку на Se <sup>4+</sup>	0,002-0,01.

15

3. Спосіб лікування й профілактики демієлінізаційних захворювань центральної і периферійної нервової системи, який **відрізняється** тим, що застосовують засіб за п. 1 шляхом введення його per os 1 раз на добу.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що лікувальні дози засобу (мг/кг маси тварини) складають:

вітамін D <sub>3</sub>	0,005-0,01
вітамін B <sub>1</sub>	1,25-5,0
вітамін B <sub>2</sub>	1,2-2,5
вітамін B <sub>6</sub>	1,5-3,5
вітамін E	6,5-12,0
нікотинамід	3,5-6,5
α-ліпоєва кислота	2,5-10,0
α-ліноленова кислота	500,0-1000,0
магнію хлорид, у перерахунку на Mg <sup>2+</sup>	5,0-10,0
цинку хлорид, у перерахунку на Zn <sup>2+</sup>	0,7-1,5
натрію селеніт, у перерахунку на Se <sup>4+</sup>	0,005-0,01.

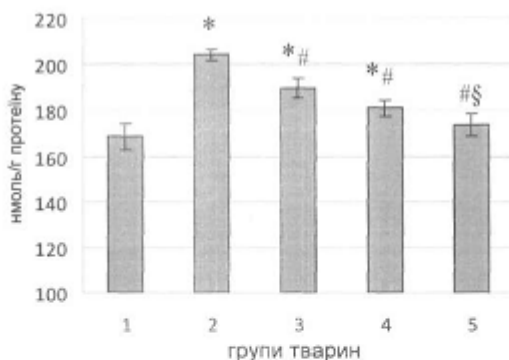
5. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що профілактичні дози засобу (мг/кг маси тварини) складають:

вітамін D <sub>3</sub>	0,001-0,005
вітамін B <sub>1</sub>	1,0-1,25
вітамін B <sub>2</sub>	1,0-1,2
вітамін B <sub>6</sub>	1,5-3,5
вітамін E	1,5-6,5
нікотинамід	1,5-3,5
α-ліпоєва кислота	2,5-5,0
α-ліноленова кислота	100,0-500,0
магнію хлорид, у перерахунку на Mg <sup>2+</sup>	2,0-5,0
цинку хлорид, у перерахунку на Zn <sup>2+</sup>	0,2-0,7

20

натрію селеніт, у  
перерахунку на  $\text{Se}^{4+}$

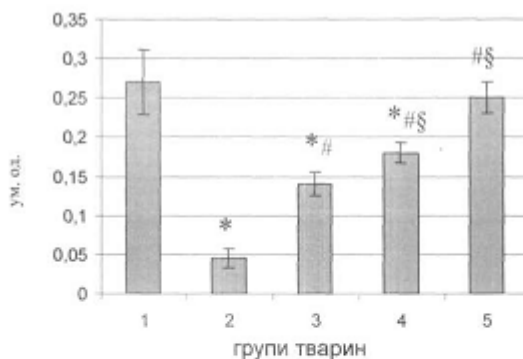
0,002-0,005.



Рівень ТБК-активних продуктів у мозку щурів на 21-у добу розвитку EAE за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - інтактні тварини; 2 - EAE; 3 - EAE+D<sub>3</sub>; 4 - EAE + засіб (варіант 2); 5 - EAE + засіб (варіант 1); (M±m, n=30).

\* - достовірні зміни відносно інтактних тварин, # - достовірні зміни відносно контрольних тварин, \$ - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub>.

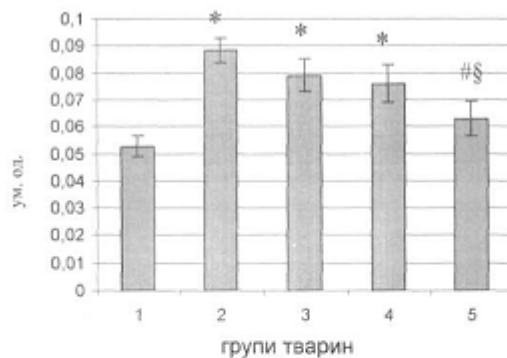
Фіг. 1



Рівень залізо-сірчаних протеїнів N-2 у мозку щурів на 21-у добу розвитку EAE за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - інтактні тварини; 2 - EAE розвитку; 3 - EAE+D<sub>3</sub>; 4 - EAE + засіб (варіант 2); 5 - EAE + засіб (варіант 1); M±m, n=10, p<0,05.

\* - достовірні зміни відносно інтактних тварин, # - достовірні зміни відносно контрольних тварин, \$ - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub>.

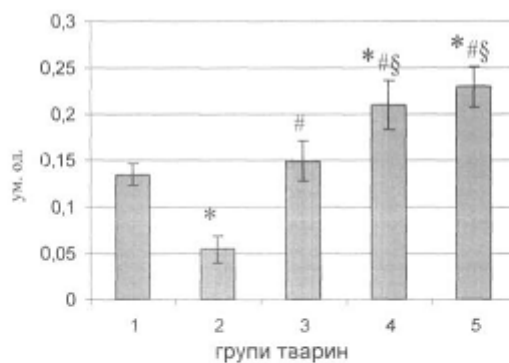
Фіг. 2



Рівень нітрозильних комплексів заліза у мозку щурів на 21-у добу розвитку EAE за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - інтактні тварини; 2 - EAE розвитку; 3 - EAE+D<sub>3</sub>; 4 - EAE+ засіб (варіант 2); 5 - EAE + засіб (варіант 1);  $M \pm m$ ,  $n=10$ ,  $p<0,05$ .

\* - достовірні зміни відносно інтактних тварин, # - достовірні зміни відносно контрольних тварин, § - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub>.

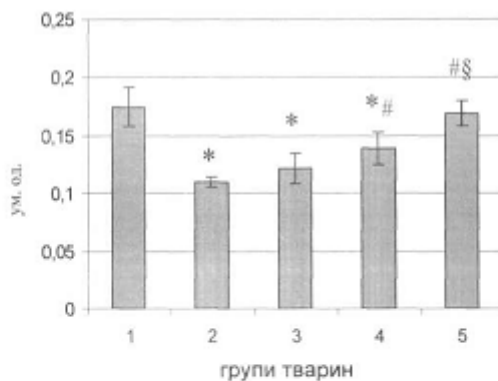
Фіг. 3



Рівень убісемініону у мозку щурів на 21-у добу розвитку EAE за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - інтактні тварини; 2 - EAE; 3 - EAE+D<sub>3</sub>; 4 - EAE + засіб (варіант 2); 5 - EAE + засіб (варіант 1);  $M \pm m$ ,  $n=10$ ,  $p<0,05$ .

\* - достовірні зміни відносно інтактних тварин, # - достовірні зміни відносно контрольних тварин, § - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub>.

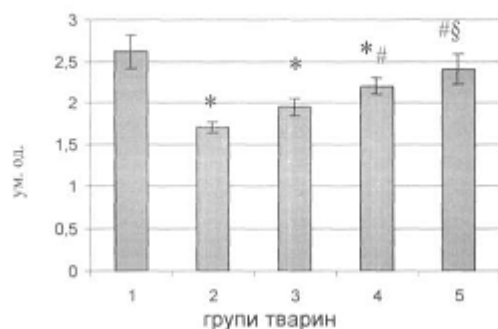
Фіг. 4



Рівень цитохрому P450 у мозку щурів на 21-у добу розвитку EAE за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - інтактні тварини; 2 - EAE; 3 - EAE+D<sub>3</sub>; 4 - EAE + засіб (варіант 2), 5 - EAE + засіб (варіант 1);  $M \pm m$ ,  $n=10$ ,  $p<0,05$ .

\* - достовірні зміни відносно інтактних тварин, # - достовірні зміни відносно контрольних тварин, § - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub>.

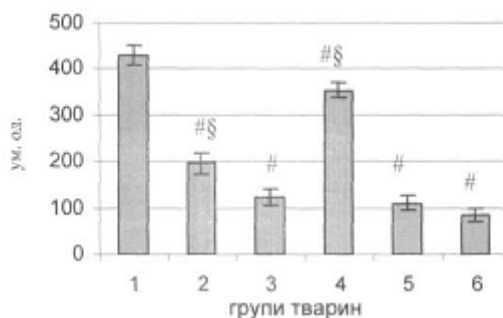
Фіг. 5



Рівень цитохрому P450 у печінці щурів на 21-у добу розвитку EAE за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - інтактні тварини; 2 - EAE; 3 - EAE+D<sub>3</sub>; 4 - EAE + засіб (варіант 2), 5 - EAE + засіб (варіант 1);  $M \pm m$ ,  $n=10$ ,  $p<0,05$ .

\* - достовірні зміни відносно інтактних тварин, # - достовірні зміни відносно контрольних тварин, § - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub>.

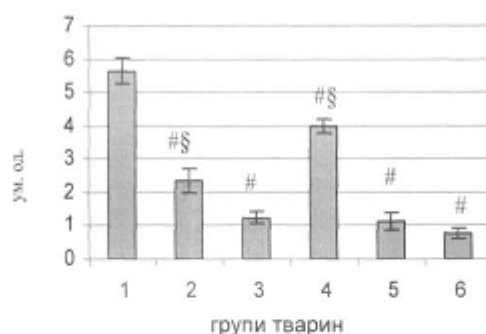
Фіг. 6



**Мієлінотоксична активність сироватки крові щурів на 21-у добу розвитку ЕАЕ за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - ЕАЕ; 2 - ЕАЕ+D<sub>3</sub> (5 мкг/кг), 3 - ЕАЕ+D<sub>3</sub> (10 мкг/кг) 4 - ЕАЕ + засіб (варіант 3); 5 - ЕАЕ + засіб (варіант 2); 6 - ; ЕАЕ+ засіб (варіант 1); M±m, n=5-10, p<0,05.**

**# - достовірні зміни відносно хворих тварин без лікування, § - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub> (10 мкг/кг).**

**Фіг. 7**



**Рівень антитіл до основного протешу мієліну в сироватці крові щурів на 21-у добу розвитку ЕАЕ за дії засобу, що заявляється. Групи тварин: 1 - ЕАЕ; 2 - ЕАЕ+D<sub>3</sub> (5 мкг/кг), 3 - ЕАЕ+D<sub>3</sub> (10 мкг/кг) 4 - ЕАЕ + засіб (варіант 3); 5 - ЕАЕ + засіб (варіант 2); 6 - ; ЕАЕ + засіб (варіант 1); M±m, n=5-10, p<0,05.**

**# - достовірні зміни відносно хворих тварин без лікування, § - достовірні зміни відносно лікування вітаміном D<sub>3</sub> (10 мкг/кг).**

**Фіг. 8**