



УКРАЇНА

(19) UA (11) 31464 (13) C2

(51) 6 A61K31/00,31/51,31/525,  
33/00,33/26,33/30,33/32,33/34МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МІКРОЕЛЕМЕНТНО-ВІТАМІННА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА МАЄ АНТИСТРЕСОРНУ АКТИВНІСТЬ ТА ЗДАТНІСТЬ ДО ПІДВИЩЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ

1

2

(21) 98094763

(22) 09.09.1998

(24) 15.05.2002

(46) 15.05.2002, Бюл. № 5, 2002 р.

(72) Григор'єва Ганна Савівна, Конахович Наталія Філімонівна, Киричок Лора Михайлівна, Мохорт Микола Антонович, Стефанов Олександр Вікторович, Штейнгарт Марк Володимирович, Гончаров Микола Іванович, Скакун Нонна Миколаївна, Даневич Олександр Ілліч, Бородин Лариса Олександрівна, Кожакіна Інґа Петрівна, Бакал Лариса Вікторівна, Кирей Зоя Миколаєвна

(73) Інститут фармакології та токсикології Академії медичних наук України

(56) А. С. СССР № 1374483, кл. А61К 31/00 (приор. 26.01.82) Средство для профилактики атеросклероза "Компливит"/Ю.Ф.Удалов, Т.Ш.Шарманов, О.П.Белозерова и др.

Машковский М.Д. Лекарственные средства. В 2-х томах, изд. 13-е/Харьков, Торсинг.-1997.

Справочник Видаль 1998. Лекарственные препараты в России/М., АстраФармСервис.-1998.

(57) Мікроелементно-вітамінна композиція, яка має антистресорну активність та здатність до

підвищення резистентності організму, що містить тіаміну хлорид, рибофлавін, нікотинамід, кальцію пантотенат, піридоксину гідрохлорид і іони заліза(III), цинку (II), марганцю (II), міді (II) та кобальту (II) в присутності відомих допоміжних речовин, яка **відрізняється** тим, що вона додатково містить іон хрому (III) і N-2,3-диметилфенілантранілат іон у вигляді його комплексів з іонами введених металів при наступному співвідношенні компонентів, мас. ч.:

Тіаміну хлорид	1,5-2,5
Рибофлавін	0,8-1,2
Нікотинамід	6,0-9,0
Кальцію пантотенат	6,0-9,0
Піридоксину гідрохлорид	0,8-1,2
Іон заліза(III)	0,50-0,65
Іон цинку (II)	0,30-0,68
Іон марганцю (II)	0,06-0,16
Іон міді (II)	0,07-0,15
Іон кобальту (II)	0,007-0,014
Іон хрому(III)	0,006-0,012
N-2,3-диметилфенілантранілат іон	11,80-16,50.

Винахід стосується нового лікарського засобу, а саме - композиції певних співвідношень іонів металів мікроелементів (Fe(III), Zn(II), Mn(II), Cu(II), Co(II), Cr(III)) і N-2,3-диметилфенілантранілової кислоти у вигляді їх комплексів, а також вітамінів групи В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>) у присутності відомих допоміжних речовин, яка має антистресорну активність та здатність до підвищення резистентності організму, і призначений для використання у фармації й медицині.

Доцільність створення нових засобів фармакологічної корекції реакцій організму на стреси та перенавантаження обумовлена актуальністю проблеми спрямованої регуляції наслідків таких реакцій та підвищення «якості життя» в умовах реального впливу негативних факторів середовища існування людини (психо-фізичних, екологічних, дієтних, катастрофальних та ін.).

Відповідно до обґрунтування значущості металів-мікроелементів і вітамінів в регуляції гомеостазу, запропоновано застосування для корекції порушень останнього при стрес-реакціях мікроелементно-вітамінних композицій, як основи низки фармакологічних агентів. Серед таких включені до фармакопей та реєстрів лікарських засобів різних країн відомі об'єкти фармацевтичного ринку: колекції Юнікап (Upjohn, США), Таксофіт (Klosterfrau, Німеччина), Енізіл, Малтіньютріент (Prescribing Biochem. Ltd, Австралія), Аміновіт, Максавіт, Мегавіт (Dali Pharm., Австралія), Мульгатол, Біовітал (Rhone-Poulenc, Франція), Супраділ (La Roche, Швейцарія), Мульти-табс (Ferrospan, Данія), Комплівіт (Уфімський вітамінний завод, Росія).

Разом з тим, відомі мікроелементно-вітамінні засоби не обумовлюють нормалізацію діапазону показників гомеостазу, які є патологічне зміненими

(13) C2

(11) 31464

(19) UA

при стресах різної етнології. Ці агенти дозволяють часткову компенсацію мінерально-вітамінної недостатності, але мало відповідають регуляції тонких механізмів наслідку стресу, коли реакція організму впливає вже як патогенний фактор.

Недоліки відомих мікроелементно-вітамінних агентів, поруч із інколи невинновдано розширеним компонентним складом (що підвищує складність їх одержання), пов'язані, в першу чергу, із невідповідною фармакологічною якістю внаслідок традиційного введення мікроелементів у вигляді тривіальних простих солей або оксидів. Тим самим, склад відомих композицій не враховує характерні для останніх сполук негативні фізико-хімічні та фізіологічні прояви (ліпофобність та низька проникливість крізь мембрани, прооксидантні прояви, висока токсичність, нераціональна біодоступність - до 20% від введеної кількості та ін.)

За прототип цього винаходу обрано мікроелементно-полівітамінний засіб «Комплівіт», склад якого відповідає наступному співвідношенню компонентів (мас.ч.):

Ретинола ацетат	1,135 - 1,476
Кальцію пантотенат	5,0 - 6,5
Кислота аскорбінова	50 - 55
Кислота ліпоева	2,0 - 2,4
Кислота фолієва	0,1 - 0,12
Нікотинамід	7,5 - 8,25
Піридоксину гідрохлорид	5,0 - 5,5
Рібофлавін мононуклеотид	1,27 - 1,40
Рутин	25,0 - 27,5
Тіаміну хлорид	1,0 - 1,3
α-токоферолу ацетат	10 - 11
Ціанокобаламін	0,0125 - 0,0163
Іон заліза(II) (за рахунок заліза сірчаноокислого семиводного)	5,0 - 5,5 (24,89 - 27,40)
Іон цинку (II) (за рахунок цинку сірчаноокислого семиводного)	2,0 - 2,2 (8,795 - 9,676)
Іон марганцю (II) (за рахунок марганцю сірчаноокислого п'ятиводного)	2,5 - 2,75 (10,96 - 12,06)
Іон міді (II) (за рахунок міді сірчаноокислої п'ятиводної)	0,75 - 0,825 (2,946 - 3,241)
Іон кобальту(II) (за рахунок кобальту сірчаноокислого семиводного)	0,1 - 0,11 (0,477 - 0,5247)
Кальцію фосфат	217,0 - 238,7
Магній фосфорнокислий двозаміщений	117,6 - 129,4
Магнію карбонат основний	72,2 - 79,42

Комплівіт зареєстрований як лікарський засіб (ТФС 42 1673-86), який має здатність до компенсації мінерально-вітамінної недостатності та підвищення резистентності організму, і обраний прототипом заявляемого об'єкту як найбільш близький його аналог за сумою ознак, а саме:

суттєвою близькістю природи йонно-мікроелементної компоненти (заліза, цинку, марганцю, міді);

близькістю якісного складу за певними вітамінними інгредієнтами (кальцію пантотенат, нікотинамід, піридоксину гідрохлорид, рібофлавін, тіаміну і хлорид);

специфікою фармакологічної активності.

Фармакологічна активність прототипу - Комплівіта забезпечується включенням до його складу надзвичайно широкого числа інгредієнтів: 12-и вітамінів, 2-х солей магнію й кальцію, 5-й солей мікроелементів. В такому складі відбувається дублювання деяких діючих елементів: магнію - в фосфаті й основному карбонаті; кобальту - у складі вітаміну В<sub>12</sub> та сульфата. Останній факт відображає неоптимальну біодоступність мікроелементів у вигляді простих солей. Цей недолік поширюється й на інші метали, наслідком чого є завищений вміст їх іонів у складі прототипу, а також пов'язана з нефективним метаболізмом мікроелементів потреба в підвищеному вмісті вітамінів.

Відзначений розширений склад та високий кількісний вміст інгредієнтів Комплівіту здатні обумовити також відносно зниження його нешкідливості з точки зору вимог до сучасних антистресорних засобів. Перш за все, це пов'язане з невідповідністю складу прототипу принципу мінімізації вмісту заліза в зв'язку із відомою кардіотоксичністю надлишку заліза, а саме - накопиченням заліза в м'язових волокнах міокарда, детермінованим стресом (т.з. гістохімічна реакція Перлса). Досить високий вміст заліза в Комплівіті обмежує його відповідність фізіологічним наслідкам стресу, коли априорно необхідне тривале вживання лікарського агента створює додатковий «залізообумовлений» серцевий дискомфорт. Ці фактори обмежують контингент споживачів препарату.

Відзначені недоліки знижують ефективність композиції препарату за прототипом, маючи на увазі рівень його активності як фармакологічного, в першу чергу - антистресорного, агента та ареал його лікувально-профілактичної застосовності.

Задачею винаходу є підвищення рівня антистресорної активності та здатності до підвищення резистентності організму мікроелементно-вітамінним засобом. який виявляє ці ефекти та має високу нешкідливість.

Реалізація цієї задачі досягається запропонованою композицією, яка містить 5 вітамінів - В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>, а також йони металів мікроелементів (Fe(III), Zn(II), Mn(II), Cu(II), Co(II), Cr(III)) і N-2,3-діметилфенілантранилової кислоти у вигляді комплексів останньої із введеними металами. Включення мікроелементної компоненти композиції в комплекси з N-2,3-діметилфенілантраниловою кислотою (субстанція препарату «мефенамінова кислота», далі HL), є фактором, що може забезпечити вирішення задачі винаходу.

В літературі не відомі засоби на основі композиції вітамінів, йонів мікроелементів і N-2,3-діметилфенілантранилової кислоти. Відповідно, немає відомостей про фармакологічні властивості таких композицій та їх можливі переваги в плані антистресорно-прорезистентних ефектів.

Для коректної оцінки рівня фармакологічної активності заявляемого!" композиції відповідно сучасному рівню в цій галузі як аналог (об'єкт порівняння), поруч з прототипом, використаний лікарський засіб «Юнікап-М» - усталений об'єкт фармацевтичного ринку (Pharmacia & Upjohn, США) - комбінований препарат, який містить наступні кількості вітамінів, макро- й мікроелементів (мас.ч.):

ретинола ацетат	1,5
кальцію пантотенат	5
кислота аскорбінова	50
нікотинамід	20
піридоксину гідрохлорид	0,5
рібофлавін	2,5
тіаміну хлорид	2,5
ціанокобаламш	0,002
залізо (у формі фумарата)	10
кальцій (у формі карбоната)	3,5
магній (у формі оксиду)	6
марганець (у формі сульфата)	1
мідь (у формі сульфата)	1
йод (у формі калію йодиду)	0,15

Далі наводимо конкретні приклади створення композиції, що пропонується, та композиції-прототипу.

Приклад 1. Заявляємий об'єкт. В кристалізатор вміщують точну наважку 16,5г N-2,3-діметилфенілантранілової кислоти (0,067г-екв мефенаміно-вої кислоти фармакопейної), додають 90 мл водного розчину гідроксиду натрію, який містить 2,61г 98% NaOH (0,064г-екв) і перемішують до практично повного розчинення кислоти HL (в розчині може бути слабка опалесценція). До одержаного розчину одномоментно додають суміш 0,5М водних розчинів хлоридів металів: 20,7мл FeCl<sub>3</sub>(на 0,1 NHCl) (або 0,58г Fe<sup>3+</sup>); 20,9мл ZnCl<sub>2</sub>(на 0,02 NHCl) (або 0,68г Zn<sup>2+</sup>); 5,8мл MnCl<sub>2</sub> (або 0,16г Mn<sup>2+</sup>); 4,7мл CuCl<sub>2</sub> (або 0,15г Cu<sup>2+</sup>); 0,47мл CoCl<sub>2</sub> (або 0,014г Co<sup>2+</sup>) та 0,47мл CrCl<sub>3</sub> (або 0,012г Cr<sup>3+</sup>). Суміш перемішують протягом 20(±5)хв, після чого додають 25г крохмалю картопляного, знову перемішують до гомогенного стану. Одержану масу висушують при кімнатній температурі або в сушильній шафі при 80(±10)С° до остаточної вологості 5(±2)% і гранулюють просіюванням на сітці з діаметром отворів 1мм.

В просіану суміш безпосередньо вносять точні кількості вітамінів: В<sub>1</sub> (тіаміну хлорид) - 2,0г; В<sub>2</sub> (рібофлавін) - 1,0г; В<sub>3</sub> (нікотинамід) - 8,03г; В<sub>5</sub> (кальцію пантотенат) - 8,0; В<sub>6</sub> (піридоксину гідрохлорид) - 1,0г, а також допоміжні речовини: крохмаль картопляний - 29,5г; кальцій стеарат - 8,0г; лактоза (цукор молочний) - 1,0г; полівінілпірролідон - 0,2г; тальк - 2,0г.

Інгредієнти перемішують протягом 10(+2)хв та просіюють крізь сито з діаметром отворів 1 - 2мм.

Приклад 2. Заявляємий об'єкт. Цільовий продукт - композицію, одержану згідно із описом за прикладом №1, відомим способом поміщають в стандартні тверді желатинові капсули по 250мг/капсула (отримують 380 капсул). Відхилення за масою окремих капсул не перевищує ± 10%.

В прикладах 3 - 6 заявляємо композицію одержували, додержуючись методів та прийомів відповідно прикладу № 1, однак змінюючи співвідношення інгредієнтів. Зміни відображено в таблиці 1.

Цільовий продукт, який одержано за способом, що пропонується, є гранульованим порошком світло-сірого з фіолетовим відтінком кольору (з точковими жовтими вкрапленнями) в розсипу або в твердих желатинових капсулах (приклад № 2). Вихід продукту складає 98% (втрати тільки механічні);

Приклад 7. Прототип у фарфоровій ступці ретельно перемішують точні наважки вітамінів: С (кислота аскорбінова) - 50,0г, В<sub>1</sub> (тіаміну хлорид) - 0,4г, В<sub>6</sub> (піридоксину гідрохлорид) - 2,0г, Р (рутин) - 25,0г та 46,8г фосфата кальцію. Одержану суміш зволожують водним розчином, який містить 2,5% метилцелюлози (МЦ) і 5% полівініл піролідону (ПВП), гранулюють на сітці з діаметром отворів 1 - 2мм та висушують в сушильній шафі при 40 - 50°С до остаточної вологості 1(±0,5)%.

У фарфоровій ступці ретельно перемішують точні наважки вітамінів: В<sub>5</sub> (кальцію пантотенат) - 2,0г, В<sub>6</sub> (кислота фолієва) - 0,04г, В<sub>2</sub> (рібофлавін мононуклеотид) - 0,50г, а також ліпоевої кислоти - 0,8г та 40,0г фосфата кальцію. Одержану суміш зволожують тим же водним розчином, 2,5% МЦ і 5% ПВП, до якого попередньо внесено 4,0г вітаміну Е (α-токоферолу ацетат) у вигляді 98% розчину в олії (4,08г розчину). Вологу суміш гранулюють на сітці з діаметром отворів 1 - 2мм та висушують в сушильній шафі при 40 - 50°С до остаточної вологості 1(±0,5)%.

Сірчаноокислі солі металів: заліза (семиводного), цинку (семиводного), марганцю (п'ятиводного), міді (п'ягиводного), кобальту (семиводного) сушать в сушильній шафі при 90°С протягом 30хв та подрібнюють. Точні наважки цих сірчаноокислих солей металів: заліза - 9,956г; цинку - 3,518г; марганцю - 4,384г; міді - 1,178г; кобальту - 0,191г змішують з точною наважкою 47,04г двозаміщеного фосфата магнію та зволожують водним розчином, який містить 10% ПВП та 50% лимонної кислоти. Вологу суміш гранулюють на сітці з діаметром отворів 1 - 2мм та висушують в сушильній шафі при 70°С протягом 20 - 30хв.

Одержані три грануляти об'єднують, додають 0,454г вітаміну А (ретинол ацетат), 0,005г вітаміну В<sub>12</sub> тритурацією 1 : 100, крохмаль, тальк та пресують відомим методом таблетки середньої маси 0,57г. Таблетки покривають оболонкою відомим методом, наносячи при покритті 28,88г магнію карбоната основного.

Отримують 400 таблеток засобу Комплівіт - прототипу.

Для створення заявляємої композиції та прототипу використані фармакопейні вітаміни, мефенамінова кислота та допоміжні речовини, солі металів марки «ч.д.а».

Заявляема композиція, в цілому, не розчиняється ні у воді, ні в органічних розчинниках. Окремі ж інгредієнти композиції мають різну природу розчинності: вітаміни екстрагуються водою, а метали у вигляді комплексів з кислотою HL - органічними розчинниками. Тому якісну та кількісну ідентифікацію продукту, який одержано за прикладами № 1-6, проведено на підставі фізико-хімічних характеристик як самої композиції та продуктів її «мокрого озолення», так й її водного та органічного екстрактів, а також твердого залишку після екстрагування.

Для ідентифікації продукт попередньо розтирали у ступці (вміст капсул за прикладом № 2 перед цим вивільняли з оболонок). Вітаміни визначали у профільтованому водному екстракті з точної наважки розтертої композиції методом рідинної хроматографії. Реєстрували час удержання та площини відповідних піків на хроматограммах

використовуючи як стандарти порівняння розчини точних концентрацій індивідуальних фармакопейних вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>. Як рухоми фазу використовували суміш {(розчин літія хлорнокислого + розчин гептилсульфонату натрію) + метанол}, 9 : 1.

Визначення вмісту іонів металів проведено атомно-адсорбційним методом після «мокрого озолення» цільового продукту, його водних і діоксанових екстрактів та твердого залишку після екстрагування. Атомізація здійснювалась при температурі 2100 - 2500°C, а довжини хвиль детектування складали (нм): 243,3; 307,6; 279,5; 324,7; 240,7 та 357,9 для залізу, цинку, марганцю, міді, кобальту і хрому, відповідно. Для ідентифікації стану мікроелементів у вигляді комплексів з кислотою НL залучено незалежні спектральні методи. Якісний і кількісний аналіз вмісту аніону N-2,3-діметилфенілантранілової кислоти проведено УФ-спектроскопічним методом за характеристичним поглинанням екстракта цільового продукту у хлороформі при 282нм у порівнянні із стандартним розчином фармакопейної кислоти. Визначення іонів металів проведено на ААС Perkin-Elmer 3110, електронні спектри реєстрували на приладі Specord-Uv-VIS, спектри ЕПР - на приладі Varian-MX, ІЧ спектри - на приладі UR-20 (в -таблетках KBг).

Встановлено (таблиця 2) повний кількісний перехід усіх введених компонентів до цільового продукту при достовірному збереженні їх масового співвідношення відносно вихідного (крім води, що видаляється при висушуванні, та механічних втрат). Зберігається нативність вихідних вітамінів. Всі введені метали та аніон N-2,3-діметилфенілантранілової кислоти кількісно переходять до екстракту в хлороформі (не детектуються у водній витяжці та твердому залишку) без змін вихідного масового співвідношення і ступеню окислення та ідентифікуються у формі їх комплексів незалежними методами. Про існування в продукті таких комплексів свідчать:

стабільний інтенсивний коричнево-червоний колір його екстракту в хлороформі;

положення смуг у ІЧ спектрах композиції ( $\nu_{\text{COO}}^{\text{as}} = 1615\text{см}^{-1}$ ;  $\nu_{\text{COO}}^{\text{s}} = 1390\text{см}^{-1}$ ) та електронних спектрах (інтенсивна смуга при 565нм з плечем при 660 - 680нм - спектри відбиття композиції; 465нм - спектри поглинання діоксанового екстракту), характерне для індивідуальних комплексів металів з N-2,3-діметилфенілантраніловою кислотою та близьке, в цілому, для комплексів d-металів в кисневому оточенні октаедричного типу ;

спектри ЕПР заявляемого продукту й його діоксанового екстракта з g-факторами сигналів, характерними для парамагнітних октаедричних комплексів Fe(III), Mn(II), Cu(II), Co(II) та Cr(III) (суперпозиція g-факторів 4,0; 2,0; 2,2; 2,6) з кисеньовміщуючими лігандами , в тому числі - для індивідуальних комплексів металів з N-2,3-діметилфенілантраніловою кислотою.

Таким чином, заявляемий об'єкт є композицією обраних вітамінів (В<sub>1</sub> - тіаміну хлорид, В<sub>2</sub> - рібофлавін, В<sub>3</sub> - нікотинамід, В<sub>5</sub> - кальцію пантотенат, В<sub>6</sub> - піридоксину гідрохлорид), а також іонів металів Fe(Ш), Zn(ІІ), Mn(ІІ), Cu(ІІ), Co(ІІ), Cr(Ш) та аніону N-2,3-діметилфенілантранілової кислоти у вигляді

його комплексів з введеними металами в присутності відомих допоміжних речовин при масовому вмісті компонентів, яке вказано в таблиці 2.

Деякі фізико-хімічні характеристики продукту, який одержано при вихідних співвідношеннях компонентів, що відрізняються від таких у прикладах 1 - 4, зазнають певних змін. Конкретно, для прикладу №6 характерна присутність слідів металів у водному екстракті з цільового продукту та у твердому залишку після екстрагування з одночасним викривленням спектральних характеристик (уширення смуги 565нм в спектрі відбиття та сигналів в спектрі ЕПР, зменшення короткохвильового зсуву  $\nu_{\text{COO}}$  в ІЧ спектрі), а для прикладу №5 - присутність слідів вільної кислоти НL. Такі зміни дозволяють вважати, що вихід масових співвідношень інгредієнтів за межі параметрів, зазначених прикладами №1 - 4, призводить до існування в кінцевому продукті домішок гідроксолопуч металів з «неоктаедричною» будовою координаційної сфери або незв'язаної в комплекс кислоти НL. Вміщення цільового продукту, одержаного у вигляді грануляту в розсипу, до желатинових капсул (порівн. приклади №1 та №2) не викликає будь-яких змін його фізико-хімічних властивостей.

Відповідно до задачі винаходу, оцінка ефективності заявляємої мікроелементно-вітамінної композиції проведена на підставі визначення її антистресорної активності та здатності підвищувати резистентність організму при різних типах подразнювачів в порівнянні з прототипом - полівітамінно-мікроелементним засобом «Комплівіт», а також аналогом - засобом «Юнікап». Визначали вплив введення цих продуктів на макро-характеристики стану організму, показники лейкоцитарної формули периферичної крові та кістково-мозкового кровотворення, а також на вміст заліза як фактор гісто-морфологічної картини міокарду при стресах внаслідок нервово-м'язового подразнення та впливу іонізуючого опромінення.

Конкретно, активність заявляемого об'єкту, прототипу та аналога оцінена за наступними показниками, які різнобічно характеризують їх властивості:

динаміка тривалості плавання після нервово-м'язового стреса;

фактори «якості життя» в умовах пострадіаційного стресового синдрому;

динаміка вмісту лейкоцитів, нейтрофілів та еозинофілів в периферичній крові при нервово-м'язовому та радіаційному стресі;

кількість мієлокаріоцитів, лімфоїдних та еритроїдних клітин в кістковому мозку при радіаційному стресі;

динаміка вмісту заліза в тканині серця при нервово-м'язовому стресі.

Нервово-м'язовий стрес відтворювали в моделі 12-годинного голодування з одночасною імобілізацією в останні 3 години експерименту (фізичною фіксацією, що виключала можливість рухатись). Радіаційний стрес створювали однократним рентгенівським опроміненням тварин в апараті РУМ-37 при стандартних технічних умовах. Доза, яка була поглинена, складала 6Гр для м'яких тканин.

В усіх експериментах піддослідними тваринами були білі щури обох статей масою 180 - 220г. В

кожній дослідній групі (контроль - інтакт; тварини, яких піддавали стресу; стресовані тварини, яким вводили, відповідно, цільовий продукт за запропонованим способом, цільовий продукт за способом-прототипом та аналог-Юнікап) було по 11 - 21 тварини.

Досліджені об'єкти вводили перорально в дозах 22,5мг/кг (заявляема коів.-позиція), 32мг/кг (прототип) та 25мг/кг (аналог) в крохмальному клейстері: тваринам з нервово-м'язовим стресом - перед голодуванням та перед фіксацією, тваринам з радіаційним стресом - протягом 7 діб перед опроміненням і потім раз на добу протягом 30 днів (або 7-й в експериментах з кістковим мозком) спостереження. Контрольні стресовані тварини (контроль) одержували в ті ж терміни тільки крохмальний клейстер.

Резистентність до навантаження оцінювали за тривалістю плавання після стресу, яку враховували з моменту вміщення тварини у воду (кип'ячену з температурою 28 - 30°C) до повного її знесилення із зануренням на дно. Для стандартизації перед плаванням до проксимальної частини хвосту тварини прикріплювали вантаж (10% від маси тіла).

Всі тварини підлягали систематичному клінічному спостереженню: протягом 1-ї доби після нервово-м'язового стресу, протягом 30 діб - з моменту опромінення при радіаційному стресі. Вплив досліджених засобів на резистентність організму при опроміненні оцінювали за критеріями: 30-добова виживаємість, середня гармонійна тривалість життя, частота розвитку характерних пост-променевих ознак (геморагічні явища, загальний задовільний стан). Контрольовані характеристики крові визначали стандартними методами через 3, 9 й 12 годин (нервово-м'язовий стрес) та на 7, 14 й 30 добу (опромінення) після впливу подразнювача. При визначенні показників кістково-мозкового кровотворення тварин декапітували на 7-му добу після опромінення та відмивали кістковий мозок із стегнової кістки фізіологічним розчином.

При гісто-морфологічних дослідженнях серце фіксували в 10% нейтральному формаліні й виготовляли заморожені зрізи, які фарбували за Перлсом. Для визначення вмісту заліза в міокарді тварин декапітували в підгрупах через 15хв, 30хв та 24 години після зняття іммобілізації, здійснювали через аорту перфузію серця фізіологічним розчином до повного знебарвлення промивних вод та витримували 10хв в фізіологічному розчині. Після цього серця сушили на повітрі протягом 24 годин, потім у сушильній шафі при 105°C до втрати маси 75 (± 2)% і зважували. Далі проводили кислотний гідроліз гомогенату тканини серця в соляній кислоті (1:1) й фільтрували гідролізат крізь паперовий фільтр, попередньо демінералізований в 1% HCl. Визначення катіону заліза в одержаних розчинах проведено відносно холостої проби атомно-адсорбційним методом на ААС Perkin-Elmer 3110 при довжині хвилі 248,3нм.

Оцінювали також фармакологічну нешкідливість заявляємої композиції, прототипу й аналога за показником гострої токсичності. Препарати вводили перорально тваринам двох видів (білі миші та щури) в крохмальному клейстері в дозах 1580 - 6300мг/кг, відповідно до методики встановлення

середньолетальних доз. Токсичний ефект враховували протягом 5 діб.

Для заявляємої композиції, прототипу й аналога при всіх досліджених дозах не виявлено летальних наслідків, що обумовило неможливість оцінки середньосмертельної дози ЛД<sub>50</sub>. Навіть у максимальних використаних дозах заявляема композиція та Юнікап не викликали будь-яких симптомів отруєння. Для прототипу - Комплівита максимальна доза викликала слабкі аномалії поведінкових реакцій тварин, що свідчить про його відносно меншу гостру нешкідливість.

В межах вивчення хронічної токсичності заявляємої композиції не встановлено її негативного впливу на реєстровані в динаміці показники функціонального стану органів та систем організму піддослідних тварин (білі щури та собаки - перорально, щоденно протягом 3 місяців в дозах 22 та 130мг/кг): змін природного статусу маси тіла, функцій печінки та нирок, складу периферичної крові, а також тератогенної, ембріотоксичної, місцевоподразнючої й алергізуючої дії. Патоморфологічними дослідженнями за результатами хронічного експеримента не виявлено змін внутрішніх органів тварин.

Таким чином, заявляема композиція, для якої за даними гострого та хронічного експерименту встановлено високу нешкідливість, згідно прийнятої класифікації, відноситься до групи практично нетоксичних речовин. Це є вагомим підґрунтям розгляду переваг її специфічної фармакологічної активності відповідно до задачі винаходу.

В таблицях 3 - 8 наведено порівняльні дані з активності заявляємої композиції, протипа та аналога, яка виражена в здатності до нормалізації стрес- та резистентно-компетентних параметрів стану тварин.

Після нервово-м'язового стресу працездатність тварин різко падає (таблиця 3). Лікувально-профілактичне введення всіх досліджених засобів підвищує опірність організму стресованих тварин до навантаження. При цьому переваги здатності заявляємої композиції підвищувати резистентність є чітко вираженими. Це виявляється у (1,8 - 2,2) - кратному підвищенні працездатності, порівняно із контролем, яка одночасно в (1,4 - 1,5) рази перевищує таку для прототипа та аналога.

Ефективність заявляємої композиції в підвищенні резистентності організму особливо виражена в макро-показниках активності в умовах радіаційного стресу (таблиця 4). Пост-променевий синдром характеризується суттєвим погіршенням факторів загального стану (рухомості, апетиту, стану шерстного покриву, зниження маси тіла, виникнення геморагії та ін.) аж до вираженої загибелі. Стосовно цих факторів для заявляемого об'єкту характерно:

підвищення виживаємість тварин в 2,1, 2,3 й 3,6 рази в порівнянні із прототипом, аналогом та стрес-контролем, відповідно;

підвищення середньої гармонійної тривалості життя в 1,3 рази в порівнянні із прототипом та аналогом, в 1,4 рази - із стрес-контролем;

зниження геморагічних проявів в 1,5, 1,6 й 2,5 рази в порівнянні із прототипом, аналогом та стрес-контролем, відповідно;

підвищення загального задовільного стану тварин в 1,4 рази в порівнянні із прототипом та аналогом, в 1,8 - із стрес-контролем.

Ці дані підтверджують переваги заявляємої композиції у здатності підвищувати резистентність організму, як стосовно суттєвого зниження летальності, так і стосовно значного покращення «якості життя» тварин, які вижили.

Із врахуванням специфічності пост-стресових аномалій гемопоєзу принципово важливі порівняльні дані впливу досліджених засобів на стан клітинних клонів периферичної крові та кісткового мозку (таблиці 5 - 7).

Вплив нервово-м'язового та радіаційного чинників викликає виражене викривлення лейкоцитарної формули периферичної крові та мієлограми, характерне для наслідків стреса. В периферичній крові виникають нейтрофіліоз, лімфопенія та еозинопенія. В кістковому мозку спостерігаються явища інгібіції проліферації та зміни диференціації клітинних клонів, які обумовлюють вражаюче падіння вмісту мієлокаріоцитів, а також зменшення клітин еритроно та лімфоцитів.

Лікувально-профілактичне введення всіх досліджених засобів у всі терміни спостереження знижує вираженість стресорних проявів. При цьому антистресорна активність заявляємої композиції:

за усуванням стресового нейтрофіліоза в периферичній крові в 1,3 - 1,8 рази та 1,9 - 3,8 рази вище, ніж у прототипа і аналога, відповідно, при нервово-м'язовому стресі та в 1,2 і в 1,2 - 1,5 рази - при радіаційному стресі;

за усуванням стресової лімфопенії в периферичній крові в 1,1 - 1,3 рази та 1,2 - 1,4 рази вище, ніж у прототипа і аналога, відповідно, при нервово-м'язовому стресі та в 1,1 - 1,6 та в 1,2 - 1,5 рази - при радіаційному стресі;

за усуванням стресової еозинопенії в периферичній крові в 1,1 - 1,3 рази та 1,2 - 1,6 рази вище, ніж у прототипа і аналога, відповідно, при нервово-м'язовому стресі та в 1,3 - 1,8 та в 2,3 - 2,5 рази - при радіаційному стресі;

за попередженням стресового падіння вмісту мієлокаріоцитів в кістковому мозку в 1,8 - 2,0 рази та 2,0 - 2,2 рази вище, ніж у прототипа й аналога, відповідно;

за попередженням стресового зменшення долі клітин еритроно в мієлограмі кісткового мозку в 1,2 - 1,4 рази вище, ніж у прототипу і аналога;

за попередженням стресової лімфопенії в мієлограмі кісткового мозку в 1,4 - 1,6 рази вище, ніж у прототипу і аналога.

Одержано принципові дані, які доводять позитивну антистресову кардіо-компетентність заявляємої композиції, у порівнянні із об'єктами порівняння.

Внаслідок стресу в м'язових волокнах спостерігається реакція на залізо за Перлсом у вигляді виразних зерен синього кольору, яка повністю відсутня у інтактних нестресованих тварин. Ця реакція є результатом накопичення іонного заліза, має відчутно динамічний характер й на 3 - 6 годину спостереження набуває дифузного характеру.

Введення заявляємої композиції обумовлює практичне нівелювання гістохімічних проявів нако-

пичення заліза: в терміни 0 - 6 годин після стресу при забарвленні за Перлсом видно лише поодинокі дрібні сині зернята, а на 24 годину позитивна реакція на залізо в міокарді відсутня зовсім.

При цьому введення прототипу-Комплівіту та аналога-Юнікапу практично не запобігає накопиченню заліза в міокарді, як показника стрес-реакції: в усі терміни спостереження в міокарді залишаються дрібні сині гранули, а для аналога - навіть зберігається дифузний характер реакції.

Описаній морфологічній картині відповідають й переваги впливу цільового продукту на кількісний вміст заліза в тканині серця (таблиця 8).

Заявляема композиція обумовлює стійкий захист серцевого фону заліза при нормалізуючій його динаміці протягом всього періоду спостереження. В тих же обставинах введення продукту за прототипом (приклад 7) та аналога-Юнікапу залишає вміст заліза в міокарді суттєво підвищеним відносно норми в усі терміни спостереження. На 24 годину після стресу цей показник для заявляємої композиції достовірно нормалізується, а для прототипу та аналога - в 1,3 та 1,8 рази перевищує норму і навіть стрес-контроль. Така активність, нехарактерна для прототипу і аналога, може розглядатись як ефект винаходу, що не прогнозувався.

За сумою всіх функціональних показників заявляема композиція має суттєві переваги перед прототипом - засобом «Комплівіт» і препаратом «Юнікап-М» як аналогом. При цьому високий рівень активності заявляемого об'єкту забезпечується відносно звуженим діапазоном та зменшеним вмістом інгредієнтів, ніж в прототипі. Максимальний антистресорний ефект та здатність до підвищення резистентності організму досягається заявляємою композицією за прикладами № 1 - 4, тобто при наступному співвідношенні компонентів (мас. ч.):

Тіаміну хлорид	1,5 - 2,5
Рибофлавін	0,8 - 1,2
Нікотинамід	6,0 - 9,0
Кальцію пантотенат	6,0 - 9,0
Піридоксину гідрохлорид	0,8 - 1,2
Іон заліза(Ш)	0,50 - 0,65
Іон цинку (П)	0,30 - 0,68
Іон марганцю (П)	0,06 - 0,16
Іон міді (П)	0,07 - 0,15
Іон кобальту (П)	0,007 - 0,014
Іон хрому(Ш)	0,006 - 0,012
N-2,3-діметилфенілантранілат іон	11,80 - 16,50

За межами вказаних співвідношень цільова фармакологічна активність композиції дещо знижується (приклад 5) або зберігається на рівні, вже досягнутому при відносно меншому вмісті компонентів (приклад 6). На рівень ефекту композиції не впливає обрана для її застосування лікарська форма: гранульований порошок (приклади 1, 3 та 4) або капсула (приклад 2).

Таким чином, внаслідок створення мікроелементно-вітамінної композиції, яка заявляється, досягається більш високий антистресорний ефект та можливість суттєвого підвищення резистентності організму, ніж у відомих лікарських препаратів, в т.ч. у прототипа - засобу «Комплівіт» та аналога

«Юнікап-М», при забезпеченні високої нешкідливості заявляемого об'єкту. Сполучення високої специфічної активності та нешкідливості достеменно обумовлює відповідність заявляємої компо-

зиції принципам лікувально-профілактичного застосування з метою попередження наслідків стресів та підвищення резистентності організму людини.

Приклади створення композиції, яка заявляється

Таблиця 1

Компонент	№ приклада					
	1	2*	3	4	5	6
Об'єм взятого розчину хлориду металу (0,5М), мл:						
Fe	20,7	20,7	17,9	23,2	17,1	24,0
Zn	20,9	20,9	13,8	9,2	8,6	21,5
Mn	5,8	5,8	3,6	2,2	6,5	1,8
Cu	4,7	4,7	3,1	2,2	1,6	5,3
Co	0,47	0,47	0,34	0,24	0,53	0,17
Cr	0,47	0,47	0,40	0,24	0,20	0,55
Маса (г) взятих:						
- кислоти HL	16,5	16,5	11,9	12,6	12,0	16,9
-NaOH**	2,61	2,61	1,96	2,0	1,76	2,65
Маса (г) взятих вітамінів:						
B1	2,0	2,0	1,5	2,5	2,8	1,3
B2	1,0	1,0	0,8	1,2	1,5	0,7
B3	8,0	8,0	6,0	9,0	9,5	5,5
B5	8,0	8,0	9,0	6,0	5,5	9,5
B6	1,0	1,0	0,8	1,2	1,4	0,7

Примітки:

\*) Приклад №2 є композицією, створеною за прикладом №1, яку розфасовано в капсули.

\*\*) Об'єм водного розчину NaOH однаковий

для всіх прикладів і складає 90мл.

\*\*\*) Якісний та кількісний склад допоміжних речовин однаковий для всіх прикладів і аналогічний вказаному в описі прикладу №1.

Визначений вміст компонентів в композиції, яка заявляється (мас.ч.)

Таблиця 2

Компонент	№ приклада					
	1	2*	3	4	5	6
Іони металів:						
Fe(III) (± 0,02)	0,58	0,58	0,50	0,65	0,48	0,67
Zn(II) (± 0,02)	0,68	0,68	0,45	0,30	0,28	0,70
Mn(II) (± 0,02)	0,16	0,16	0,10	0,06	0,18	0,15
Si(II) (± 0,005)	0,15	0,15	0,10	0,07	0,05	0,17
Co(II) (± 0,003)	0,014	0,014	0,010	0,007	0,016	0,005
Cr(III) (± 0,003)	0,012	0,012	0,010	0,006	0,005	0,014
Іон кислоти:						
L (± 0,05)	16,46	16,45	11,76	12,55	11,90	16,80
Вітаміни:						
B1 (± 0,1)	2,0	2,0	1,6	2,4	2,9	1,3
B2 (± 0,1)	1,0	1,0	0,9	1,2	1,4	0,6
B3 (± 0,2)	8,0	7,9	6,2	9,1	9,6	5,6
B5 (± 0,2)	7,8	8,0	8,8	5,9	5,5	9,3
B6 (± 0,1)	1,0	0,9	0,8	1,3	1,5	0,6

Примітки:

\*) Приклад №2 є композицією, створеною за прикладом №1, яку розфасовано в капсули.

\*\*) Якісний та кількісний склад допоміжних речовин однаковий для всіх прикладів і аналогічний вказаному в описі прикладу №1.

Порівняльна оцінка активності заявляємої композиції, прототипу  
й аналога за впливом на працездатність в стреса

Таблиця 3

Об'єкт за прикладом №	Тривалість плавання:		
	сек (± 15)	% до стрес-контролю	% до такту
Композиція, яка заявляється:			
1	386	214	43
2	386	214	43
3	387	215	43
4	382	212	42
5	327	182	37
6	386	214	43
Прототип за прикладом			
1	265	147	30
Аналог-Юнікап	261	145	29
Стрес-контроль	180	100	20
Інтакт	895	497	100

Порівняльна оцінка активності заявляємої композиції, прототипу й аналога за впливом на резистентність  
організму в умовах радіаційного стреса

Таблиця 4

Об'єкт за прикладом №	Показники резистентності:			
	Середня гармонійна тривалість життя, діб	На 30 добу після стресу, %:		
Композиція, яка заявляється:		Вживаємість	геморагічні прояви	загальн. задовільний стан
1	23,6	66	25	90
2	23,6	66	25	92
3	23,5	65	25	93
4	23,6	66	24	90
5	23,5	66	27	89
6	20,0	53	27	80
Прототип за прикладом 7:	19,0	31	38	65
Аналог-Юнікап	19,0	29	40	65
Контроль-стрес	16,7	18	63	50

Порівняльна оцінка активності заявляємої композиції, прототипу й аналога за впливом на динаміку показників лейкоцитарної формули периферійної крові в умовах нервово-м'язового стресу

Таблиця 5

Об'єкт за прикладом №		Вміст в крові (% до норми) на годину після стресу:					
		нейтрофіли(± 20)		лімфоцити(± 10)		еозинофіли(± 20)	
		3	12	3	12	3	12
Композиція, яка заявляється:							
1	150	100	95	90	90	80	80
2	140	100	95	90	90	80	80
3	140	100	95	95	90	95	95
4	140	100	100	90	90	85	85
5	180	105	90	90	90	75	75



6	200	110	90	80	90	80
Прототип за прикладом:						
7	200	180	90	80	80	70
Аналог-Юнікап	280	380	90	65	80	60
Контроль-стрес	300	450	90	50	80	40
Норма-інтакт	100		100		100	

Порівняльна оцінка активності заявляємої композиції, прототипу й аналога за впливом на динаміку показників лейкоцитарної формули периферійної крові в умовах радіаційного стресу

Таблиця 6

Об'єкт за прикладом	Вміст в крові (%) на добу після стресу:					
	нейтрофіли(± 2,5)		лімфоцити(± 2,5)		еозинофіли(± 0,2)	
	7	30	7	30	7	30
Композиція, яка заявляється:						
1	51,2	39,2	34,9	44,9	0,8	2,5
2	51,0	40,0	35,0	45,1	0,8	2,5
3	50,0	37,6	35,2	45,6	0,9	2,7
4	50,6	38,8	35,5	44,7	0,8	2,5
5	56,3	40,0	29,8	43,5	0,6	2,3
6	52,4	39,8	31,7	39,8	0,7	2,4
Прототип за прикладом:						
7	62,0	42,2	22,2	44,0	0,5	2,0
Аналог-Юнікап	76,7	48,4	17,0	39,1	0,4	1,1
Контроль-стрес	89,0	48,5	13,1	33,0	0,2	0,4
Норма-інтакт	36,3		48,0		3,0	

Порівняльна оцінка антистресорної активності заявляємої композиції, прототипу й аналога за впливом на показники кісткового мозку при стресі

Таблиця 7

Об'єкт за прикладом №	Вміст в кістковому мозку (на 7 добу після стресу):		
	мієлокаріоцити, 10/л	клітини еритроциту, % (± 2,5)	лімфоцити, % (± 2,5)
Композиція, яка заявляється			
1	259 ± 45	17,2	24,5
2	269 ± 75	18,0	22,0
3	247 ± 40	17,2	20,9
4	250 ± 60	17,9	20,0
5	240 ± 45	17,0	16,7
6	250 ± 55	17,0	18,8
Прототип за прикладом			
7	131 ± 45	12,9	14,4
Аналог-Юнікап	117 ± 75	14,8	15,9
Стрес-контроль	22 ± 3	8,2	8,7
Норма-інтакт	299 ± 75	22,2	18,2

Порівняльна оцінка антистресорної активності заявляємої композиції, прототипу й аналога за впливом на динаміку вміста заліза в тканині серця при стресі

Таблиця 8

Об'єкт за прикладом №	Fe в міокарді, мкг/г (± 2,2) на час після стресу:		
	15хв	30хв	24год
Композиція, яка заявляється			
1	45,5	44,7	46,0
2	45,5	45,0	47,6
3	43,3	44,0	46,6

Продовження табл. 8

Об'єкт за прикладом №	Fe в міокарді, мкг/г ( $\pm 2,2$ ) на час після стресу:		
	15хв	30хв	24год
4	44,0	43,8	45,2
5	43,6	44,6	44,5
6	43,5	44,7	44,7
Прототип за прикладом			
7	49,9	52,3	55,6
Аналог-Юнікап	57,2	73,0	77,1
Стрес-контроль	58,8	65,8	74,5
Норма-інтакт		42,0	

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сім'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71