



УКРАЇНА

(19) UA (11) 66165 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ВІТАМІННОЇ КОМПОЗИЦІЇ, ЩО МІСТИТЬ ВІТАМІНИ С ТА К₃, ЯК ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

1

2

(21) u201107026

(22) 03.06.2011

(24) 26.12.2011

(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.

(72) РИБАЛКО СВІТЛАНА ЛЕОНТІЇВНА, КОЗАК
ВЯЧЕСЛАВА ВАДИМІВНА, ОРЛОВСЬКИЙ АЛЕКСІЙ
АРКАДІЙОВИЧ, ДЯДІОН СВІТЛАНА ТЕРЕНТІ-
ЇВНА, ЖАРКОВА ЛЮДМИЛА ДМИТРІВНА, МАК-

СИМЕНКО ОЛЕНА ВАЛЕНТИНІВНА, СТАРОСИЛА
ДАР'Я БОРИСІВНА, ЯНІШ ЮРІЙ ВАДИМОВИЧ
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕПІДЕ-
МІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ІМ. Л.В.
ГРОМАШЕВСЬКОГО АМН УКРАЇНИ"

(57) Застосування вітамінної композиції, що міс-
тить вітаміни С та К₃, як засобу для лікування віру-
сних інфекцій.

Корисна модель, що заявляється, належить до
медицини, зокрема вірусології інфекційних хвороб.

Відомі застосування вітамінної композиції, що
складається з вітамінів С та К₃, відомих також як
аскорбінова кислота і вікасол, для лікування злоя-
кісних пухлин [1, 2], та застосування окремих віта-
мінів і полівітамінних композицій при інфекційних
захворюваннях з метою корекції різноманітних
обмінних процесів в організмі. У джерелі [2] описа-
не застосування різноманітних вітамінів та поліві-
тамінних композицій, які практично завжди містять
вітамін С та деколи і вітамін К₃, як допоміжних за-
собів при лікуванні інфекційних, зокрема вірусних
захворювань. Недолік цього аналогу полягає в
тому, що при їх створенні ставилась лише задача
корекції метаболічних процесів, задачу ж цілесп-
рямованої елімінації клітин, уражених вірусами,
розробники вітамінних композицій досі перед со-
бою не ставили.

Відоме застосування композиції вітамінів
С+К₃ [3] в онкології щодо клітин злоякісних пухлин
для індукції загибелі уражених хворобою клітин,
але досі не досліджувався щодо інфекційної пато-
логії.

В основу корисної моделі поставлено задачу:
застосувати для лікування злоякісних вірусних
інфекцій вітамінну композицію, яка містить вітамі-
ни С та К₃ для досягнення цілеспрямованої елімі-
нації клітин, уражених вірусами.

Поставлена задача вирішується тим, що за-
стосовують вітамінну композицію, що містить віта-
міни С та К₃, як засіб лікування вірусних інфекцій.

Були проведені наступні дослідження. В орга-
нізм піддослідних тварин, експериментально за-

ражених вірусами, або в ростове середовище ку-
льтур клітин, експериментально заражених віру-
сами, вводили вітамінну композицію, що містить
вітаміни С та К₃, відомих також як аскорбінова ки-
слота і вікасол, до якої додавали, в разі необхідно-
сті, інші вітаміни та допоміжні речовини. Як пока-
зали дослідження при застосуванні композиції
вітамінів С+К₃ до злоякісних пухлин різного ґенезу,
клітини яких мають відповідно різні генетичні по-
рушення, завжди спостерігається масова загибель
пухлинних клітин за механізмом, так званого, ау-
тошизису (саморозщеплення), причому ефектив-
ність вітамінної композиції практично не залежить
від ґенезу та гістологічного типу пухлин, тобто ви-
значається не конкретним типом генетичних по-
рушень, а самим фактом їх наявності. Однак клі-
тини, інфіковані вірусами, також завжди мають ті
чи інші серйозні порушення структури і функції
власного геному (анеуплоїдію, хромосомні абера-
ції, вставки ділянок вірусної ДНК або ревертазних
транскриптів вірусної РНК в ДНК клітини і т. ін.).
Крім того, сам факт функціонування в клітині не
лише її власного, але й вірусного генома, для кон-
трольних механізмів клітини та організму рівно-
цінний грубій дисфункції клітинного генома. Тому
клітини, уражені вірусами, під дією застосовуваної
вітамінної композиції гинуть за механізмом ауто-
шизису так само, як і злоякісні клітини, причому
величина цього ефекту практично не залежить від
таксономічного положення вірусу, яким уражена
клітинна популяція.

Приклади практичного застосування корисної
моделі Приклад 1. Здійснення способу. Цитологіч-
ні дослідження. Досліджують вплив вітамінної

(19) UA (11) 66165 (13) U

композиції С+К₃ на характер росту клітинних культур, інфікованих вірусами. Досліди проводять на перещеплюваній культурі клітин НГУК-1, одержаній з невриноми гесерова вузла щура, індукованої трансплацентарним введенням нітрозоетил сечовини. Культура одержана з Інституту цитології РАН. Композицію вітамінів С (аскорбінова кислота)+К₃ (вікасол) у співвідношенні 100:1 вносять в добову культуру клітин. Надалі культури інфікують вірусом герпесу звичайного (HSV), гепатиту С

(HCV) та вірусом імунodefіциту людини (HIV). Через 24 години інкубації клітини фіксують і готують препарати для цитологічного аналізу. Контролями були: 1) інтактні клітини; 2) клітини, оброблені лише вітамінною композицією; 3) клітини, інфіковані HSV (вірус герпесу), HCV (вірус гепатиту С) і HIV (вірус імунodefіциту людини) або їх комбінаціями, але не оброблені вітамінною композицією. Визначають характеристики росту культур, результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Показники мітотичного режиму та ефекту аутошизису в культурах НГУК-1 після інкубації з вітамінами і вірусами

Вплив	Мітотичний індекс, %	Аномальні мітози, % від усіх мітозів	Характер моношару клітин	Кількість атипових клітин, %
Інтактні клітини	30±0,7	22,2±1,8	Рівномірний	0,8±0,2
Вітамінна композиція	15±0,6	20,2±1,8	Рівномірний	1,8±0,1
HIV	35,3±0,8	48,3±2,2	Рівномірний	1,9±0,1
HCV	42,3±0,9	44,0±2,1	Рівномірний	0,9±0,2
HSV	10,2±0,5	48,6±2,2	Поодинокі клітини та ріст острівцями	0,8±0,1
HIV+(C+K ₃)	2,0±0,1	16,6±1,4	Ріст острівцями	16,6±0,5
HCV+(C+K ₃)	1,6±0,1	Не виявлені (із-за низького MI)	Поодинокі клітини та ріст острівцями	8,2±0,4
HSV+(C+K ₃)	7,0±0,3	20,0±1,9	Поодинокі клітини та ріст острівцями	19,0±1,1

Видно, що зниження мітотичного індексу спостерігається в контрольних культурах, оброблених вітамінною композицією С+К₃ (що не дивно, оскільки використана культура клітин має пухлинне походження), а також при зараженні вірусом герпеса (ефект 1). Водночас, HCV та HIV самі по собі, навпаки, стимулюють мітотичну активність порівняно з інтактними культурами та контрольними культурами, що були оброблені композицією (ефект 2). Статистична значущість обох ефектів, особливо другого, дуже висока (відповідні значення t-критерію Стьюдента становлять $t_1=4,1$; $t_2=10$). Внесення вітамінної композиції в культури інфікованих вірусами клітин в усіх випадках призводить до зниження мітотичного індексу порівняно з відповідними інфікованими контролями, причому для культур, інфікованих HCV та HIV, таке зниження було статистично надзвичайно високим ($t_{HCV}=44,9$; $t_{HIV}=41,3$), а для HSV - високозначущим ($t_{HSV}=5,5$).

В усіх вище зазначених контрольних культурах число атипових клітин, які є характерними для аутошизису (атипових клітин зі зменшеним об'ємом цитоплазми, зменшеним розміром ядер, крайовою конденсацією ядерного хроматину та збільшеними за розміром ядерцями), коливається від 0,8 % в інтактних культурах до 1,9 % в культурах, інфікованих HIV. При цьому характер моношару залишається без змін, крім культур, заражених HSV, де спостерігається ріст острівцями, а також поодинокі клітини, що відповідає звичайному характеру росту клітинних культур при даній інфекції.

Особливу увагу звертає на себе той факт, що в культурах, заражених вірусами клітин, що були піддані дії вітамінної композиції, патологічні мітози

зустрічаються набагато рідше, ніж в контрольних інфікованих культурах, або навіть зовсім не виявляються (у випадку HCV-інфекції), хоча при дії вітамінної композиції на незаражені клітини відсоток патологічних мітозів практично не змінюється. В сукупності з дворазовим збільшенням відсотку патологічних мітозів під дією кожного з випробуваних вірусів за відсутності вітамінної композиції, цей факт свідчить про елімінацію вітамінною композицією з клітинної популяції саме вражених вірусами клітин, що вони і є головними "постачальниками" патологічних мітозів.

Таким чином, як і при пухлинному процесі, внесення вітамінної композиції в культуру інфікованих вірусами клітин пригнічує їх мітотичну активність і сприяє появі атипових клітин та інших ознак, характерних для аутошизису.

Приклад 2. Вплив вітамінної композиції на репродукцію HIV досліджують на моделі гострої HIV-інфекції в клітинах чутливої до HIV Т-лімфоїдної лінії MT-4, інфікованих лабораторним штамом HIV-1/BIII. Композицію С+К₃ вносять в культуру клітин в кінцевому розведенні 1:50, тобто до 1 мл культури клітин MT-4 додають 0,02 мл С+К₃. Через 30 хвилин клітини інфікують HIV в дозі 100 ID₅₀.

Після 5-добового культивування з оброблених та не оброблених вітамінною композицією клітин збирають вірусну суспензію і визначають в ній інфекційний титр вірусу методом кінцевих розведень. Крім того, визначають методом імуноферментного аналізу вміст вірусного білка р24 в різних розведеннях зібраної суспензії HIV. Результати наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив вітамінної композиції на репродукцію HIV

Обробка клітин	Визначення білка p24 в розведеннях зібраної суспензії HIV (одиниць екстинкції)*						Інфекційний титр (lg ID ₅₀)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
HIV+C+K ₃	3,567	1,105	0,195	0,078	0,055	0,041	3,5
HIV (контроль)	4,210	2,306	1,215	0,675	0,195	0,110	6,1

Примітка * - Cut off (лінія відрізу, чутливість методу) 0,087 од екстинкції.

З таблиці 2 видно, що вітамінна композиція пригнічує репродукцію HIV на 2,6 lg ID₅₀. Цьому відповідає і значне пригнічення експресії білка p24 HIV в середньому по клітинній популяції. Такі явища, мабуть, відбуваються за рахунок елімінації вірусінфікованих клітин в результаті їх деградації під дією вітамінної композиції. Все це дає змогу припустити, що введення в схему лікування HIV-інфекції вітамінної композиції C+K₃ сприятиме покращенню перебігу інфекційного процесу або ж його стабілізації.

Приклад 3. Було висунуто припущення, що ефект аутошизису вірусінфікованих клітин має місце також і при інших вірусних інфекціях. З метою перевірки цього припущення проводять дослідження протигрипозної активності вітамінної композиції in vivo на моделі грипозної пневмонії у мишей. Для цього використовують штам вірусу грипу (IV-Influenza Virus) A/FM/1/47 (H1N1), адаптований до легень білих нелінійних мишей, який пройшов 15 пасажів на мишах і мав інфекційний

титр 4 lg LD₅₀. При зараженні мишей таким вірусомісним матеріалом на протязі 5 діб спостерігається 100 %-на летальність тварин.

Випробування протигрипозної активності вітамінної композиції in vivo проводять за двома схемами: профілактичною і терапевтичною. Для цього мишам вводять внутрішньом'язово 0,2 мл розчину вітамінної композиції (група 1) або стандартний препарат (препарат порівняння) таміфлю (Tamiflu-Osetamivir) фірми Hoffmann la Roche по 0,7 мг/кг ваги (група 2). Через 24 години після введення препарату (терапевтична схема) або за 24 години до введення препарату (профілактична схема) мишей інфікують вірусом грипу інтраназально в дозі 10 LD₅₀, тобто розведенням 10⁻³ вихідного вірусмісного матеріалу. В експерименті визначають параметри смертності тварин, а також титр вірусу грипу в легенях мишей за допомогою загальноприйнятого методу титрування екстрактів легеневої тканини на курячих ембріонах. Результати наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Профілактичний та терапевтичний ефекти дії вітамінної композиції на моделі експериментальної грипозної інфекції in vivo

Діючі агенти	Кількість мишей в групі	Кількість загиблих		Кратність за- хисту (K3)	Індекс ефективності (IE) (%)	Титр IV, lg EID ₅₀
		Всього	%			
Профілактична схема						
C+K ₃ +IV	10	0	0	Повний захист	100,0	2,0
C+K ₃ +таміфлю+IV	10	2	20	5,0	80,0	2,0
Таміфлю+IV	10	2	20	5,0	80,0	1,5
IV (контроль)	12	12	100	1	0	4,0
Терапевтична схема						
IV+C+K ₃	10	2	20	5,0	80,0	2,0
IV+C+K ₃ +таміфлю	10	0	0	Повний захист	100,0	2,0
IV+таміфлю	10	3	30	3,3	70,0	2,0
IV (контроль)	10	10	100	1	0	4,0

З таблиці 3 видно, що вітамінна композиція повністю захищає тварин від летальної грипозної інфекції при профілактичній схемі введення. Препарат таміфлю і комбіноване введення препарату таміфлю з вітамінною композицією при профілактичному введенні захищає мишей від інфікування грипом з однаковим індексом ефективності. При терапевтичній схемі введення повний захист від летальної грипозної інфекції спостерігається лише в групі з комбінованим застосуванням тест-агентів, однак і при їх окремому застосуванні активність

вітамінної композиції виявляється щонайменш не нижчою від активності препарату порівняння таміфлю.

Таким чином, з одержаних даних можна зробити висновок, що як при профілактичному, так і (меншою мірою) при терапевтичному застосуванні вітамінної композиції реєструється ефективний захист тварин від грипозної інфекції у порівнянні з рівнем стандартного протигрипозного препарату таміфлю.

Висновок.

Результати проведених досліджень дають змогу вважати, що вітамінний комплекс (C+K₃) в умовах як *in vitro*, так і *in vivo* здатний специфічно еліминувати з клітинної популяції саме ті клітини, в яких хоча б частково експресований вірусний матеріал. Цей ефект спостерігається при експериментальних інфекціях, спричинених вірусами принципово різних таксономічних груп. Така елімінація заражених клітин веде до різкого зниження інфекційних титрів вірусів в ростовому середовищі клітинних культур та з уражених тканинах тварин. Завдяки цілеспрямованій елімінації практично всіх клітин, уражених вірусами, застосовувана корисна модель може розглядатися як перспективний засіб щодо радикального лікування персистентних вірусних інфекцій, що, як відомо, не досягається жодним з досі відомих в інфекційній патології лікарських засобів. Разом з тим, зазначені вище ефекти

позитивно впливають на виживаність тварин, як видно, лише в тих випадках, коли здатність уражених тканин до регенерації перевищує цитодеструктивний потенціал вітамінного комплексу.

Джерела інформації:

1. Zhang W., Negoro T., Satoh K., Jiang Y., Hashimoto K., Kukuchi H., Nishikawa H., Miyata T., Yamamoto Y., Nakano K., Yasumoto E., Nakayachi T., Mineno K., Satoh T., Sakagami H. Synergistic cytotoxic action of vitamin C and vitamin K₃ // *Anticancer Res.*-2001.-21(5). - P. 3439-3444.
2. Baddour L., Gorbach S.L. Therapy of infectious diseases. - Elsevier Science, 2003.-605 p.
3. Gillotiaux J., Jamison J., Arnold D. et al. Cancer cell necrosis by autophagy: synergism of antitumor activity of vitamin C and vitamin K₃ on human bladder carcinoma T24 cells // *Scanning.*-1998.-20(8). - P. 564-575.