НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ
Відділ біохімії вітамінів і коензимів

Подання
на здобуття Державної премії України в галузі науки і техніки за 2020 р.

«Теоретичні засади розробки нових вітамінних препаратів для медицини та їх впровадження»

Авторський колектив:
Великий Микола Миколайович, Пархоменко Юлія Михайлівна, Протасова Зоя Степанівна, Вовк Андрій Іванович, Коваленко Валентина Миколаївна, Комісаренко Юлія Ігорівна, Апуховська Лариса Іванівна, Донченко Георгій Вікторович.

- **Мета роботи:** розробка фундаментальних принципів молекулярної вітамінології та створення нових лікарських препаратів на основі вітамінів B_1, D_3, E, а також біологічно активних речовин природного походження для застосування в медицині.
- **Завдання дослідження** включали вивчення механізмів участі вітамінів, їх природних та синтетичних похідних у регулюванні клітинного метаболізму, як основи розробки науково обґрунтованого підходу до створення нових вітамінних препаратів для медицини.
- **Результати фундаментальних досліджень** втілено у створення композицій вітамінних і біологічно активних речовин визначеного складу та їх впровадження.

Концептуальні положення роботи:

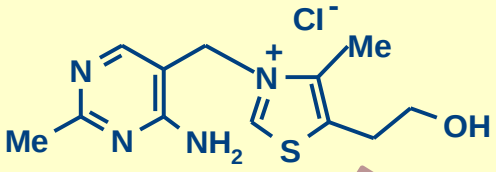
- Вітаміни необхідно розглядати не лише як незамінні інгредієнти харчування, але в першу чергу як біорегулятори обмінних процесів у клітинах, тканинах та організмі людини.

- Вітамінний препарат нового покоління – це науково обгрунтована композиція, у складі якої окремі вітаміни, мікроелементи та інші метаболіти, поряд з забезпеченням оптимального вітамінного статусу організму, органічно доповнюють та синергічно посилюють взаємну регуляторну дію на клітинний метаболізм.

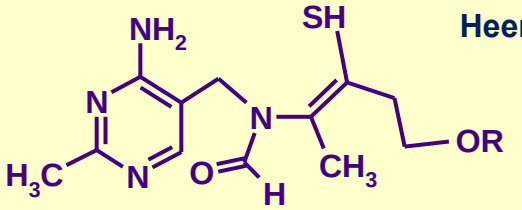
- Створені вітамінні препарати (композиції) мають наступні характеристики:

  - високу біодоступність та здатність швидко засвоюватись організмом;
  - високу біологічну ефективність діючих компонентів;
  - містять лише природні компоненти, без консервантів та стабілізаторів;
  - мають достатній термін зберігання;
  - вітаміни перебувають у зв’язаному з протеїном стані.

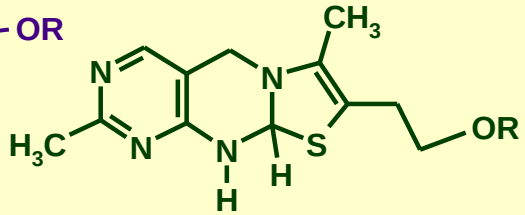
МЕХАНІЗМИ ПЕРЕТВОРЕНЬ ВІТАМІНУ B_1 І ТІАМІНФОСФАТІВ *IN VITRO*



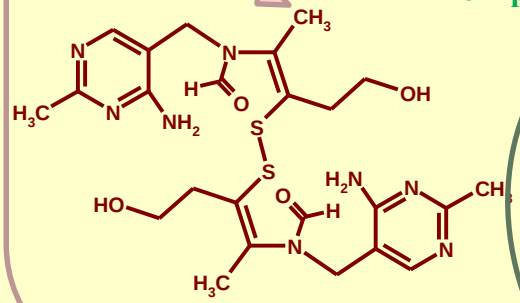
Неензиматичні окиснювальні перетворення тіаміну



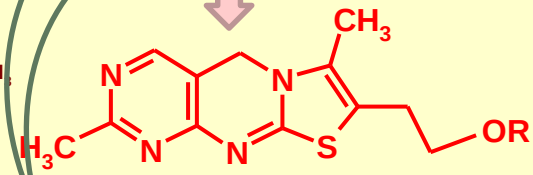
Тіольна форма



Нейтральна трициклічна форма



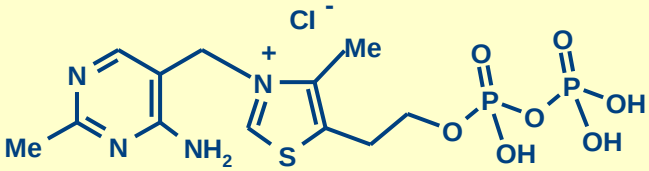
Тіаміндисульфід



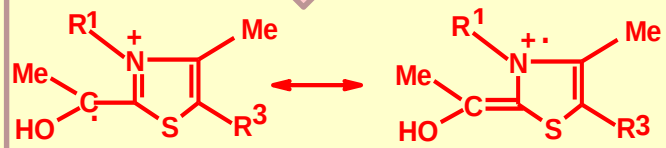
Тіохром

Транспортні форми тіаміну

Окиснювальна Інактивація ТДФ-залежних ензимів



Тіаміндифосфат



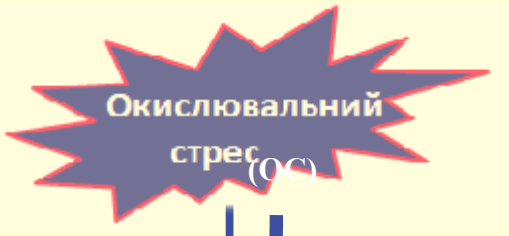
Радикальні перетворення інтермедіатів ТДФ-залежних перетворень

Зниження тіамінового статусу організму

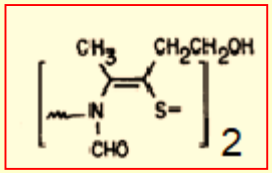
ОКИСНЮВАЛЬНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ ВІТАМІНУ B_1, ТІАМІНФОСФАТІВ ТА ТДФ-ЗАЛЕЖНИХ ЕНЗИМІВ У ОРГАНІЗМІ

Фактори, що викликають ОС:

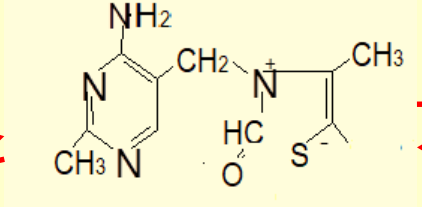
1. ***Екзогенні чинники***: дія іонізуючого опромінення, забруднення навколишнього середовища токсичними речовинами та інше.
2. ***Ендогенні чинники:*** порушення обміну речовин внаслідок зловживання алкоголем, ліками, неякісне харчування та ін.



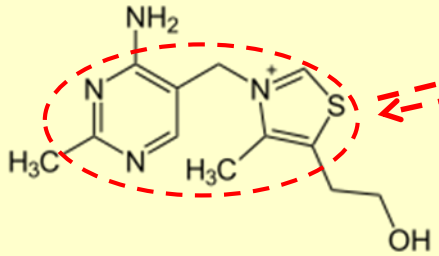
Дисульфід тіаміну



Тіольна форма молекули тіаміну



Вітамін B_1 (тіамін)

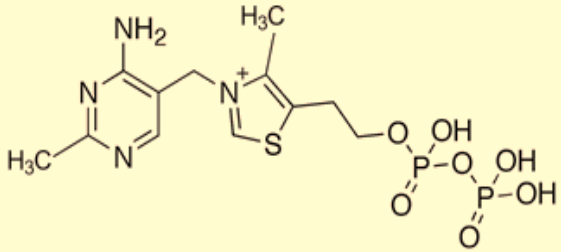


Дисульфд ТДФ (не є коензимом)

Попереджається або обертається за умов наявності відновників та антиоксидантів

Тіаміндифосфат (ТДФ)

(переважна біологічно активна форма в тканинах людини)



Дефіцит вітаміну

Хворобв Верніке-Корсакова
(ускладнення при хронічному алкоголізмі)

Метаболічний синдром, Діабет

Хвороба Альцгеймера

Серцево-судинні розлади

РОЗРОБКА КОМПЛЕКСНИХ ВІТАМІННИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ТІАМІНУ ТА ПРИРОДНОГО МЕТАБОЛІТУ МЕТІОНІНУ

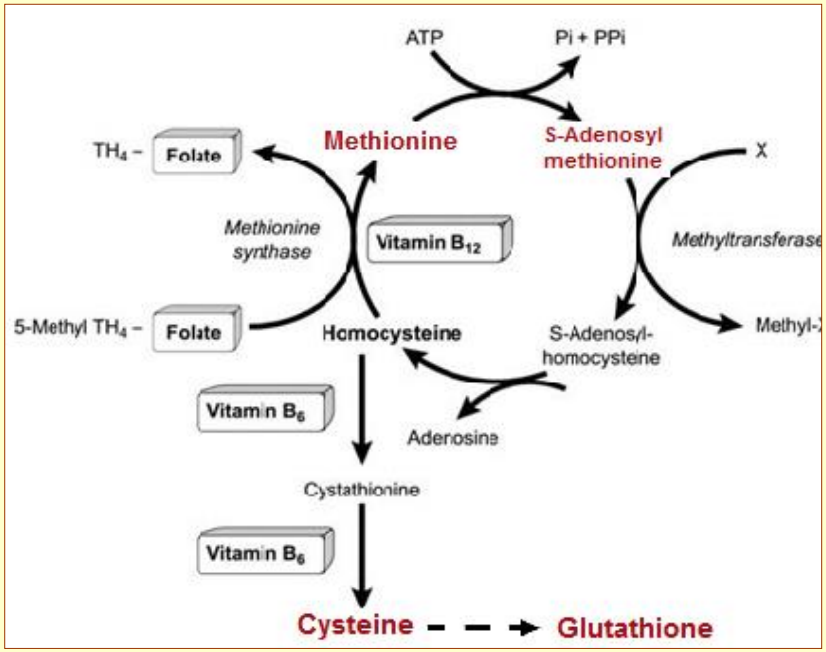
Ідея: **вітаміни B_1, Е та інші складові препаратів значно прискорюють перетворення амінокислоти метіонін по шляху трансметилювання та транссульфування, наслідком чого є активація лімітуючих ланок клітинного метаболізму**

МЕТОВІТАН

Препарат для підвищення життєстійкості організму

Активує систему антиоксидантного захисту, енергетичні процеси, ліполіз (розщеплення жирів), а також біосинтез S-аденозил-метіоніну. Аналогів не має; Прототипи за дією:

Гептрал® (адеметіонін) та Метіонін



Переваги перед прототипами:
1. **ефективно діють per os;**
2. **мають пролонговану дію;**
3. **нижча вартість**

КАРДІОВІТ

препарат для лікування та профілактики серцево-судинних захворювань.

Активує ендогенний синтез ТДФ (тіаміндифосфату) Аналогів не має Прототип за дією – ін'єкційний препарат "Кокарбоксилаза".

ОКОВІТАМ

очні краплі (розчинна форма субстанції препарату Метовітан)

МЕТОВІТАН - ПРЕПАРАТ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЖИТТЄСТІЙКОСТІ ОРГАНІЗМУ (патент № 39228, товарний знак)

Виробник – ПрАТ "Технолог" (м. Умань).

Реєстраційне посвідчення (РП) отримано у грудні 2016 року

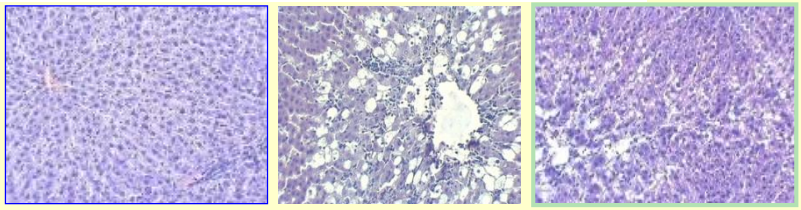
Комбінація метіоніну з вітамінами B_1, B_3, E і цинком має синергічну дію на клітинний обмін, у першу чергу на реакції трансметилювання та транссульфування.

ПОКАЗАННЯ (згідно РП)

- Для профілактики та у комплексній терапії захворювань печінки: неалкогольного та алкогольного стеатогепатозу, уражень печінки токсичними хімічними та лікарськими речовинами.
- У післяопераційний період, період одужання після перенесених захворювань та інтоксикацій різного генезу.
- У комбінованій терапії при хронічному алкоголізмі.
- При підвищеному розумовому і фізичному навантаженні.
- Для підвищення опірності організму до інфекційних захворювань.

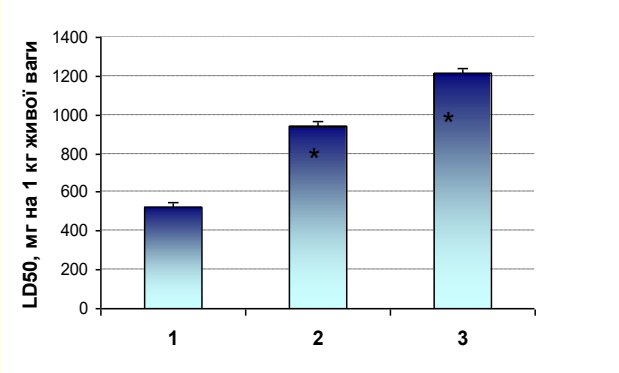
МЕТОВІТАН ЯК ГЕПАТОПРОТЕКТОР

Відновлення тканини печінки



Контроль | Токсичний гепатит | Токсичний гепатит + Метовітан

Зниження токсичності ліків: LD_{50} для ПА (парацетамолу)



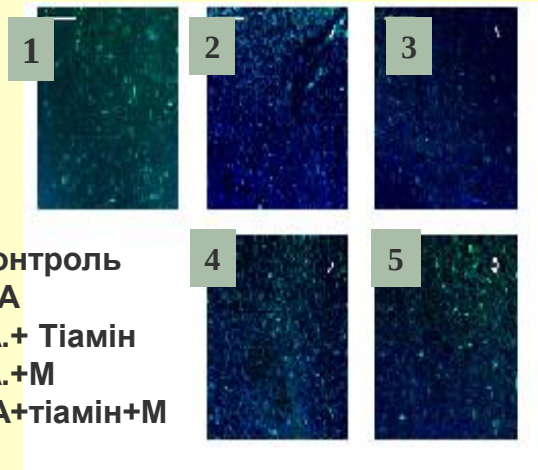
Метіонін Метовітан

1 - ПА – 450 мг на 1 кг
2 - Метіонін –900 мг/кг
3 - Метовітан – 1200 мг/кг

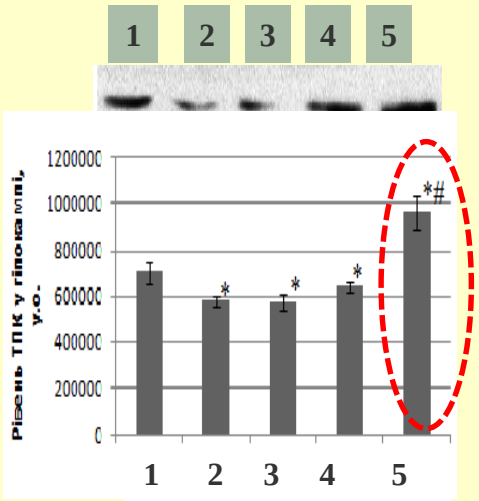
М Е Т О В І Т А Н

Сприяє відновленню структури клітин мозку

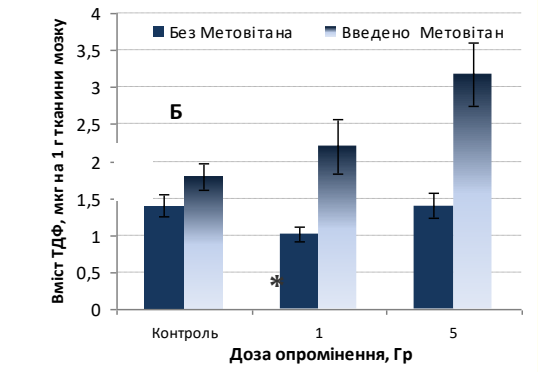
Модель хронічного алкоголізму (ХА): вплив Метовітану (М) на GFAP (*гліальний фібрилярний кислий протеїн*) в мозочку (дані імуногістохімії) та на експресію тіамінкінази (ТК – синтез ТДФ)



1 –контроль
2- ХА
3-ХА.+ Тіамін
4-ХА.+М
5- ХА+тіамін+М



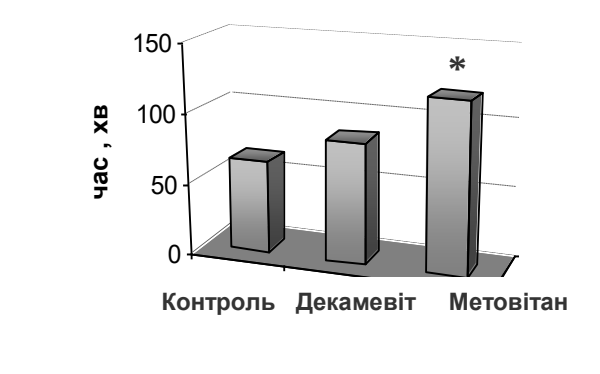
Захищає коензим ТДФ в тканині мозку від руйнівної дії іонізуючого опромінення

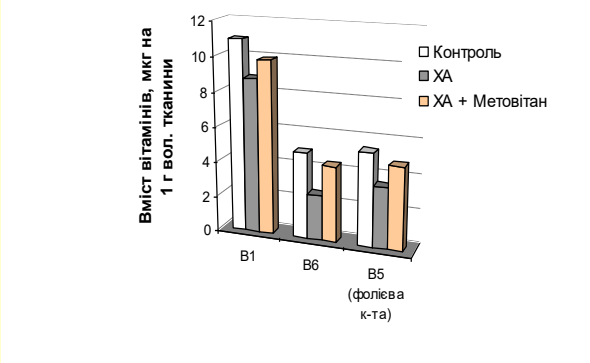


Сприяє підвищенню вмісту в печінці інших вітамінів

Підвищує витривалість

час утримання щурів на воді, хв.
Препарат Метовітан вводився щурам протягом 5 днів до випробування



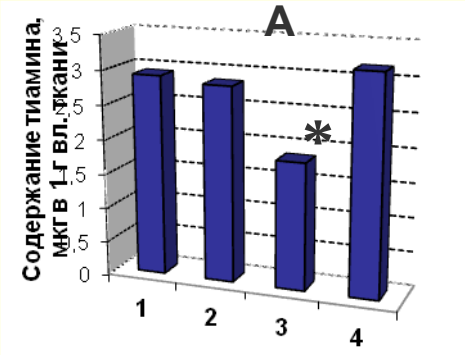


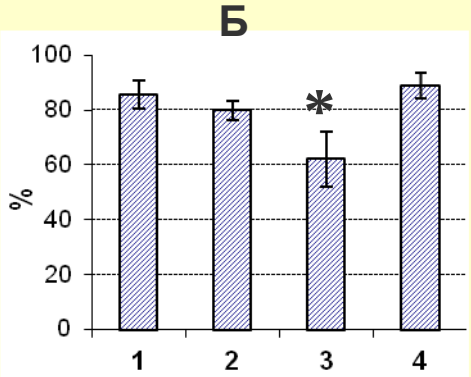
КАРДІОВІТ

Вітамін B_1, вітамін Е, метіонін, сіль цинку

- Основною складовою препарату є **вільний тіамін** (тіамінхлорід або інша форма вітаміну B_1), який легко проникає через клітинні мембрани і швидко фосфорилюється, на відміну від тіаміндифосфату (ТДФ), транспорт якого крізь клітинні мембрани без дефосфорилювання є проблематичним.

Вміст загального тіаміну (А) і ТДФ (Б) в серцевому м'язі щурів на моделі інфаркту та гіпоксичної гіпоксії



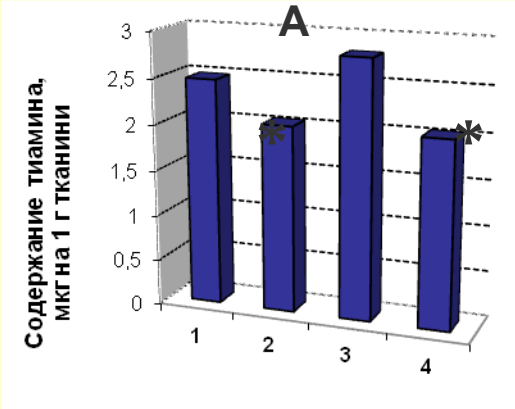


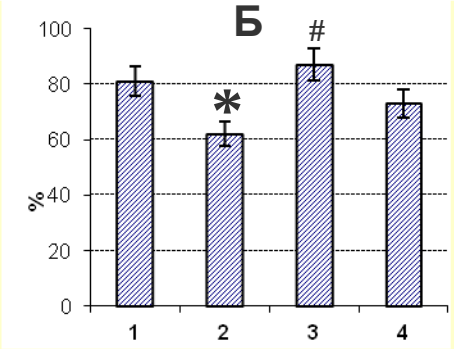
Інфаркт міокарда

1- інтактні тварини;
2 – псевдо-оперовані;
3 – модель інфаркту;
4 – лікування «Кардіовітом»

Гіпоксична Гіпоксія

1 – інтактні тварини;
2 – гіпоксія;
3 –вводився «Кардіовіт»;
4 – вводився препарат Карбоксилаза





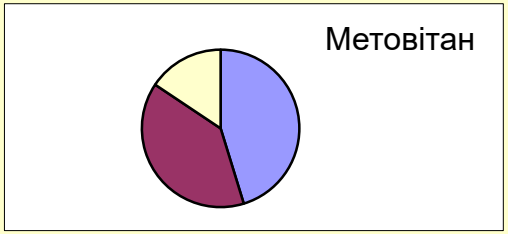
ОКОВІТАМ

Препарат «Оковітам» є розчинною формою субстанції, що складає активну основу препарату Метовітан

Призначений для попередження та зупинки розвитку запалення або деструкції тканин ока, зокрема, катаракти.

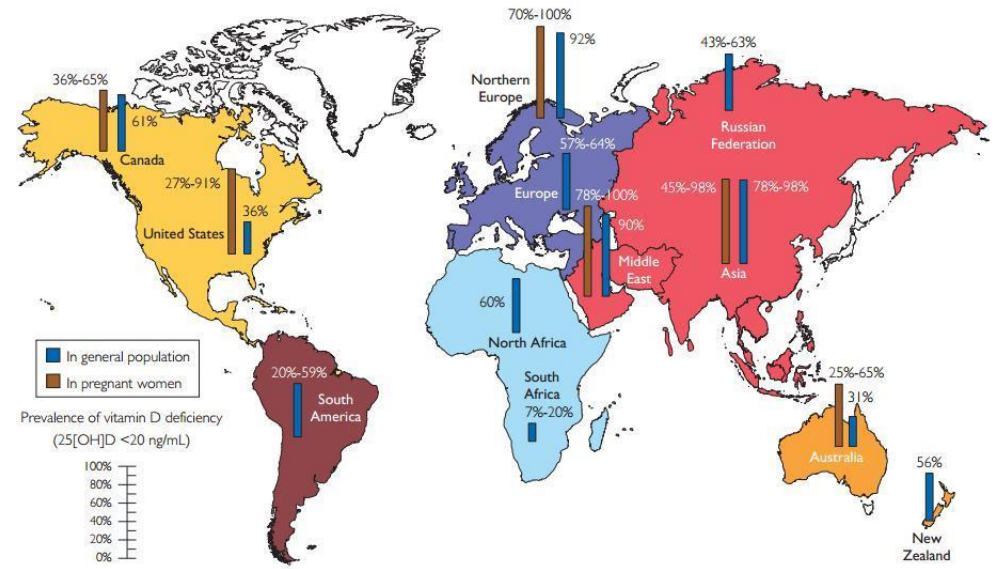
За результатами досліджень, проведених в Інституті очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України встановлено, що комплексний препарат у вигляді очних крапель (0,01% розчин) ефективно попереджає розвиток катаракти, а у третини тварин спостерігалось навіть покращення стану кришталика.

Ефективність препаратів Оковітам та Офтан-катахром (прототип) при лікуванні катаракти у тварин. Контроль - експериментальна світлова катаракта, яку моделювали шляхом загального опромінення кролів світлом високої інтенсивності.



Крім того показано, що ефективність лікування катаракти значно зростає, якщо одночасно перорально вводити препарат „Метовітан”.

ГЛОБАЛЬНИЙ ДЕФІЦИТ ВІТАМІНУ D В СВІТІ



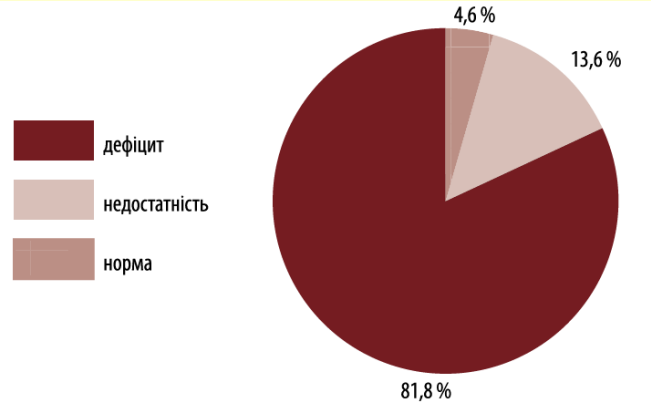
Близько 50% популяції населення планети перебуває в зоні ризику за дефіцитом вітаміну D.

(Dr. Michael F. Holick – експерт Інституту медицини, Національної академії США, 2011, 2015 , 2019 рр.)

За даними Українського підрозділу EVIDAS – (Європейської асоціації з вивчення вітаміну D) серед обстежених 1575 жителів України віком 20-95 років виявлено:

- **5% – мали нормальний рівень вітаміну D;**
- **14% – діагностовано недостатність;**
- **80% – стан глибокого дефіциту вітаміну D.**

(Поворознюк В.В. Ендокринологія, 2013, № 5 (13).



Дефіцит вітаміну D підвищує ризик:

- **захворювання на короновірусну інфекцію COVID-19 (дані ВООЗ);**
- **провокує розвиток ускладнень хронічних патологій.**

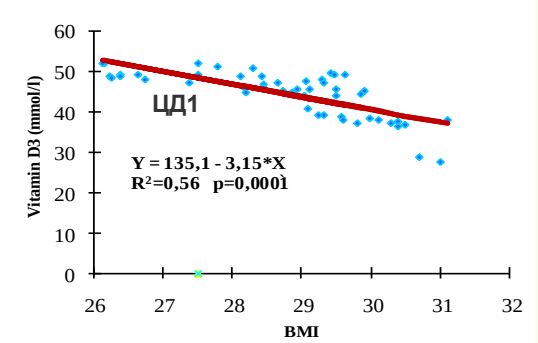
Вміст $25OHD_3$ у сироватці крові (маркер забезпеченості організму вітаміном D) за різних фізіологічних станів вагітних жінок та новонароджених дітей, нмоль/л

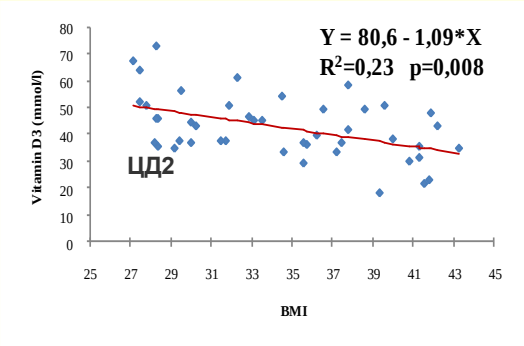
	Практично здорові	Вітамін D дефіцитні	Жінки, хворі на цукровий діабет	Вітамін D компенсовані
	Вміст $25OHD_3$ в сироватці крові, нмоль/л			
Вагітні жінки	65,0 ± 4,8	32,7 ± 2,5*	20,3 ± 1,4*	98,3 ± 5,6*,#
Новонароджені діти	59,0 ± 3,9	26,2 ± 1,7*	18,1 ± 1,3*	103,2 ± 7,9*,#

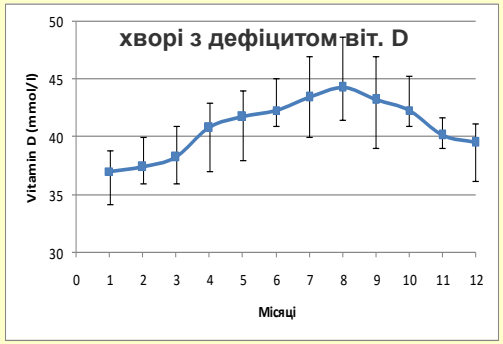
Вміст $25OHD_3$ у сироватці крові в нормі складає 75-125 нмоль/л.

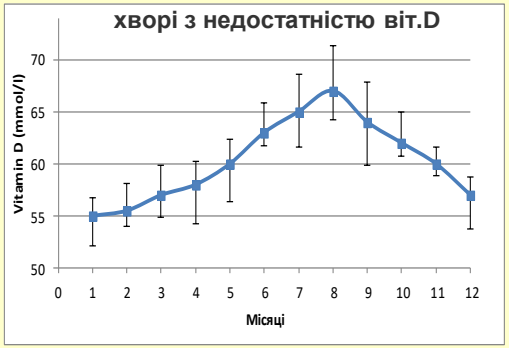
Вплив різних чинників на стан забезпечення вітаміном D_3 хворих на ЦД1 та ЦД2

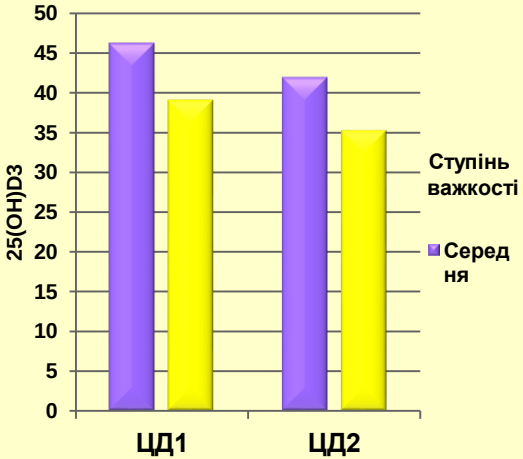
Чинники: стать, вік, антропометричні дані, ступінь важкості та тривалість ЦД, сезонність











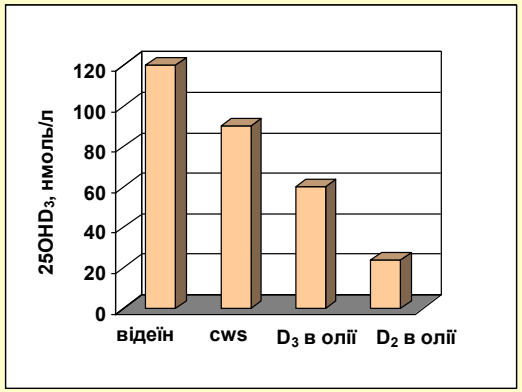
Стать: рівень вітаміну D_3 у жінок вищий, ніж у чоловіків як за ЦД 1, так і ЦД 2 типу; 44,5% жінок та 62,5% чоловіків мали дефіцит (різниця 18%)

“ВІДЕЇН” – комплекс вітаміну D_3 із протеїном молока казеїном (патент на винахід № 91805, товарний знак).

Вітамін D_3 забезпечує гомеостаз кальцію в організмі, остеогенез і ремоделювання кісткової тканини, регулює процеси диференціювання та проліферації практично всіх клітин організму

Згідно заключення експертів програми Tacis (2009р.), препарат **“ВІДЕЇН” має** унікальні характеристики порівняно з іншими препаратами вітаміну D_3:

- в складі препарату вітамін D_3 перебуває у зв’язаному з протеїном стані, що є інноваційним підходом при створенні вітамінних препаратів;
- відзначається високою біодоступністю та терапевтичною ефективністю у синтезі $25OHD_3$ – біомаркеру забезпеченості організму вітаміном D_3.



Ефективність різних форм вітаміну D_3 у синтезі $25OHD_3$

Препарат “ВІДЕЇН” випускався на Київському вітамінному заводі впродовж 1997-2006 років, його випуск відновлено з 2020 року.
Препарат «Відеїн-3» випускається Компанією «БаДМ» (Київський вітамінний завод).

- **Препарат зареєстровано в СРСР, Україні, Російській федерації, Молдові, Бєларусі.**

Дефіцит вітаміну D – патології кісткової тканини:

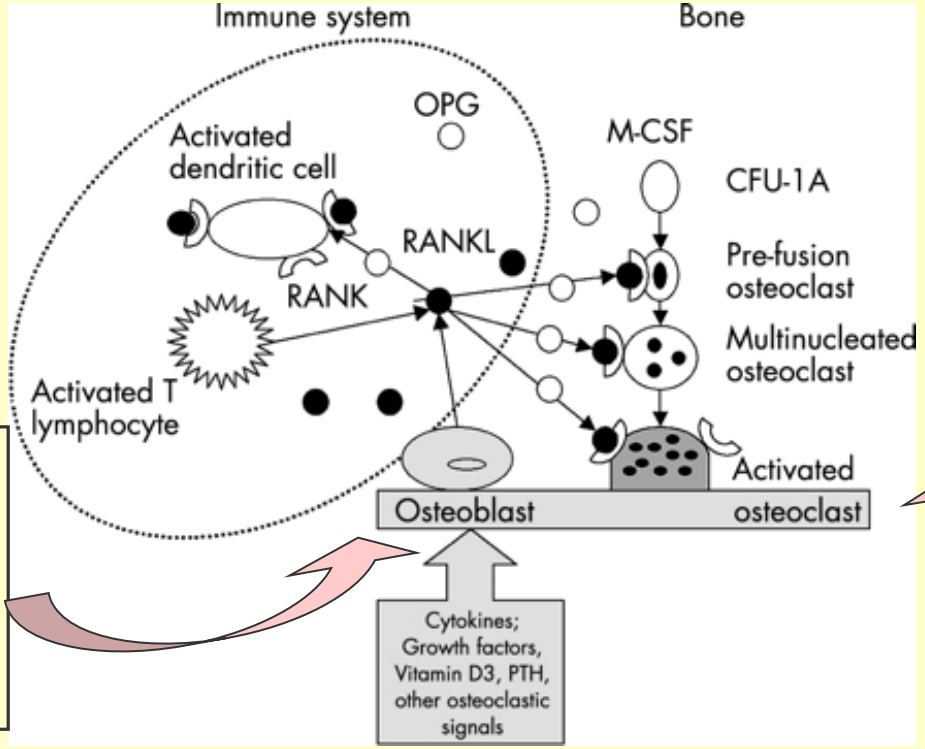
Рахіт
(у дитячому віці)

Остеопороз
(у дорослих)

Остеопороз – системне захворювання кісткової тканини, за якого відбувається порушення остеобластно-остеокластної взаємодії у процесі ремоделювання: резорбція переважає над остеосинтезом.

Ідея полягала у створенні комплексного препарату, компоненти якого гальмують резорбцію та посилюють синтез органічного матриксу.

Бісфосфонат – (метиленбіс-фосфонової кислоти динатрієва сіль) викликає загибель остеокластів і зменшує резорбцію кісткової тканини



Вітамін D і кальцій – активують остеобласти та посилюють остеосинтез (формування кісткової тканини)

“МЕБІВІД” – нова фармацевтична композиція для лікування захворювань кісткової тканини

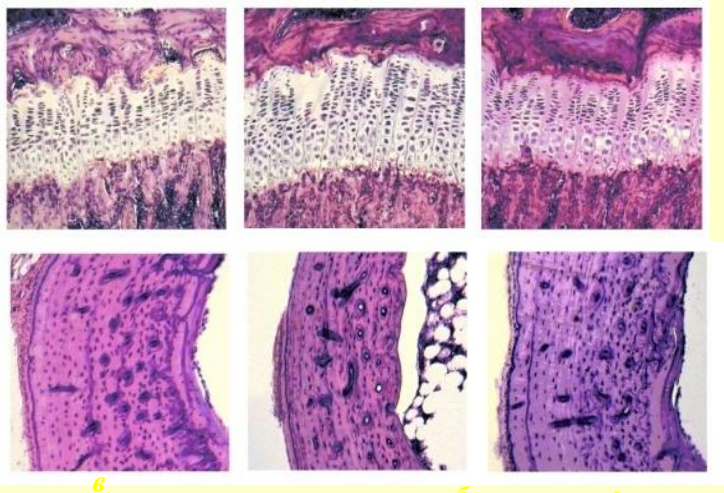
Активні компоненти комплексного препарату:

- **Вітамін D_3 та кальцій – посилюють** кісткоутворення;
- **Метиленбісфосфонова кислота –** інгібує активність остеокластів та знижує резорбцію кісткової тканини.

МЕБІВІД – препарат комплексної дії, пропонується для лікування одного з найпоширеніших захворювань скелету – остеопорозу. В основі розвитку патології лежить порушення остеобластно/остеокластної рівноваги в процесі ремоделювання: зростає активність остеокластів, посилюється резорбція кісткової тканини та пригнічується процес кісткоутворення.

Результатом застосування препарату **МЕБІВІД** є збільшення кісткової маси, усунення проявів остеопорозу, а відтак – зменшення ризику перелому як кісток, так і хребців.

Патент на винахід № 85493

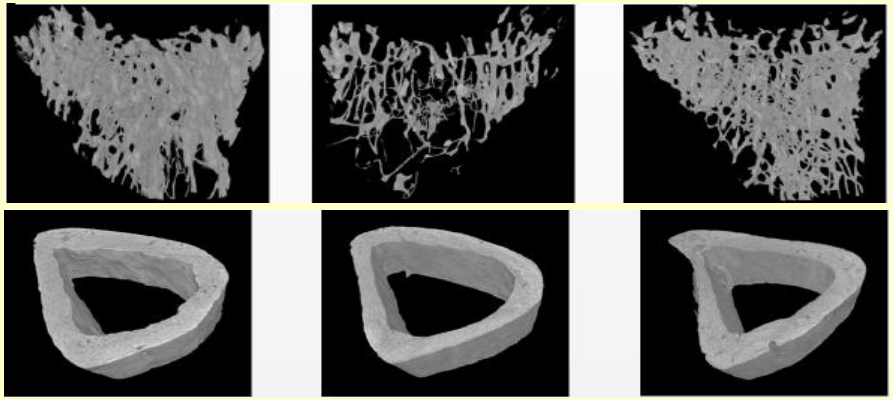


а б в

Вплив препарату МЕБІВІД на структурно-функціональну організацію проксимального епіфізарного хряща (А) та компактної кісткової тканини (Б) великогомілкової кістки за умов аліментарного остеопорозу:
а – контроль; б - остеопороз; в – остеопороз + МЕБІВІД.

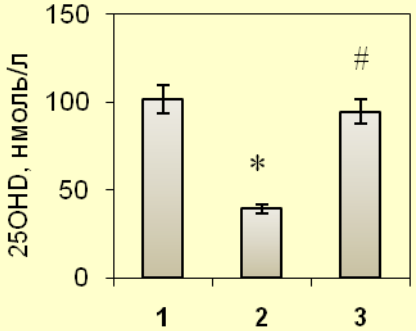
Механізм ремоделювання кісткової тканини за преднізолон-індукованого остеопорозу та дії вітаміну D_3 “Мебівід”

Томографія губчастої та компактної речовини великогомілкової кістки

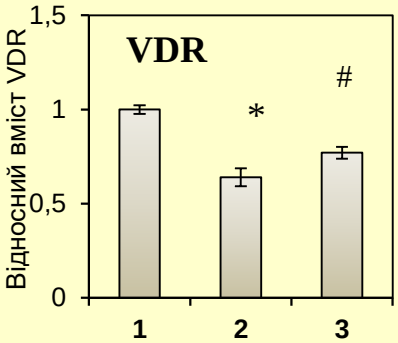


Контроль | Остеопороз | Остеопороз+D_3 Мебівід

Вміст 25OHD у сироватці крові

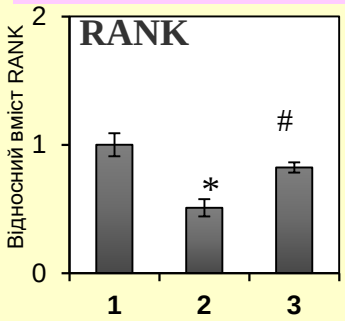


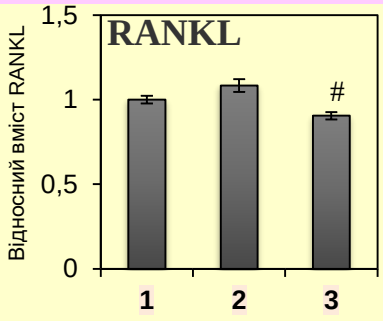
Вміст рецепторів вітаміну D у кістковій тканині

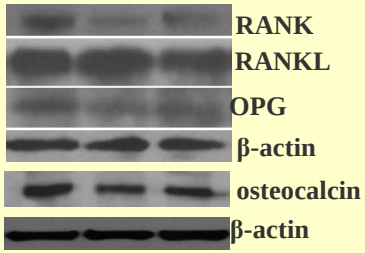


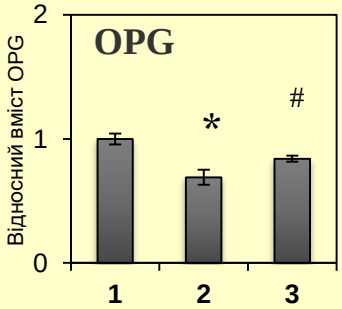
1 – контроль; 2 – введення преднізолону;
3 – преднізолон + вітамін D_3 Мебівід (M±m, n=6)

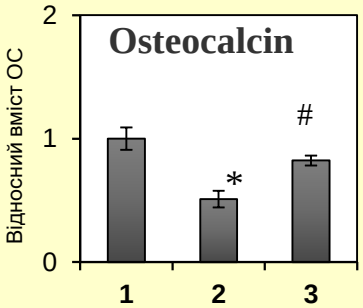
Система RANKL/RANK/OPG у кістковій тканині





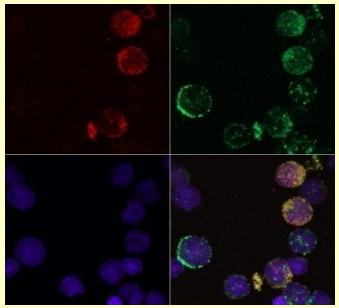




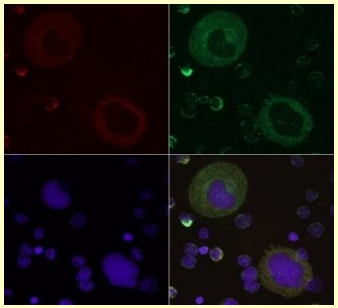


Колокалізація RANK та VDR у клітинах кісткового мозку

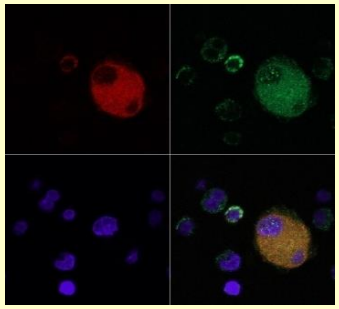
VDR – червоний канал; RANK – зелений канал;
ядра клітин (Hoechst) – синій канал



Контроль

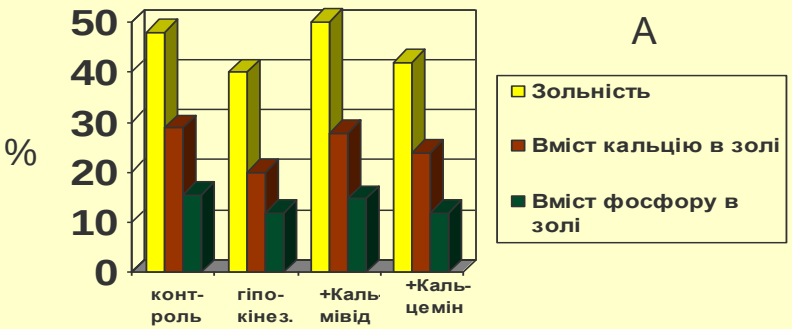


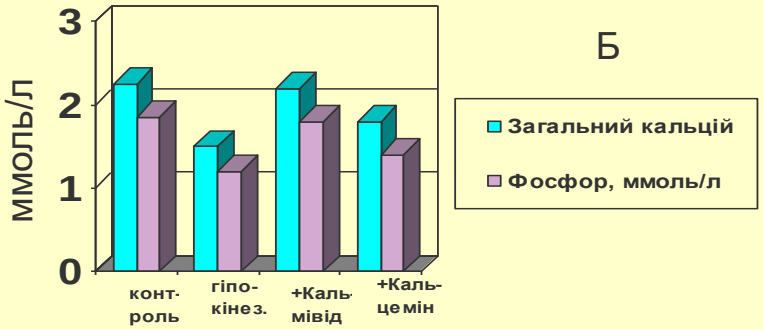
Остеопороз

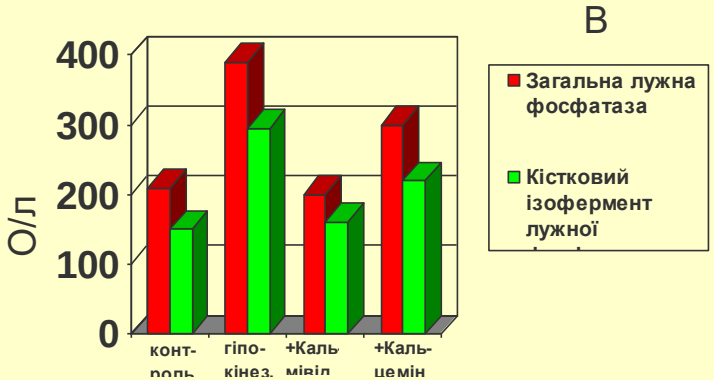


О +D_3 Мебівід

“КАЛЬМІВІД”







Кальмівід – комплекс вітамінів D_3, Е, мінеральних компонентів та мікроелементів

Використовується для профілактики та лікування захворювань кісткової системи.

- **Нормалізує зольність та вміст кальцію, фосфору у кістковій тканині (А);**
- **Підвищує у сироватці крові вміст кальцію та фосфатів (Б);**
- **Знижує активність загальної лужної фосфатази та її кісткового ізоензиму, які є маркерами формування кістки, ступеню прогресування хвороби та ефективності лікування (В);**
- **Ефективно нормалізує структурно-функціональний стан кісткової тканини;**

Імуноензимна тест-система для визначення вмісту гідроксильованої форми вітаміну D (25OHD) як маркера вітамін D-дефіцитного стану

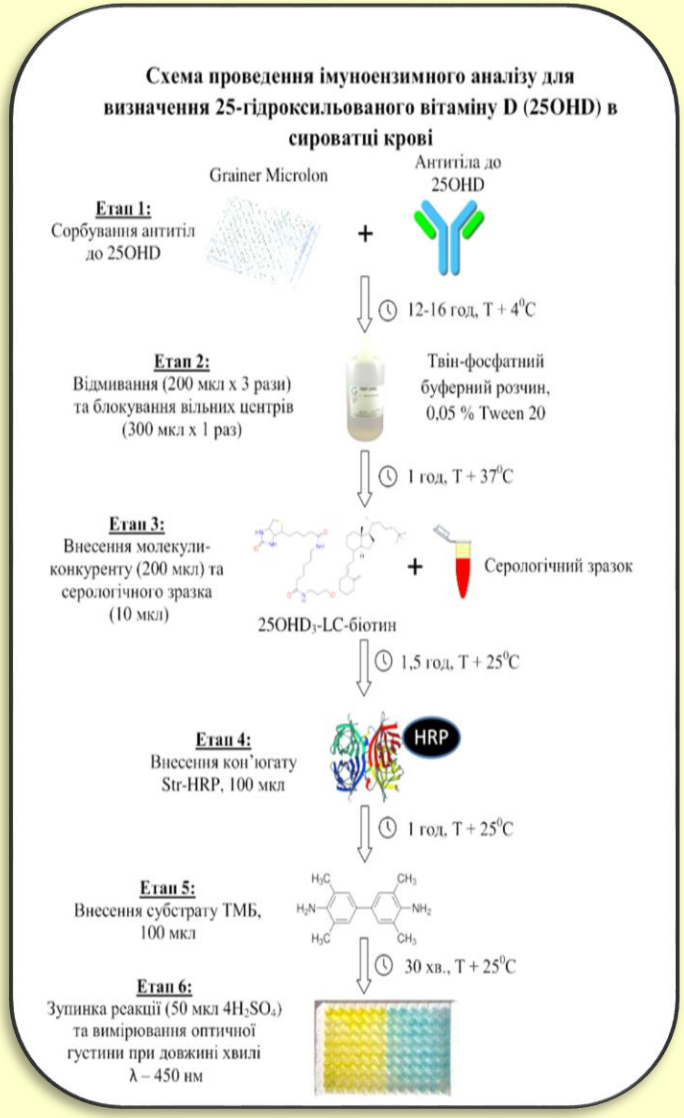
Критерії забезпеченості вітаміном D за вмістом 25OHD в крові

	Концентрація 25OHD		Стан забезпеченості
	нг·мл$^{-1}$	нмоль·л$^{-1}$	
1.	30 - 50	75 - 125	Норма
2.	20 - 30	50 - 75	D - вітамінна недостатність
3.	< 20	< 50	D - вітамінний дефіцит

Створено високоефективну імуноензимну тест-систему для визначення вмісту гідроксильованої форми вітаміну D (25OHD) в сироватці крові пацієнтів. Тест-система сконструйована на основі специфічних до 25OHD антитіл, отриманих з використанням кон'югантів 25OHD$_3$ з гемоціаніном молюска (KLH). Висока чутливість тест-системи забезпечується використанням біотин-стрептавідинового підсилення і візуалізації специфічного сигналу за участю молекул стрептавідину, мічених пероксидазою хрону, що підтверджено рядом стандартних валідаційних характеристик (чутливість, перехресна реактивність та точність).

Тест-система дозволяє виявляти наномолярні (нано-грамові) кількості 25OHD в сироватці крові.

Зразки створеної імуноензимної тест-системи для кількісного визначення 25OHD в крові



За результатами виконаної роботи:

Отримано:

- **15 патентів України;**
- **Свідоцтво про державну реєстрацію № UA/15531/01/01 на препарат «Метовітан».**

Захищено:

- **15 докторських і 29 кандидатських дисертацій.**

Опубліковано:

- **355 публікацій, в т.ч. 10 вітчизняних монографій, окремі глави в 4 зарубіжних монографіях, 5 підручників, 6 методичних посібників, 303 статті (84 – англомовні);**
- **Згідно бази даних Web of Sciense загальна кількість посилань на публікації авторів, представлені в роботі, складає 815, h-індекс = 15;**
- **Згідно бази даних Scopus: посилань – 856, h-індекс = 15;**
- **Згідно бази даних Google Scholar: посилань – 1330, h-інд. = 20.**