

ІСТОРІЯ БІОХІМІЇ

УДК 577.161.22:615.272:612.753

doi: <http://dx.doi.org/10.15407/ubj87.06.162>

ІСТОРІЯ СТВОРЕННЯ І ВИВЧЕННЯ ПРЕПАРАТІВ ВІТАМІНУ D В ЛАБОРАТОРІЇ МЕДИЧНОЇ БІОХІМІЇ ІНСТИТУТУ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ ЗА ПЕРІОД 1990–2015 рр.

*Н. Е. ЛУГОВСЬКА, Г. Г. ЛУГОВСЬКА, І. Г. ЧЕРНИШ,
С. П. ЮРАСОВА, В. М. ДАНИЛОВА*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: tto@biochem.kiev.ua*

Лабораторію медичної біохімії було створено в 1990 р. на базі міжінститутської лабораторії, яка була заснована у 1985 р. доктором біологічних наук, професором **В. П. Вендтом** Інститутом біохімії АН УРСР і Київським НДІ педіатрії, акушерства та гінекології МОЗ УРСР для вирішення питань профілактики та лікування рахіту в дітей і D-гіповітамінозу. Керівником лабораторії медичної біохімії стала учениця та послідовниця професора В. П. Вендта, кандидат біологічних наук **Лариса Іванівна Апуховська**, яка керувала лабораторією впродовж 20 років. Із 2010 р. лабораторію медичної біохімії очолює доктор біологічних наук, професор **Микола Миколайович Великий**.

Основна спрямованість наукової діяльності лабораторії медичної біохімії стала продовжен-

ням фундаментальних досліджень і практичних розробок, що проводилися в Інституті біохімії ще з початку 1950-х років у відділі фотобіохімії, який згодом було перейменовано у відділ біохімії стеринів, під керівництвом видатного вченого-біохіміка в галузі біотехнології та вітамінології професора В. П. Вендта, і де відбулося становлення **Л. І. Апуховської** як науковця.

Наукові дослідження лабораторії медичної біохімії були направлені на вивчення процесів метаболізму вітамінів D (D_2 і D_3) за норми та за деяких патологій, встановлення механізмів порушення обміну речовин (мінерального, ліпідного, вуглеводного тощо) та структурно-функціонального стану органів і систем за патологічних станів, які супроводжуються D-гіповітамінозом (рахіт, цукровий діабет, ревматоїдний артрит, остеопороз, остеопенія, коксартроз та ін.), що



Д. б. н., професор В. П. Вендт



К. б. н., ст. наук. співр. Л. І. Апуховська

дало можливість розробити і запропонувати низку високоефективних препаратів вітаміну D₃ для медицини та сільського господарства.

Клінічні дослідження розроблених медичних препаратів проводилися на базі Інституту педіатрії, акушерства та гінекології АМН України, клініки «ОХМАДИТ», Інституту травматології та ортопедії НАМН України.

Ще в 1950-х роках минулого століття під керівництвом професора В. П. Вендта було розроблено спосіб одержання нових форм вітаміну D – комплексу ергокальциферолу та холекальциферолу з протеїном молока – казеїном [1] і створено пристрій для одержання препарату вітаміну D [2]. Виявилося, що така протеїнова форма вітаміну D була стійкою до деструкції під час зберігання, а біологічна активність її була не нижчою, ніж у незв'язаних форм вітаміну D.

У 1954 р. на Київському вітамінному заводі вперше в СРСР було випущено партію препарату вітаміну D₃, виготовленого за технологією, розробленою в Інституті біохімії АН УРСР під керівництвом професора В. П. Вендта. Цей препарат призначався як вітамінна кормова добавка для профілактики рахіту курчат і курей-несучок. Перевага вітаміну D₃ у порівнянні з вітаміном D₂, який випускався раніше, полягала в тому, що його біологічна активність для птахів була вищою майже в 30 разів. Використання цього вітаміну D₃ збільшувалося з кожним роком. З часом розчин вітаміну D₃ в олії було замінено на порошок: комплекс вітаміну D₃ із казеїном. Така форма виявилася зручнішою для дозування і включення препарату в кормові суміші [3].

До широких досліджень біологічної активності комплексів вітамінів D₂ і D₃ з казеїном проф. В. П. Вендт залучив Інститут охорони материнства і дитинства (с. н. с. А. М. Хвувль), Інститут біології АН Латвії, Рига (проф. А. Р. Вальдман) та Інститут птахівництва ВАСГНІЛ, Москва (канд. біол. наук Н. Ф. Квашелі).

У 1973 р. професором В. П. Вендтом зі співробітниками Р. І. Яхимович і В. А. Богуславським було отримано авторське свідоцтво СРСР на спосіб одержання комплексу вітаміну D₃ з холестеролом, названого авторами «Відехол» і впровадженого у виробництво як препарат, що регулює обмін кальцію та фосфору (прискорює всмоктування кальцію в кишечнику та покращує реабсорбцію фосфору в нирках), сприяє форму-

ванню кісткового скелета й зубів, а також збереженню структури кісток [4]. Ємність зв'язування стеринів із протеїном на той час становила 60%, що було недостатньо, тому продовжувалися комплексні роботи з його вдосконалення.

Препарат «Відехол» і досі виробляється на ЗАТ НПК «Ехо» (РФ).

У 1980-х роках під керівництвом професора В. П. Вендта було розроблено й впроваджено в сільське господарство препарати: «D₃-вітамінна кормова добавка» [5] і «Протирахітна добавка в корм для птахів» [6].

Доцільність розробки технології одержання медичного препарату вітаміну D₃ була обумовлена тим, що цей вітамін є продуктом перетворення 7-дегідрохолестеролу й за своєю природою та дією ближчий до природних протирахітних факторів, які утворюються в шкірі за дії ультрафіолетової сонячної чи штучної радіації, порівняно з вітаміном D₂, який одержують з ергостерину дріжджів і який є сурогатом природних протирахітних речовин. Дослідні партії першого медичного препарату вітаміну D₃ для клінічних випробувань було виготовлено під керівництвом проф. В. П. Вендта в Інституті біохімії. Ці випробування, проведені в Київському науково-дослідному інституті педіатрії, акушерства і гінекології під керівництвом проф. О. М. Лук'янової, пройшли успішно. Лікувальне застосування вітаміну D₃ проводилося в клініках інституту, профілактичне – через міські поліклініки та дитячі заклади. Як результат систематичних досліджень – у Фармакологічному комітеті МОЗ СРСР було зареєстровано медичний препарат під назвою «Відеїн» для широкого використання для профілактики та лікування рахіту й затверджено розроблені інститутом інструкції з його застосування [3].

У 1980 р. д.б.н., професор В. П. Вендт і к.х.н. Р. І. Яхимович були удостоєні звання лауреатів Державної премії УРСР у галузі науки і техніки за цикл робіт «Дослідження з хімії та біохімії вітаміну D₃, створення промислової технології виробництва і впровадження в медицину та сільське господарство».

Отже, завдяки як дослідженням В. П. Вендта зі співробітниками, так і даним літератури, вже наприкінці 80-х років минулого сторіччя сформувалося чітке уявлення, що вітамін D₃ регулює обмін фосфору й кальцію в організмі,

сприяє нормальному формуванню та росту кісткової тканини, підвищує засвоєння кальцію і фосфору, бере участь у регулюванні не тільки мінерального обміну, а також обміну ліпідів і протеїнів, у тому числі гормонів, ензимів і рецепторів, у регулюванні проліферації та диференціювання клітин, а також у процесі модулювання імунної відповіді та функціональної активності печінки, серцево-судинної системи, кишково-шлункового тракту тощо. Л. І. Апуховська зі співробітниками приділила особливу увагу подальшому дослідженню вищезазначених аспектів.

Крім того, за тісного співробітництва лабораторії медичної біохімії Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України з Інститутом педіатрії акушерства і гінекології АМН України вивчалися механізми обміну вітаміну D₃ в системному поєднанні «мати – плід – новонароджений», роль вітаміну D₃ у формуванні функціональної зрілості плоду, в ембріональному, фетальному й постнатальному періоді життя, досліджувався взаємозв'язок тяжкості порушень обміну речовин від стану забезпеченості організму холекальциферолом за різних патологічних станів і розроблялися методичні рекомендації щодо корекції цих порушень, у тому числі з використанням препаратів вітаміну D₃.

З перших років існування лабораторії медичної біохімії під керівництвом Л. І. Апуховської проводилися роботи щодо подальшого вдосконалення протеїнової форми вітаміну D₃ та створення технології промислового випуску медичного препарату під торговельними марками «ВІДЕІН», «ВИДЕИН» і «VIDEIN» [7–9].

Удосконалення технології промислового виробництва цього препарату було досягнуто шляхом покращення якості його очистки, що забезпечило підвищення активності й стабільності препарату та, як наслідок, підсилення терапевтичної дії за лікування рахіту [10]. Як вітамін D₃-вмісний компонент використовували препарат «Відехол», до якого додавали вітамін Е та розчиняли в спирті. Загальна схема вдосконаленого способу включає три основні етапи: попередня очистка казеїну, одержання вітаміну D₃-протеїнового комплексу, одержання таблетованої форми препарату «ВІДЕІН». Запропонована технологічна схема,

умови та режими операцій дозволили виробляти високоочищений препарат для застосування в медицині з виходом 98,6–99,0%, який зберігав 99% активності протягом 2,5 років і 90–95% активності протягом 3–4 років.

На Київському вітамінному заводі разом зі співробітниками лабораторії медичної біохімії Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України було налагоджено промисловий випуск медичного препарату «ВІДЕІН» за новою вдосконаленою технологією і впроваджено його в педіатричну практику в Україні та Російській Федерації як препарату вітаміну D₃ для дітей, народжених після аварії на ЧАЕС. Л. І. Апуховська особисто контролювала на заводі кожну стадію технологічного процесу й відповідність якості препарату вимогам аналітико-нормативної документації.

Звичайна форма вітаміну D₃ має властивість окислюватись із часом під час зберігання й втрачати свою біологічну активність, що призводить до зниження лікувальної дії препарату. Для призупинення процесу розпаду вітаміну D₃ в усіх його препаратах, що представлені на фармацевтичному ринку України, зазвичай застосовують штучні консерванти й стабілізатори. Винятком із цього став препарат «ВІДЕІН», в якому вітамін D₃ подвійно стабілізовано холецестеролом та казеїном, що дозволило протягом усього терміну зберігання препарату мати стабільну, незмінну концентрацію вітаміну D₃, а отже, точність дозування та гарантований позитивний результат лікування впродовж усього терміну придатності препарату. Перевагою препарату «ВІДЕІН» перед аналогами препаратів вітаміну D є відсутність в його складі консервантів, стабілізаторів і штучних барвників, що зменшує ризик сенсibilізації й розвитку алергічних реакцій.

Клінічну ефективність і безпеку препарату «ВІДЕІН» доведено багаторічним досвідом застосування. Дослідження біологічної активності вдосконаленого препарату «ВІДЕІН» показало, передусім, його істотні переваги в терапевтичній ефективності у лікуванні рахіту. Така форма препарату також забезпечує можливість його застосування у разі шлунково-кишкових захворювань, виключає шкідливу дію розчинників на організм новонароджених дітей. Результати клінічних досліджень застосування таблетованої форми препарату «ВІДЕІН» для

лікування рахіту та рахітоподібних захворювань у дітей, D-гіповітамінозу у вагітних і низки захворювань кісткової системи свідчать про високу лікувальну активність препарату, що дає можливість прискорити терміни одужання та ліквідувати патологічні зміни [11, 12].

Більше того, колективом лабораторії медичної біохімії під керівництвом Л. І. Апуховської було розроблено спосіб профілактики та супровідної терапії цукрового діабету з використанням препарату вітаміну D₃ [13], який, як показали проведені експериментальні дослідження, виявляє гіпоглікемічну дію і чинить протекторний вплив на структуру й функцію β-клітин підшлункової залози. Розробниками експериментально було доведено, що застосування препарату вітаміну D₃ сприяє послабленню перебігу цукрового діабету. Встановлено, що для профілактики цукрового діабету препарат вітаміну D₃ рекомендується призначати перорально у фізіологічній дозі. Лікування цукрового діабету I-го типу доцільно проводити з використанням препаратів вітаміну D₃ та інсуліну в зменшених дозах [14], оскільки вітамін D депонується в печінці. Інсулін регулює обмін глюкози в організмі, але не відновлює структуру й функцію β-клітин підшлункової залози, тому сумісне застосування препаратів інсуліну та вітаміну D₃ для лікування цієї патології є необхідним та перспективним через те, що вітамін D₃ має гіпоглікемічну дію і при цьому нормалізує структуру та функцію β-клітин підшлункової залози. Ефективність препарату у лікуванні цукрового діабету підтверджено клінічними дослідженнями [15].

Подальше вдосконалення способу одержання модифікованого препарату «ВІДЕІН», що проводилося в лабораторії медичної біохімії, завершилося створенням спеціальної технології виготовлення готової форми оригінального препарату вітаміну D₃, який отримав назву «ВІДЕІН 3» і не має аналогів у всій Східній та Центральній Європі. Зв'язування вітаміну з протеїном у цьому препараті досягає 98%. Процент всмоктування вітаміну D₃ у формі «ВІДЕІН 3» становить 85–90%. Курсові дози препарату відповідають фізіологічним потребам організму та обґрунтовуються періодом часу депонування вітаміну D₃ в печінці.

Препарат «ВІДЕІН 3» рекомендовано застосовувати для профілактики й лікування

рахіту та рахітоподібних захворювань у дітей, остеопатій різного генезу, D-гіповітамінозу у вагітних жінок, порушень мінерального обміну (остеомаляція, остеопороз), у хворих після операції з приводу імплантації штучних суглобів, за ортопедичних деформацій, за уповільненої консолідації переломів, у разі втрати кальцію в кістках і зубах. «ВІДЕІН 3» сприяє нормальному функціонуванню парашитовидної, підшлункової залоз, серцево-судинної системи тощо. З метою профілактики рахіту «ВІДЕІН 3» застосовується в доношених дітей із другого місяця, а в недоношених – з десятого дня життя. Вагітним жінкам препарат призначають з першого тижня вагітності.

За висновками міжнародної експертизи програми TACIS, виконаної для ЗАТ «Київський вітамінний завод» у 2006 р., «ВІДЕІН 3» є унікальним препаратом: «За результатами лабораторних та клінічних досліджень «ВІДЕІН 3» є дуже ефективним та легкозасвоюваним вітаміном D₃. Препарат «ВІДЕІН 3» виробництва Київського вітамінного заводу містить тільки натуральні компоненти, не містить консервантів або стабілізаторів. Дуже важливою особливістю цього оригінального препарату є те, що активна речовина (вітамін D₃) знаходиться в комплексі з протеїном молока – казеїном, що значно покращує засвоюваність та транспортні можливості. Доведено, що «ВІДЕІН 3» є ефективним протирахітним препаратом, стимулює абсорбцію кальцію та фосфору в кишечнику, реабсорбцію кальцію та фосфору в нирках. Його можна використовувати для імунокорекції, посттравматичної реабілітації, за терапії гепатитів та деяких серцево-судинних захворювань. Адекватної реклами цього препарату не було проведено, отже, як результат, 100% опитаних лікарів нічого про цей препарат не знали». Тому міжнародна експертиза програми TACIS дає таку рекомендацію: «Рекламна компанія має робити особливий наголос та підкреслювати той факт, що «ВІДЕІН 3» є унікальним препаратом порівняно з іншими препаратами на ринку, що містять вітамін D₃. Необхідно проводити активну роботу з лікарями через медичних представників».

У 1997 р. за результатами Всеукраїнської виставки-конкурсу лікувальних засобів та продуктів харчування, що сприяють виведенню радіонуклідів із організму людини та

її оздоровленню препарат «ВІДЕЇН 3» виробництва Київського вітамінного заводу було визнано кращим в Україні та нагороджено Знаком благодійства за високу якість та технологічні досягнення з врученням Диплому Міжнародної асоціації «Допомога родинам Чорнобиля».

Препарат «ВІДЕЇН 3» може серійно виготовлятися на стандартному обладнанні фармацевтичних виробництв. «ВІДЕЇН 3» виробництва Київського вітамінного заводу було зареєстровано в Україні, РФ, Молдові та Білорусі. На жаль, нове керівництво ПАТ «Київський вітамінний завод» поставило прибутку підприємства на перше місце перед доцільністю випуску унікального вітчизняного препарату, і завод припинив випуск препарату «ВІДЕЇН 3», оскільки вітчизняна технологія його виготовлення стала більш високоартісною, ніж фасування зарубіжних фармацевтичних субстанцій.

Для профілактики та лікування хвороб, пов'язаних із дефіцитом вітаміну D_3 в дітей з перших місяців життя, важливим є застосування препарату вітаміну D_3 в рідкій формі. З цією метою в лабораторії медичної біохімії було розроблено водорозчинний препарат вітаміну D_3 . Він має виготовлятися у вигляді ліофільно висушеного продукту у флаконах, що, на відміну від відомих раніше водорозчинних препаратів, які містять похідні вітаміну D_3 , дає можливість одержати водорозчинний вітамінний препарат тривалого терміну зберігання. Таких властивостей препарат набуває завдяки присутності в його складі емульгатора фосфатидилхоліну (лецитину) та поліетиленгліколю. Для його виготовлення не використовуються консерванти як допоміжні речовини та інші компоненти, які, як правило, токсичні, здатні спричинювати побічні ефекти та згідно з рекомендаціями ВООЗ заборонені для призначення дітям до 5 років. Запропонована водорозчинна форма препарату вітаміну D_3 характеризується високою профілактично-лікувальною ефективністю, не спричинює побічні ефекти та має довгий термін зберігання (2,5 роки). Було показано, що застосування у водорозчинному препараті вітаміну D_3 його комплексу з холестерином (Відехолу) зменшує процес окислення холестерину в кишково-шлунковому тракті після перорального прийому, й, таким чином, збільшує його ефективність. Препарат забезпечує проліферацію й диференціювання

клітин, дозволяє нормалізувати обмін речовин, покращує стан імунної системи та функціональну активність органів і систем, забезпечує повне засвоєння мінеральних речовин у кишково-шлунковому тракті, регулює їх абсорбцію в нирках [16].

За нестачі в організмі вітаміну D_3 , мінералів і мікроелементів, що призводить до порушення процесу кісткоутворення, важливим є застосування препарату вітаміну D_3 в комплексі з мінералами та мікроелементами. Дослідження, проведені в лабораторії медичної біохімії в цьому напрямі, завершилися розробкою вітамінно-мінерального комплексу для лікування захворювань кісткової тканини, пов'язаних із порушеннями мінерального обміну та процесу кісткоутворення, до складу якого, крім вітаміну D_3 у комплексі з казеїном, включено кальцій, фосфор, цинк, мідь і марганець у чітко встановлених пропорціях та наповнювач [17]. Цей вітамінно-мінеральний комплекс у подальшому було зареєстровано під торговельною маркою «КАЛЬМІВІД» [18].

Відомо, що кальцій бере участь у регулюванні багатьох біологічних процесів. За нестачі кальцію в плазмі крові необхідна його концентрація відновлюється за рахунок вивільнення з кісткової тканини, внаслідок чого зменшується її маса, мінералізація та активність остеобластів. Порушення біодоступності кальцію визначається багатьма факторами, в тому числі інгібуванням його транспортування в кишечнику та обміну в кістковій тканині. Ці процеси регулюються активними метаболітами вітаміну D_3 . Важливу роль в організмі, зокрема і у функціонуванні кісткової тканини, відіграє фосфор. До 85% фосфору, що міститься в організмі людини, входить до складу кісткової тканини, утворюючи кристали гідроксіапатиту. Дисбаланс між співвідношенням рівня кальцію та фосфору призводить до зміни щільності кісткової тканини та порушення її мінералізації. Кальцій та фосфор регулюють активність D_3 -гідроксилазних ферментів, внаслідок чого активуються всі процеси, що регулюються вітаміном D_3 , зміцнюється імунітет, нормалізується мінеральний, ліпідний та протеїновий обмін, підтримується функціональна активність органів та систем, що підвищує якість життя.

З метою підбору оптимального рівня кальцію в препараті «КАЛЬМІВІД»

співробітниками лабораторії медичної біохімії було проведено дослідження щодо впливу різних доз кальцію на його обмін в організмі. Сумісно з Інститутом травматології та ортопедії НАМН України було показано, що в разі одержання тваринами високих доз кальцію спостерігається зменшення його концентрації в сироватці крові, а також відбуваються структурно-функціональні зміни епіфізарного хряща та процесів хондрогенезу й ендохондріального заостеніння, майже повністю зникає зона проліферації та зона колонок хрящових клітин [19]. Надлишкове введення кальцію призводить до зменшення рівня діоксихолекальциферолів. Позитивний баланс мінерального обміну відмічався за сумісного введення низьких доз кальцію та вітаміну D₃, причому відбувалося збільшення товщини діафіза стегнової кістки, шару й компактної речовини та активізація хондро- й остеогенезу в зонах росту. Отже, препарат із низьким вмістом кальцію виявився ефективнішим для нормалізації мінерального й ліпідного обмінів, структури і функції кісткової тканини та епіфізарного хряща.

Зараз для лікування остеопорозу в арсеналі лікарів є велика кількість препаратів, але вони мають певні недоліки порівняно з препаратом «КАЛЬМІВІД». Так, наприклад, відомий препарат з аналогічною дією «Кальцинова» (Calcinova, KRKA, Словенія) містить у своєму складі вітамін D₃ у вигляді холекальциферолу. Нестабільність молекули вітаміну D₃ є головним недоліком цього препарату, внаслідок чого знижується його ефективність, мають місце побічні ефекти у вигляді алергічних реакцій на продукти окислення вітаміну D₃, болі в животі, нудота. Вітамін D₃ цього препарату зазнає руйнування в шлунково-кишковому тракті, що знижує його активність, а неоптимальне співвідношення компонентів препарату може призводити до гіперкальціємії та інгібування обміну речовин [19]. Недоліком іншого відомого вітамінно-мінерального препарату-аналога для лікування остеопорозу «Кальцемін Адванс» (Сагмел, Інк., США), який містить у разовій дозі 200 МО вітаміну D₃ у вигляді холекальциферолу, є нестабільність вітаміну D₃ та занадто висока доза кальцію (500 мг), що призводить до інгібування активного транспортування кальцію в ентероцитах і супроводжується гіпокальціємією. Внаслідок цього розвивається вторинний

гіперпаратиреоз, який призводить до резорбції мінеральних компонентів із кісткової тканини. Препарат «Кальцемін Адванс» в максимально рекомендованій дозі не сприяє нормалізації порушеного мінерального обміну кісткової тканини, тобто чинить дозозалежний негативний вплив на стан кісткової тканини, побічними діями його є нудота, блювання, метеоризм, діарея, запор, гіперкальціємія і гіперкальціурія, алергічні реакції (зуд, висипання, кропив'янка) [19].

Розроблений Л. І. Апуховською зі співробітниками вітамінно-мінеральний препарат «КАЛЬМІВІД» стійкіший, а, отже, ефективніший і безпечніший, не виявляє побічної дії за довготривалого використання порівняно з комерційними препаратами «Кальцинова» і «Кальцемін Адванс» [19].

Такий результат досягається завдяки тому, що вітамін D₃ до складу препарату входить у вигляді комплексу з казеїном, що значно підвищує термін зберігання препарату та запобігає його окисленню з утворенням токсичних продуктів, а також знижує вплив на препарат речовин – детергентів шлунково-кишкового тракту. Раціональний підбір оптимальної кількості мінеральних добавок (кальцій, фосфор, мідь, цинк і марганець) створює умови для підсилення лікувальної дії препарату. Оптимальне співвідношення в препараті кальцій : фосфор виключає утворення низькорозчинних солей цих компонентів. Мідь активізує низку ензимів в остеогенних клітинах та справляє вплив на їх диференціювання, регулює активність супероксиддисмутази і каталази, чим забезпечує первинний захист від вільних радикалів. Цинк активізує лужну фосфатазу та мінеральний обмін у кістковій тканині, бере участь у забезпеченні її нормального росту. Марганець регулює ензимні системи в організмі, синтез мукополісахаридів, визрівання колагенових фібрил; його нестача призводить до деформації та розм'якшення кісток і суглобів. Недостатність усіх цих елементів сприяє розвитку остеопорозу та остеоартрозу. Вказані мінеральні компоненти входять до складу препарату «КАЛЬМІВІД» у вигляді фармацевтично допустимих солей або оксидів. Відсутність побічних ефектів дає можливість застосовувати комплексний D-вітамінний препарат «КАЛЬМІВІД» у разі дисфункціонального остеопорозу [20]. В лабораторії медичної біохімії

було детально розроблено схему одержання цього вітамінно-мінерального комплексу.

У подальших дослідженнях Л. І. Апуховською зі співробітниками було виявлено, що для підвищення ефективності терапевтичної дії препарату «КАЛЬМІВІД» на структурно-функціональний стан кісткової тканини до його складу необхідно вводити вітамін Е. Було показано [21], що однією із причин недостатньої ефективної профілактичної та лікувальної дії препарату вітаміну D₃ є дефіцит вітаміну Е. Недостатність вітаміну Е призводить до кальцинозу м'язової системи на фоні гіпокальціємії та зниження транспортування кальцію. Вітамін Е – один із основних антиоксидантів, що забезпечує оптимальні умови функціонування мембранних рецепторів, систем мембранного транспорту та мембранних ензимів. Відомим є синергізм дії вітамінів D₃ та Е в нормалізації мінерального обміну та стану кісткової тканини внаслідок регуляторної ролі вітаміну Е в організмі через його вплив на транспорт вітаміну D₃ в гепатоцити та активність вітамін-D₃-гідроксилазних ензимів [21]. Ці фактори обґрунтовують більшу забезпеченість організму біологічно активними метаболітами вітаміну D₃ і, як наслідок, підвищену ефективність регулювання вищенаведених процесів. Вітамін Е регулює активність загальної лужної фосфатази за рахунок зниження активності кісткового ізоензиму та виходу кишкового ізоензиму з ентероцитів у кров, що супроводжується зростанням його вмісту в клітинах та більшою ефективністю нормалізації фосфорного обміну в організмі. Виявлено, що таку дію вітамін Е справляє в межах фізіологічної норми, вищі дози вітаміну Е (більше 15 мг в разовій дозі) пригнічують дію вітаміну D₃ в регулюванні мінерального обміну. Дані біохімічних досліджень було підтверджено результатами остеометрії і мікроскопії кісткової тканини. Визначено, що введення вітаміну Е до складу препарату вітаміну D₃ суттєво поліпшує структурно-функціональний стан кісткової тканини, структуру та функцію епіфізарного хряща [19].

Експериментально було показано, що введення до складу вітамінно-мінерального препарату «КАЛЬМІВІД» вітаміну Е зумовлює перерозподіл фракцій кальцію в сироватці крові в бік збільшення активної іонізованої форми. Препарат активніший та менш токсичний порівняно з комерційними препаратами. Термін зберігання

його – 5 років, на відміну від гранульованої форми вітаміну D₃, термін зберігання якого 2 роки [22]. Модифікований препарат «КАЛЬМІВІД», що містить зазначені компоненти, автори назвали «КАЛЬМІВІД М».

Статистичні дані свідчать про те, що порушення структурно-функціонального стану кісткової тканини є досить поширеними в світі як серед дорослих, так і серед дітей. Захворювання опорно-рухового апарату часто супроводжуються остеопорозом, в основі якого лежить втрата кісткової маси за збереження загального об'єму кістки, збільшення пористості та крихкості кісток. За остеопорозу в сироватці крові майже в три рази знижується рівень 25-гідроксихолекальциферолу (25ОНD₃), а стан D-гіповітамінозу призводить до зниження забезпеченості організму кальцієм та неорганічним фосфором, при цьому зростає активність лужної фосфатази та її ізоензимів.

Одним із найперспективніших винаходів співробітників лабораторії медичної біохімії спільно зі співробітниками відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України є фармацевтична композиція для лікування захворювань кісткової тканини, до складу якої входить вітамін D₃, кальцій та бісфосфонат (метиленбісфосфонові кислоти динатрієва сіль) [23]. Ця фармацевтична композиція в подальшому отримала Свідоцтво на знак для товарів і послуг «МЕБІВІД» [24].

Вітамін D₃ в цьому препараті може бути у вигляді протеїнового комплексу, наприклад, із казеїном, або в індивідуальному вигляді у формі CSW чи CWS. Препарат містить кальцій у вигляді карбонату кальцію, а також вітамін Е та наповнювач (целюлоза або лактоза та полівінілпіролідон).

Препарат «МЕБІВІД» істотно інгібує резорбцію кісткової тканини та стимулює остеосинтез завдяки вітаміну D₃, що входить до його складу, який активує кісткоутворення, та бісфосфонату, що інгібує резорбцію кісткової тканини. Він є активнішим і значно менш токсичним у порівнянні з комерційними препаратами. Бісфосфонати мають однакову біологічну активність з пірофосфатами, але значно більшу афінність до мінеральних компонентів кісток, завдяки чому можуть утворювати стабільні комплекси з кальційфосфатами гідроксіапатитів із великим періодом напівжиття [25] Механізм дії бісфосфонатів полягає в зниженні активності

остеокластів і може реалізуватися шляхом утворення нездатних до гідролізу аналогів АТР, що надає можливість інгібування АТР-залежних процесів у клітинах та апоптоз остеокластів. Бісфосфонати гальмують розпад гідроксіапатиту, ефективно пригнічуючи резорбцію кісток шляхом впливу на активність остеокластів. Тому їх призначення здатне зменшувати ризик переломів стегна, хребців та сприяти нормалізації структури кісткової тканини [26]. Вітамін D_3 активізує включення кальцію та фосфатів у структуру гідроксіапатитів, нормалізує процес ремодулювання кісткової тканини. Бісфосфонат зменшує ризик переломів на 50–80%.

Бісфосфонати в медичній практиці вводять до організму в поєднанні з активними метаболітами вітаміну D_3 . Але обмін речовин у клітинах кісткової тканини і процес кісткоутворення регулюється внутрішньоклітинно синтезованими метаболітами вітаміну D_3 . Тому в терапії пріоритетним є використання разом із бісфосфонатом саме вітаміну D_3 , а не його активних метаболітів.

Таким чином, препарат «МЕБІВІД» усуває порушення обміну вітаміну D_3 і мінерального обміну, має високу специфічну ефективність у лікуванні остеопорозу та в попередженні порушень метаболізму за остеопорозу, нормалізує знижену за остеопорозу фагоцитарну активність гранулоцитів і вміст імуноглобулінів IgG й IgA. На відміну від інших бісфосфонатів, які використовуються в медицині, зафіксовано синергізм дії вітаміну D_3 та динатрієвої солі метиленбісфосфонової кислоти за лікування остеопорозу препаратом «МЕБІВІД» [27].

Під керівництвом Л.І. Апуховської було розроблено технологію одержання препарату «МЕБІВІД» з найбільшою терапевтичною біоеквівалентністю та тривалим терміном зберігання. Термін зберігання препарату, що містить вітамін D_3 в комплексі із протеїном, становить 5 років, а гранульованої CWS-форми вітаміну D_3 – 2 роки. Фармацевтична композиція «МЕБІВІД» може бути виготовлена у вигляді твердої форми для перорального введення, наприклад, у вигляді капсул.

І, нарешті, ще одним винаходом колективу лабораторії медичної біохімії під керівництвом Л.І. Апуховської є «Спосіб одержання вітамін D_3 -Е протеїнового комплексу та одержаний цим спо-

собом лікувально-профілактичний вітамінний препарат», який вдосконалює промисловий спосіб одержання вітамін D_3 -Е протеїнового комплексу та готової форми відомого препарату «ВІДЕІН 3» [28]. Новий спосіб забезпечує підвищення ємності зв'язування вітамінів D_3 та Е з казеїном та міцність цих зв'язків, збільшення терміну зберігання вітамін D_3 -Е-вмісних препаратів у 2 рази та одержання очищеної від бактерій субстанції.

Загальна схема розробленого способу включає три основні етапи: попереднє очищення казеїну, завершальне очищення казеїну, одержання вітамін D_3 -Е протеїнового комплексу (субстанції) та готової лікарської форми препарату.

Цистеїн, як відомо, стабілізує третинну структуру казеїну внаслідок утворення ковалентних зв'язків, що є однією з причин зменшення доступності центрів зв'язування щодо вітамінів D_3 , Е або інших жиророзчинних вітамінів. Попереднє очищення казеїну, проведене шляхом переосадження його лужного розчину оцтовою кислотою, сприяє звільненню від незв'язаного та слабкозв'язаного цистеїну і знижує його вміст в казеїні на 50%.

Попереднє очищення казеїну знижує також вміст протеїнів зв'язаних ліпідів (загальних ліпідів на 50, фосфоліпідів на 60, загального холестеролу на 70%), які конкурують із жиророзчинними вітамінами за центри зв'язування із протеїном.

Ці два названі вище фактори підвищують ємність зв'язування вітамінів D_3 та Е з казеїном, внаслідок чого зв'язування вітаміну D_3 наближається до 100%, зростає можливість підвищення кількості введення вітаміну Е в протеїновий комплекс і терміну зберігання активних компонентів у препараті при кімнатній температурі практично з 2,6 до 5 років, у той час як термін зберігання діючих інгредієнтів за способом, використаним для створення найближчого аналога – лікувально-профілактичного вітамінного препарату «ВІДЕІН» – становить 2,5 року. Експериментально було встановлено умови для підвищення ємності зв'язування казеїну з вітаміном D_3 : оптимальний час знаходження казеїну в лужному розчині NaOH (від попереднього очищення казеїну – до утворення комплексу) не має перевищувати 3 год, оскільки зростання часу перебування його в лужному розчині знижує ємність зв'язування більш ніж на 20% [28].

Введення в технологічний цикл етапу завершального очищення казеїну шляхом пропускання розчину протеїну через мікро- або ультрафільтраційні мембрани з розміром пор 0,05–0,50 мкм забезпечує очищення цільового продукту від непатогенних бактерій і дріжджових грибків та робить його стерильним, що відповідає міжнародним вимогам [28].

Проведені експериментальні дослідження свідчать, що вітамін Е у комплексі з вітаміном D₃ підвищує вміст 25ОНD₃ шляхом активації вітаміну D₃ 25-гідроксилаз, які регулюють перетворення вітаміну D₃ на його перший активний метаболіт.

Із використанням способу [28] одержано ефективний препарат «Вітамін D₃-Е протеїновий комплекс» із розширеним допуском концентрацій вітамінів D₃ та Е і можливістю додаткового введення інших форм наповнювачів та розріджувачів з метою розширення можливостей використання препарату та підвищення його профілактичного та лікувального ефекту. Присутність у складі препарату вітаміну Е у фізіологічних дозах нормалізує структурно-функціональний стан кісткової тканини, структуру та функцію епіфізарного хряща. Створений цим способом лікувально-профілактичний вітамінний препарат D₃-Е протеїнового комплексу ефективно регулює метаболічні процеси.

Сировиною для цього препарату є вітамін D₃, який може бути застосований в різних фармацевтичних формах (відехолу, кристалічного вітаміну D₃); вітамін Е; фармацевтично допустимі наповнювачі (глюкоза, целюлоза, цукор тощо); розріджувачі або їх комбінації; ароматизатор (смаковий агент). Лікувально-профілактичний вітамінний препарат D₃-Е протеїновий комплекс може бути виготовлений у вигляді твердої разової форми (таблеток з плівковим покриттям, капсул, сипучого порошку), для нього зареєстровано торговельну марку «ВІДЕЇН-ЗДОРОВ'Я 3» [29].

Підсумовуючи аналіз діяльності лабораторії медичної біохімії під керівництвом Лариси Іванівни Апуховської, слід зазначити, що науковий та науково-практичний доробок цього колективу досить вагомий; він складається з 4 колективних монографій, 2 підручників, понад 286 наукових публікацій, 2 авторських свідоцтв СРСР, 16 патентів України, 1 патенту Російської Федерації та 5 методичних

рекомендацій. За матеріалами науково-дослідної роботи лабораторії, очолюваної Л. І. Апуховською, захищено 6 докторських та 14 кандидатських дисертацій.

Основними результатами винахідницької діяльності лабораторії медичної біохімії впродовж 1990–2015 рр. стали технології одержання низки високоефективних комплексних препаратів для лікування остеопорозу, остеопенії та інших патологій кісткової тканини. Зокрема, вдосконалено препарат «ВІДЕЇН» для лікування рахіту та рахітоподібних захворювань у дітей, D-гіповітамінозу у вагітних і низку захворювань кісткової системи; водорозчинний препарат вітаміну D₃ для профілактики та лікування хвороб, пов'язаних із дефіцитом вітаміну D₃ в дітей з перших місяців життя. Вітамінно-мінеральні препарати «КАЛЬМІВІД», «Кальмівід-М» запропоновано для лікування захворювань кісткової тканини, пов'язаних із порушеннями мінерального обміну, а фармацевтична композиція – «МЕБІВІД» для лікування остеопорозу та інших захворювань кісткової тканини; «Відеїн-3 (Відеїн-D₃)» для профілактики й лікування рахіту та рахітоподібних захворювань у дітей, остеопатій різного генезу, D-гіповітамінозу, в тому числі у вагітних, порушень мінерального обміну (остеомалаяції, остеопорозі), у хворих після операції з приводу імплантації штучних суглобів, ортопедичних деформацій, з явищами уповільненої консолідації переломів; лікувально-профілактичний препарат «Вітамін-D₃-Е протеїновий комплекс» – для регуляції метаболічних процесів, поліпшення структурно-функціонального стану кісткової тканини, структури та функції епіфізарного хряща.

Населення України має широкий попит на всі перелічені вище препарати; попри це, на жаль, вони наразі не випускаються фармацевтичними фірмами і підприємствами в нашій країні через (як пояснюють потенційні виробники) можливі фінансові ризики в кризовий період держави. Але, на нашу думку, саме в цей складний період в Україні мала б бути створена Державна програма оздоровлення нації, яка, в разі необхідності надавала би фінансову підтримку фармацевтичним підприємствам для впровадження вітчизняних інноваційних розробок медичних препаратів, зокрема і препаратів вітаміну D₃.

References

1. Aut. Cer. 104990 USSR, Cl₀₂. 12 p 17. The method of obtaining protein complexes with biologically active substances of lipid nature / V. P. Wendt, I. G. Drokova (USSR). No. 5337/453930; appl. 1956.26.05, publ. 1957.08.01., Bull. N 8. (In Russian).
2. Aut. Cer. USSR, Cl. 30 h 1. 164935 IPC A 61 k. Device for obtaining vitamin "D" / A. S. Nikolayev, A. V. Zelenschikova, V. P. Vendt, V. V. Belyavskaya, T.M. Egorova (USSR). No. 810762/31-16; appl. 1962.12.29.; publ. 1964.11.04., Bull. N 17. (In Russian).
3. Wendt V. P., Lukyanova E. M., Khokhlov I. N. VIDEIN-3 is a new antirickets medication cholecalciferol, its properties and use for the prevention and treatment of rickets in children / Kiev: Naukova Dumka, 1974, 47p. (In Russian).
4. Aut. Cer. 505188 USSR, IPC² C 07 C 72/00. Method of obtaining the vitamin D₃ complex with cholesterol / Robert J. Jahhimoviš, V. A. Boguslavsky, V. P. Wendt (USSR). – No. 1923301 / 23-4; appl. 05.22.73; 05.22.1973; registr. 05.22.1973, Chipboard. (In Russian).
5. Aut. Cer. 738585 USSR, IPC² A 61 K 31/59. "D₃"-vitamin feed additive, method of its obtaining and device for implementation of this method / V. P. Vendt, R. E. Yukhimovich, G. I. Samokhvalov, V. A. Bohuslavsky (USSR). No. 2334407 / 30-15; appl. 1978.22.07; publ. 1980.14.02, Bull. N 21. (In Russian).
6. Antirickets feed additive for poultry / Y. D. Kholodova, V. P. Wendt (USSR). No 2432741/31-13; appl. 20.12.76; registr. 08.06.89, Chipboard. (In Russian).
7. The Certificate 2114 UA on sign for commodities and services "VIDEIN", class 5: pharmaceutical preparations; the applicant and owner: the Palladin Institute of biochemistry of the NAS of Ukraine, 2003.05.19, the owner: PJSC "Kyiv vitamin factory". No. m128333; appl. 1990.12.03; publ. 1994.10.25, Bull. No.3, suspended 2011.09.13. publ. 2011.12.12. Bull. N 23.
8. The Certificate 2115 UA on sign for commodities and services "VIDEIN", class 5: pharmaceutical preparations; the applicant and owner: the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, 2003.05.19, the owner: PJSC "Kyiv vitamin factory". No. m128332; appl. 1990.12.03. publ. 1994.10.25, Bull. N 3. Suspended. 2011.09.13, publ. 2011.12.12, Bull. N 23.
9. The Certificate 8330 UA on sign for commodities and services "VIDEIN" class 5: pharmaceutical preparations; the applicant and owner: the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, 2003.05.19, the owner: PJSC "Kyiv vitamin factory". No. m502030; appl. 1993.05.19; publ. 1997.06.30, Bull. No.3. Suspended 2011.09.13, publ. 2011.12.12., Bull. N 23.
10. Pat. 828 UA, IPC A61K 31/593 (2006.01). A method of obtaining the vitamin D₃-protein medication "Videin" / Apukhovska L. I., Zagory V. A. Sokyрко V. I., Raksha A. S., Fursayeva N. F., Vasylevska V. M. The patent owner: Apukhovska L. I. No. 4941752 / SU; appl. 1991.08.04; publ. 1993.15.12, Bull. N 2. (In Ukraine).
11. Lukyanova E. M., Antipkin Yu. G., Omelchenko, L. I., Apukhovska L. I. Vitamin D and its role in ensuring health of children and pregnant women. Kiev: Expert, 2005. 230 p. (In Russian).
12. Chernobyl disaster. Health of women and children. Gynecology, Obstetrics, Pediatrics /Lukyanova E. M., Antipkin Yu. G., Apukhovska L. I., etc.; Ed. Acad. of NAMS of Ukraine Lukyanova E. M. Moscow: Znanie, 2003. 276 p. (In Russian).
13. Pat. 21361 UA, IPC⁶ A 61 K 31/59. A method of prevention and treatment of diabetes / Apukhovska L. I., Stefanov M. V., Lukyanova O. M., Omelchenko L. I.; applicants and patent owners: Institute of Pediatrics, Obstetrics and, gynecology Ukraine, the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine., No. 94062964; appl. 1994.06.28.; publ. 1998.04.30., Bull. N 2. (In Ukraine).
14. Trynus F. P. Pharmacotherapeutic guide. K.: Zdorov'ye, 1989, 255 p. (In Russian).
15. Komisarenko Yu. I. Diabetes mellitus in combination with autoimmune thyroiditis: peculiarities and role of vitamin D₃ (clinical and experimental study). Avtoref. dis. ... doct. med.nauk. Specialty 01.14.14 "Endocrinology" / Yu. I. Komisarenko, Kyiv, 2014, 39 p. (In Ukraine).
16. Pat. 71005 UA, IPC⁷ A 61 K 31/593. Water-soluble vitamin D₃ / Apukhovska L. I., Volkov G. L., Bezusyak A. I., Vasylevska V. M.; patent owner: the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. No.2001117974; appl. 2001.11.22.; publ. 2004.11.15, Bull. N 11. (In Ukraine).

17. Pat. 48909 UA, IPC⁷ A 61 K 31/593, A 61 K 38/17, A 61 K 33/00, A 61 P 19/10. A vitamin-mineral medication for the treatment of osteoporosis "CALMIVID" / Apukhovska L. I., Volkov G. L., Bezusyak A. I., Vasylevska V. M., Kalashnikov A. V.; patent owner: the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. No.2002042829; appl. 2002.04.09; publ. 2002.06.15, Bull. N 8. (In Ukraine).
18. The Certificate 38235 UA on sign for commodities and services "CALMIVID", class 5: pharmaceutical preparations; the applicant and owner: the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, No. 2002021100; appl. 15.02.2002; publ. 15.03.2004, Bull. N 3, valid 07.02.2022 (In Ukraine).
19. Vitamin D₃ and bone system / Gayko G. V., Kalashnikov A. V., Brusko A.T., Apukhovska L. I., Kalashnikov A. V. Kiev: Kniga Plus, 2008. 178 p. (In Russian).
20. Apukhovska L. I., Vasylevska V. M., Bezusyak A. I., Romanov S. A., Kalashnikov A. V. The efficiency of complex preparations of vitamin D₃ in osteoporosis. *Biotekhnolohiia*. 2008; 1(2): 59-67.
21. The effect of vitamin D₃ and different doses of vitamin E on mineral metabolism, structural organization of bone tissue and growth of long bones. *Bull. Orthoped. Traumatol. Prosthet.* 2005; 1(44).
22. Pat. 85936 UA, IPC (2009) 31/593 A61K (2006.01), A61K 31/355, A61K 33/06, A61K 33/30, A61K 33/32, 33/34 A61K, A61P 19/10 (2009.01). Vitamin-mineral preparation for the treatment of osteoporosis / Apukhovska L. I., Bepak A. I., Vasilevska V. M., Volkov G. L., Kalashnikov A. V., Komisarenko S. V., Kolibo D. V., applicant and owner: the Palladin Institute of biochemistry of the NAS of Ukraine. No. a200706950; appl. 2007.06.20, publ. 2009.03.10, Bull. N 5.
23. Pat. 85494 UA, IPC (2009): A 61 K 31/66 (2006.1), A 61 K 33/06 (2006.1), and 61 K 31/593 (2006.01), A 61 P 19/00. The pharmaceutical composition for the treatment of bone tissue diseases / Komisarenko S. V., Kolibo D. V., Apukhovska L. I., Bezusyak A. I., Vasylevska V. M.; patent owner: the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. No. a200802015; appl. 2008.02.18; publ. 2009.01.26, Bull. N 2.
24. The Certificate 110192 UA on sign for commodities and services "MEBIVID" class 5: pharmaceutical and veterinary preparations; the applicant and owner IS:the Palladin Institute of biochemistry of the NAS of Ukraine. No. m200804723, appl. 13.03.2008, publ. 27.07.2009, Bull. N 14, valid 13.03.2018.
25. Russell R. G. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. *Pediatrics*. 2007; 119(S2): S150-S162.
26. Drake M. T., Clarke B. L., Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clin. Proc.* 2008; 83(9): 1032-1045.
27. Komisarenko S. V., Apukhovska L. I., Rysnyi V. M., Kalashnikov A. V., Velyky M. M. The efficacy of biopharmaceutical complex "Mebivit" in the prevention of vitamin D₃ and Calcium metabolism disorders upon alimentary osteoporosis. *Biotekhnolohiia*. 2011; 4(1): 74-81.
28. Pat. 91805 Ukraine, IPC A 61 K 31/593 (2006.01) A 61 K 31/355 (2006.01) A 61 P 3/02 (2006.01). The method of obtaining the vitamin D₃-E protein complex and the therapeutic vitamin medication obtained by this method / Spector M. I., Apukhovska L. I., Rosenfeld L. H., Komisarenko S. V., Antypkin Y. G., Urh, Slovenska Bistrica Jordan Vasylevska V. M.; applicants and patent owners: Spector M. I., Apuhovska L. I., Rosenfeld L. H., Komisarenko S. V., Antypkin Y. G., Jordan Urh, Slovenska Bistrica, Vasylevska V. M.; the transfer of ownership to the A. V. Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, State Solution Service Intelligence Property of Ukraine N 3799 03.10.2015. No. a200909887; appl. 28.09.2009; publ. 25.08.2010, Bull. N 16.
29. The Certificate 149223 UA on sign for commodities and services «VIDEIN-ZDOROV'YA 3», class 5: vitamin preparations; applicants and owners: Spektor M. I., Apukhovska L. I., Rosenfeld L. G., Komisarenko S. V., Antypkin Yu. G., Urx Jordan, Vasilevska V. M., since 28.09.2012, the owner: the Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine. No. m201002651 ; appl. 2010.02.25; publ. 2011.12.26, Bull. N 24, valid 2020.02.25.

Отримано 19.10.2015