

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992149** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.03.05**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.03.13**

(51) Int. Cl. *A61K 9/14* (2006.01)  
*A61K 9/16* (2006.01)  
*A61K 9/20* (2006.01)  
*A61K 9/48* (2006.01)  
*A61K 31/00* (2006.01)  
*A61K 36/00* (2006.01)

---

(54) **КОМБИНАЦИЯ АКТИВНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ, СОДЕРЖАЩИЕ ЕЕ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ САРКОПЕНИИ**

---

(31) **102017000028228**

(32) **2017.03.14**

(33) **IT**

(86) **PST/IB2018/051656**

(87) **WO 2018/167661 2018.09.20**

(71) Заявитель:

**АФАРМ С.Р.Л. (IT)**

(72) Изобретатель:

**Пиццони Анджело, Пиццони Паоло**

**(IT)**

(74) Представитель:

**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Объектом настоящего изобретения является новая комбинация активных ингредиентов, в частности комбинация 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты или ее фармакологически приемлемой соли, экстракта виноградных косточек, экстракта витании и необязательно орнитин-альфа-кетоглутарата. Комбинация по изобретению является полезной в лечении саркопении и в целом заболеваний, вызывающих потерю мышечной массы, и в качестве анаболического агента. Еще одним объектом изобретения является фармацевтическая или нутрицевтическая композиция, содержащая комбинацию, упомянутую выше, вместе с общепринятыми вспомогательными веществами и носителями.

**A1**

**201992149**

**201992149**

**A1**

**КОМБИНАЦИЯ АКТИВНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ,  
СОДЕРЖАЩИЕ ЕЕ КОМПОЗИЦИИ  
И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ САРКОПЕНИИ**

**Краткое описание изобретения**

Объектом настоящего изобретения является новая комбинация активных ингредиентов, в частности, комбинация 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты или ее фармакологически приемлемой соли, экстракта виноградных косточек, экстракта витании и необязательно орнитин-альфа-кетоглутарата. Комбинация по изобретению является полезной в лечении саркопении и, в целом, заболеваний, вызывающих потерю мышечной массы, и в качестве анаболического агента. Еще одним объектом изобретения является фармацевтическая или нутрицевтическая композиция, содержащая комбинацию, упомянутую выше, вместе с общепринятыми вспомогательными веществами и носителями.

**Область техники, к которой относится изобретение**

Саркопения относится к термину, который используют для описания потери мышечной массы с последующей потерей силы и физической работоспособности у субъекта. Причины, вызывающие саркопению, могут быть различными, при этом наиболее распространенными являются сидячий образ жизни, длительные периоды отсутствия физической активности, например, вследствие несчастных случаев или заболеваний, травм, включающих наложение гипса на части тела, местного нервного повреждения, старения и недостаточного или неправильного питания. Альтернативно, саркопения может быть вызвана такими заболеваниями, как кахексия, рак, СПИД и сепсис, или может возникать в результате длительного лечения глюкокортикоидами.

Когда саркопения не поддается эффективному лечению с помощью только правильной диеты, в рацион часто вводятся пищевые добавки, такие как, например, кальций, витамин D и витамин B12, аминокислоты с разветвленной цепью, их прекурсоры или метаболиты.

**Цели изобретения**

Целью настоящего изобретения является обеспечение новой комбинации активных ингредиентов, особенно полезных, но без ограничения, в лечении и/или предупреждении возникновения саркопении и, в целом, в лечении любого состояния или заболевания, вызывающего истощение мышечной массы, и/или в качестве анаболического стероида.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической и/или нутрицевтической композиции, содержащей комбинацию по

изобретению.

Еще одной целью изобретения является обеспечение способа лечения и/или предупреждения возникновения саркопении и, в целом, лечения любого состояния или заболевания, вызывающего истощение мышечной массы, включающего введение комбинации или композиции по изобретению.

#### Описание изобретения

Объектом изобретения, согласно одному из его аспектов, является новая комбинация активных ингредиентов, содержащая 3-гидрокси-3-метилбутановую кислоту или ее фармакологически и фармацевтически приемлемую соль, предпочтительно соль кальция, экстракт виноградных косточек и экстракт витании.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления комбинация, кроме того, содержит орнитин-альфа-кетоглутарат.

3-Гидрокси-3-метилбутановая кислота (также называемая как 3-гидрокси-3-метилмасляная кислота, далее в настоящем документе также НМВ) является метаболитом аминокислоты лейцина. Ее анаболическая и антикатаболическая роль известна. В соответствии с настоящим изобретением 3-гидрокси-3-метилбутановую кислоту предпочтительно используют в форме ее фармацевтически приемлемой соли, преимущественно в форме ее соли кальция.

В соответствии с настоящим изобретением экстракт виноградных косточек (также называемый «grapestones» (виноградные семена)) означает экстракт, содержащий лейкоцианидин, полученный из семян *Vitis vinifera* L., например, путем экстракции водой и ацетоном. Такой экстракт является коммерчески доступным и представлен на рынке, например, компанией Indena<sup>®</sup> Company. В частности, экстракт, представленный на рынке компанией Indena<sup>®</sup> Company, содержит, в дополнение к лейкоцианидинам также соевые фосфолипиды.

В соответствии с настоящим изобретением экстракт витании предпочтительно означает экстракт витании снотворной *Withania somnifera*. Предпочтительно экстракт представляет собой экстракт из корней витании снотворной *Withania somnifera*, также называемый как «сухой экстракт Ашвагандхи (Aswagandha)». Также, этот продукт является коммерчески доступным и, например, представлен на рынке компанией Vivatis Pharma Company.

Орнитин-альфа-кетоглутарат (далее в настоящем документе также ОКГ) является известным соединением, как правило, используемым в спортивной области в качестве анаболического стероида.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления комбинация по изобретению представляет собой фиксированную комбинацию, состоящую из 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли/экстракта виноградных косточек/экстракта витании/орнитин-альфа-кетоглутарата в реципрокном массовом соотношении 1/0,1-0,30/0,1-0,5/2-5, соответственно.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления комбинация по изобретению представляет собой фиксированную комбинацию, состоящую из 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция/экстракта виноградных косточек/экстракта витании/орнитин-альфа-кетоглутарата в реципрокном массовом соотношении 1/0,1-0,30/0,1-0,5/2-5, соответственно, предпочтительно около 1/0,15/0,30/3, предпочтительно около 1/0,16/0,16/2,3.

Неожиданно было обнаружено, что описанная выше комбинация является особенно полезной в лечении саркопении и, в целом, в лечении любого состояния или заболевания, вызывающего истощение мышечной массы, а также в качестве анаболического стероида. В частности, было обнаружено, что виноградные косточки и экстракты витании способствуют усилению анаболического эффекта 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты и орнитин-альфа-кетоглутарата.

В соответствии с настоящим изобретением термин «саркопения» обозначает в настоящем документе любую потерю мышечной массы независимо от ее происхождения и включает потерю силы и физической работоспособности из-за катаболизма мышц.

Изобретение, например, является полезным для увеличения мышечной массы во время тренировки или у пожилых и ослабленных людей, а также у людей с потерей мышечной массы из-за отсутствия активности или прикованности к постели; в состояниях кахексии; для защиты мышц от повреждений, вызванных интенсивной тренировкой, и для устранения чувства усталости и/или для улучшения физической работоспособности.

Объектом изобретения, согласно другому из его аспектов, является фармацевтическая или нутрицевтическая композиция, содержащая комбинацию 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли, предпочтительно соли кальция, экстракта виноградных косточек, экстракта витании и, необязательно, орнитин-альфа-кетоглутарата вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления объектом изобретения является фармацевтическая или нутрицевтическая композиция, содержащая комбинацию 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты или ее фармацевтически приемлемой

соли, предпочтительно, соли кальция, экстракта виноградных косточек, экстракта витании и орнитин-альфа-кетоглутарата вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

Предпочтительно композиция по изобретению предназначена для перорального применения, но могут быть эффективно использованы другие пути введения.

В соответствии с одним вариантом осуществления объектом изобретения являются композиции, содержащие:

- от 1 до 4 г, предпочтительно от 1 до 3 г 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли;

- от 100 до 500 мг, предпочтительно от 200 до 400 мг экстракта виноградных косточек, предпочтительно, как определено выше;

- от 100 до 1000 мг, предпочтительно от 200 до 800 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*); и

- от 1 до 10 г, предпочтительно от 2 до 8 г орнитин-альфа-кетоглутарата, вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления объектом изобретения является композиция, содержащая:

- от 1 до 4 г, предпочтительно от 1 до 3 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;

- от 100 до 500 мг, предпочтительно от 200 до 400 мг экстракта виноградных косточек, предпочтительно, как определено выше;

- от 100 до 1000 мг, предпочтительно от 200 до 800 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*); и

- от 1 до 10 г, предпочтительно от 2 до 8 г орнитин-альфа-кетоглутарата, вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления объектом изобретения является композиция, содержащая:

- около 1 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;

- около 150 мг экстракта виноградных косточек, предпочтительно, как определено выше;

- около 300 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*); и

- около 3 г орнитин-альфа-кетоглутарата; вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления объектом

изобретения является композиция, содержащая:

- около 1,5 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;
  - около 250 мг экстракта виноградных косточек, предпочтительно, как определено выше;
  - около 250 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*); и
  - около 3,5 г орнитин-альфа-кетоглутарата;
- вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

Такие композиции являются подходящими для перорального введения субъекту, подлежащему лечению, один или несколько раз в сутки.

Дозировка композиции, подлежащей введению, зависит в силу необходимости, например, от возраста субъекта, вида заболевания, состояния здоровья и т.д., при этом такие дозировки могут быть определены терапевтом.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиции вводят два раза в сутки, при этом общая суточная доза составляет:

- около 2-3 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;
- около 300-500 мг экстракта виноградных косточек, предпочтительно, как определено выше;
- около 500-600 мг экстракта витании, преимущественно витании снотворной (*withania somnifera*); и
- около 6-7 г орнитин-альфа-кетоглутарата.

Однако, как упоминалось, могут быть назначены другие дозировки по мере необходимости.

Субъектом, подлежащим лечению с помощью композиции по изобретению, предпочтительно является млекопитающее, в частности, человек.

Композиция по изобретению предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию, составленную для перорального применения, например, в форме фармацевтических или нутрицевтических композиций, таких как таблетки, необязательно имеющие покрытие, гранулы, мелкие гранулы, порошки, твердые капсулы, мягкие капсулы, сиропы, эмульсии, суспензии и растворы, подходящие для перорального введения. Однако могут быть использованы другие фармацевтические формы.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция по изобретению находится в твердой или полутвердой пероральной форме, предпочтительно выбранной из таблеток, порошков, гранул и геля. Такую композицию можно принимать в

отдельности или вместе с водой, или смешивать с другой пищей, например, с йогуртом или т.п.

Альтернативно, композиция по изобретению может быть в готовой к употреблению питьевой форме, например, в форме пакетиков для питья, типа «стик-пакета», предпочтительно в форме геля.

Виды фармацевтических добавок, используемых для приготовления композиции по изобретению, соотношения количеств добавок относительно активного ингредиента и способы получения фармацевтической композиции могут быть соответствующим образом выбраны специалистом в данной области. Органические или неорганические вещества, или твердые или жидкие вещества могут быть использованы в качестве вспомогательных веществ и носителей, при условии, что они являются пищевыми и фармацевтически приемлемыми.

Примеры вспомогательных веществ, используемых для изготовления твердых фармацевтических композиций, включают, например, мальтодекстрины, производные целлюлозы, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза, лактозу, сахарозу, сложные эфиры сахарозы, лимонную кислоту, диоксид кремния, амид, тальк, целлюлозу, декстрины, каолин, кальций карбонат, стеариновую кислоту или стеарат магния, лактозу, полиэтиленгликоль, маннит, сорбит, хелатообразующие агенты, антислеживающие агенты, заменители сахара, консерванты и ароматизаторы.

Для приготовления жидких композиций для перорального введения используют общепринятый инертный разбавитель, такой как вода или масло, например, можно использовать растительное масло. Жидкая композиция может включать адьюванты, такие как смачивающие агенты, суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты в дополнение к инертному разбавителю. Жидкая композиция может быть заключена в капсулы из абсорбируемого материала, такого как желатин.

Заменители сахара могут представлять собой один или несколько природных сахаров, необязательно восстановленных, таких как, например, сахароза, сукралоза, декстроза, ксилит, маннит или сорбит, или синтетический продукт, такой как, например, сахарин натрия, аспартам, ацесульфам К или сукралоза. Также могут быть добавлены подкисляющие агенты.

Вкусовые агенты представляют собой фармацевтически приемлемые ароматизаторы и вкусы из синтетических масел или натуральных масел, экстрагированных из растений, цветов, фруктов и их комбинаций, таких как, например, листья корицы, мяты, аниса и цитрусовых, горький миндаль, цитрусовые, в частности,

апельсиновое и/или лимонное масла, лайм, ваниль, шоколад и грейпфрут. Преимущественно могут быть использованы шоколадные, ванильные или эвкалиптовые ароматизаторы и фруктовые эссенции, в частности, яблоко, груша, персик, клубника, абрикос, апельсин, лимон и виноград.

Композиция по изобретению может, кроме того, содержать другие активные ингредиенты или растительные экстракты, полезные для лечения и/или предупреждения возникновения саркопении.

Например, композиции по изобретению могут содержать аминокислоты, например, одну или несколько аминокислот, выбранных из L-лейцина, L-валина, L-изолейцина, L-гистидина, L-лизина, L-метионина, L-цистина, L-цистеина, L-фенилаланина, L-тирозина, L-треонина, L-глутамина, L-аргинина и L-триптофана и/или один или несколько витаминов, например, витамин B6 и витамин D3.

Дозировки аминокислот и витаминов можно могут быть легко определены исходя из рекомендованных суточных норм или выбраны терапевтом или диетологом в зависимости от потребностей субъекта, подлежащего лечению. Примеры приведены в экспериментальном разделе настоящего изобретения.

Например, в композицию может быть добавлено около 5-20 г, например, 8-12 г, предпочтительно 10 г смеси аминокислот и/или около 1-3 мг витаминов группы B, предпочтительно витамина B6, и/или около 10-30 мкг витаминов группы D, предпочтительно витамина D3.

Другие компоненты могут быть дополнительно добавлены к композиции по изобретению, такие как, например, креатин, например, в количестве 0,5-3 г.

В дополнение к лечению саркопении, как определено выше, комбинацию и композицию по изобретению, предпочтительно композицию, содержащую аминокислоты и/или витамины, можно удобным образом применять в качестве анаболического агента, в частности, спортсменами или в любом случае субъектами, стремящимися увеличить мышечную массу.

Предпочтительные дополнительные компоненты указаны в иллюстративных примерах композиций по изобретению, описанных в экспериментальном разделе.

Композиция по изобретению может быть упакована в виде единичных доз или в многодозовых упаковках в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными специалисту в данной области.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиции по изобретению упакованы в виде пероральных единичных доз, например, саше, капсул или

таблеток.

Объектом изобретения, в соответствии с другим из его аспектов, является применение фармацевтической или нутрицевтической комбинации и композиции по изобретению для лечения и/или предупреждения возникновения саркопении.

Таким образом, комбинация и композиции по изобретению являются особенно полезными для увеличения мышечной массы (путем увеличения синтеза белка и уменьшения повреждения мышц) во время тренировок или у пожилых и ослабленных людей, а также у людей, которые потеряли мускулатуру из-за отсутствия активности или приковывания к постели; для защиты мышц от повреждений, вызванных интенсивной тренировкой; и для устранения чувства усталости и/или улучшения физической работоспособности.

Комбинация и композиция в соответствии с изобретением для их применения в лечении саркопении и для применений, изложенных выше, представляют следующий аспект изобретения.

Объектом изобретения в соответствии с другим его аспектом является способ лечения и/или предупреждения возникновения саркопении, включающий введение эффективной дозы комбинации и/или композиции по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Комбинацию по изобретению подвергали анализу в различных экспериментах *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo*.

#### Эксперимент 1

Тест на крысах после длительного лечения в модели саркопении *in vivo*

Модель мышечного повреждения воспроизводили путем внутрибрюшинного введения крысе суточной дозы 600 мкг/кг дексаметазона в течение 15 дней до очевидной потери массы тела по сравнению с контрольной группой, обработанной носителем.

Комбинацию исследуемых веществ вводили перорально каждый день на протяжении всего периода лечения. Оценивали эффективность комбинации следующего состава:

- 250 мкг/кг экстракта виноградных косточек;
- 250 мкг/кг экстракта витании;
- 300 мкг/кг НМВ;
- 500 мкг/кг ОКГ.

Начиная с 1-го дня различные группы животных обрабатывали соответственно:

- взятым в отдельности дексаметазоном;

- дексаметазоном и комбинацией, указанной выше;
- соответствующими носителями (контроли).

Массу тела контролировали ежедневно, как показано на фигуре 1. Обработка дексаметазоном вызывала внезапную потерю массы, которая прогрессировала до окончания наблюдения на 15-й день. Животные, получающие лечение комбинацией, имели массу, которая всегда была выше, чем масса животных, обработанных взятым в отдельности дексаметазоном. Начиная с 7-го дня такое увеличение было значительным, и масса оставалась постоянной до 15-го дня. Увеличение массы тела коррелировало с улучшением функциональных способностей, оцененных с помощью теста «Grip test», который позволяет определить силу, прилагаемую животным для сохранения сжатия лап и противодействия прилагаемому усилию. Как показано на фигуре 2, эффект снижения силы, индуцированной дексаметазоном, значительно восстанавливался путем лечения комбинацией.

Более высокая сила соответствует лучшей моторной координации, стимулированной в тесте «Rota rod test» требованием сохранения равновесия на вращающемся барабане. Животные, подвергнутые частой обработке комбинацией, показали сокращение числа падений и более длительный период балансирования на полувращающемся барабане (фигура 3). Для расширения такого исследования животных подвергали оценке на их вегетативные, неврологические и моторные способности путем наблюдения за сериями параметров, указанных в таблице 1 (фигура 10). Такие оценки, обобщенные в виде теста Ирвина, позволили выявить защитные способности комбинации против изменений, индуцированных дексаметазоном, и, что не менее важно, позволили исключить повреждения неврологического профиля, индуцированные комбинацией, таким образом, подтверждая превосходный профиль безопасности. Во время теста оценку моторных и неврологических способностей осуществляли с помощью теста Ирвина, выполняемого на 15-й день. Признаки оценивали полуколичественным методом по заранее определенной шкале (от 0 до +4, от -4 до 0, от 0-4 до +4). Данные относятся к оценке 10 крыс на группу, разделенных на две разные экспериментальные сессии, \*P <0,01 против носитель+носитель; 11 P <0,01 против дексаметазон+носитель.

В конце наблюдений за поведением (день 15) животных умерщвляли, и некоторые специфические мышцы задней лапы эксплантировали и подвергали анализу. На фигуре 4 показано резкое снижение массы икроножных мышц, большеберцовых мышц и мышц разгибателей пальцев, индуцированное дексаметазоном. Следует отметить, что снижение массы тела животных составило около 20% после обработки дексаметазоном, при этом

мышечная масса уменьшилась на 40%, что указывает на более высокое повреждение мышечных структур по сравнению с другими тканями. Те же самые мышцы, собранные у животных, обработанных комбинацией, имели значительно более высокую массу. Способность комбинации почти полностью предотвращать такое изменение позволяет предположить, что тонизирующие свойства тестируемой комбинации почти полностью направлены на мышечную ткань. Однако сообщается, что только для икроножной мышцы имелось заметное улучшение индекса саркопении (фигура 5). Такое значение получают путем деления мышечной массы на общую массу тела, поскольку эффекты комбинации приводят к общему увеличению массы тела (четко коррелирует с улучшением самочувствия животного), при этом различия в таком соотношении должны быть нивелированы одновременным увеличением числителя и знаменателя.

Чтобы исследовать возможный механизм эффективности, продемонстрированной комбинацией, состояние окисления мышцы оценивали путем измерения окисления липидов и белков. Икроножную мышцу обрабатывали и подвергали реакции с тиобарбитуровой кислотой для обеспечения возможности детекции реакционноспособных веществ кислоты (реакционноспособные вещества тиобарбитуровой кислоты - TBARS; фигура 5). Дексаметазон способствует двукратному увеличению перекисного окисления липидов по сравнению с контролями, обработанными носителем. Еще более поразительным является окислительный эффект белков, оцениваемый как присутствие карбонилированных белков, которые увеличиваются примерно в 5 раз (фигура 7). В обоих случаях лечение комбинацией значительно предупреждает окислительный стресс как липидов, так и белков.

## Эксперимент 2

Тестирование на крысах после длительного лечения в модели саркопении *in vitro*.

Исследование трофического действия на мышцу исследуемых соединений проводили на линии мышечных миобластов C2C12. Изменения достигались путем инкубаций в течение увеличивающихся периодов времени с 1 мкМ дексаметазона (Lu et al. *Int Jour Biol Mol* 2013, 61:7-16), который может индуцировать атрофию мышц; активированный таким образом глюкокортикоидный рецептор увеличивает транскрипцию своих генов-мишеней, которые способствуют экспрессии белков, принадлежащих семейству FoxO, и убиквитин-лигаз E3 (Shimizu et al., *Cell Metab*, 13:170-182, 2011), действующих на уровне мышечных клеток, снижая трофизм и новообразование. Действие исследуемой комбинации было выявлено после инкубации со скалярными концентрациями соединений, взятых в отдельности или в смеси, в частности, тестировали

с растительными экстрактами витании, семенами красного винограда и кальциевой солью гидроксиметилбутирата.

Обработка миобластов дексаметазоном 1 мкМ в течение 48 ч значительно снизила жизнеспособность клеток согласно оценкам с помощью анализа МТТ (см. экспериментальный раздел) приблизительно на 70%.

На фигурах 8 и 9 четко показано, что добавление экстрактов виноградных косточек и витании значительно увеличило активность НМВ в отношении защиты клеток после их повреждения, вызванного дексаметазоном.

### Эксперимент 3

Тестирование на крысах после длительного лечения в модели саркопении *ex vivo*.

Эффект ежедневного перорального введения оценивали на модели мышечного повреждения, индуцированного дексаметазоном (вводимым внутривентриально крысе в дозе 600 мкг/кг - ежедневно в течение 15 дней; Yamamoto et al., Muscle and Nerve, 41: 819 - 827, 2010).

Во время обработки массу тела и прилагаемую силу контролировали с помощью теста «Grip test», моторную координацию и сопротивление движению с помощью теста «Rota-rod test», неврологическую картину с помощью теста EON. Как было отмечено в предыдущем отчете, были подтверждены функциональные улучшения, вызванные исследуемой смесью.

В конце лечения проводили морфометрические и молекулярные измерения на отдельных мышцах, в частности, оценивали икроножные мышцы и мышцы разгибателей пальцев.

Гистологический анализ, проведенный путем окраски гематоксилин-эозином (фигура 11) и мечения фаллоидином миозина (фигура 12), показал значительное изменение структуры мышц разгибателей пальцев после обработки дексаметазоном. Обработка смесью («комплекс» на фигурах) вызвала улучшение, которое можно оценить количественно с помощью морфометрического анализа. В частности, комплекс может реактивировать площадь волокон (фигура 13), количество волокон на срез (фигура 14), периметр волокон (фигура 15) и, наконец, минимальный диаметр Ферета, который считается наиболее корректным показателем для оценки морфологического состояния мышц. Диаметр Ферета определяется как минимальное расстояние между двумя касательными волокна, параллельными друг другу; это позволяет оценить реальный показатель волокон, которые являются неоднородными по своей природе и составу (фигура 16). В таблице 1 уровень липофусцина, измеренный в мышечной ткани,

представлен как маркер стресса аутофагосомных-лизосомных процессов. Обработка исследуемым комплексом значительно понизила количество липофусцина. Сосредоточив внимание на состояниях мышечных трубочек, на фигуре 17 показана нормализация диаметра в мышцах, эксплантированных у животных, которых неоднократно обрабатывали комплексом. Никаких изменений, касающихся числа ядер на каждую мышечную трубочку, обнаружено не было (фигура 18). Анализ икроножной мышцы показал аналогичные результаты.

#### Эксперимент 4

Тест на крысах после длительного лечения в модели саркопении *in vivo*

Проводили оценку на модели мышечного повреждения, индуцированного химиотерапевтическим лечением противоопухолевым средством оксалилплатином.

В частности, модель мышечного повреждения воспроизводили путем внутрибрюшинного введения крысе оксалилплатины в суточной дозе 2,4 мг/кг в течение 15 дней (Cavaletti et al., Eur J Cancer 2001; Di Cesare Mannelli et al., Exp Neurol 2014) до ярко-выраженной потери массы тела по сравнению с контрольной группой, обработанной носителем.

Комбинацию исследуемых веществ вводили перорально каждый день на протяжении всего курса химиотерапии. Определяли эффективность комбинации следующего состава:

- 250 мг/кг экстракта виноградных косточек (*Vitis vinifera*);
- 250 мг/кг экстракта витании (*Withania Somnifera*);
- 300 мг/кг НМВ;
- 500 мг/кг ОКГ.

Начиная с 1-го дня, различные группы животных обрабатывали, соответственно:

- оксалилплатином;
- оксалилплатином и комбинацией;
- соответствующими носителями.

Массу тела контролировали ежедневно, как показано на фигуре 19. Лечение оксалилплатином предотвращает физиологический набор массы с течением времени. Начиная с 9-го дня, животные, получающие лечение смесью, показали массу, которая значительно превышала массу животных, получавших лечение взятым в отдельности оксалилплатином. Увеличение массы тела коррелирует с улучшением функциональных способностей, оцененных с помощью теста «Grip test», который позволяет определить силу, прилагаемую животным для сохранения сжатия лап и противодействия

прилагаемому усилию. Как показано на фигуре 20, эффект уменьшения силы, индуцированный оксалилплатином, значительно предотвращается путем обработки комплексом.

Более высокая сила соответствует лучшей моторной координации, стимулированной в тесте «Rota rod test» требованием сохранения равновесия на вращающемся барабане. Животные, которых многократно обрабатывали молекулярным комплексом, состоящим из экстрактов красного винограда и витании, НМВ и ОКГ, имели сокращение числа падений и более длительное время нахождения в равновесии во время движения на полувращающемся барабане, таким образом, предполагая более высокую устойчивость к физической активности (фигура 21). Для расширения такого исследования животные подвергались оценке их вегетативные, неврологические и моторные способности путем наблюдения серий параметров, указанных в таблице на фигуре 22. Такие оценки, обобщенные как тест Ирвина, позволили выявить защитные свойства комплекса против изменений, индуцированных химиотерапевтическим агентом, и, что не менее важно, позволили исключить повреждения неврологического профиля, индуцированные смесью, таким образом, подтверждая хороший профиль безопасности.

В конце наблюдений за поведением (день 15) животных умерщвляли, и некоторые мышцы задней лапы эксплантировали и анализировали. На фигуре 23 показано резкое снижение массы икроножной мышц, большеберцовой мышцы и мышц разгибателей пальцев, индуцированное оксалилплатином. Следует отметить, что снижение массы тела животных составило около 15% после обработки дексаметазоном, тогда как мышечная масса уменьшилась на 50%, что указывает на более высокое повреждение мышечных структур по сравнению с другими тканями. Те же мышцы, собранные у животных, обработанных комплексом, имеют значительно более высокую массу. Сообщается, что для икроножных мышц и большеберцовых мышц наблюдается значительное улучшение индекса саркопении (фигура 24). Кроме того, мышцы разгибателей пальцев и икроножные мышцы подвергали морфометрическому и молекулярному исследованию. Гистологический анализ, проведенный путем окраски гематоксилин-эозином (фигура 25) и мечения миозина фаллоидином (фигура 26), показал значительное изменение структуры мышц разгибателей пальцев после обработки оксалилплатином. Обработка смесью («комплекс» на фигурах) вызывала улучшение, которое можно количественно оценить с помощью морфометрического анализа. В частности, комплекс может реактивировать площадь волокон (фигура 27), количество волокон на срез (фигура 28), периметр волокон (фигура 29) и, наконец, минимальный диаметр Ферета (фигура 30), рассматриваемый как

наиболее корректный показатель для оценки морфологического состояния мышц. Диаметр Ферета определяется как минимальное расстояние между двумя касательными волокна, параллельными друг другу; это позволяет оценить реальный показатель волокон, которые являются неоднородными по своей природе и составу. Сосредоточив внимание на состояниях мышечных трубочек, на фигуре 31 показана нормализация диаметра мышц, эксплантированных у животных, неоднократно обработанных комплексом. Никаких изменений, касающихся количества ядер на каждую мышечную трубочку, обнаружено не было (фигура 32). Анализ икроножной мышцы показал аналогичные результаты.

Чтобы исследовать возможный механизм эффективности, продемонстрированной комплексом, окислительное состояние мышцы оценивали путем измерения окисления липидов и белков. Мышцу разгибателя пальцев обрабатывали и подвергали реакции с тиобарбитуровой кислотой, чтобы обеспечить возможность детекции реакционноспособных вещества кислоты (TBARS; фигура 33). У животных, обработанных взятым в отдельности оксалилплатином, наблюдалось двукратное увеличение перекисного окисления липидов по сравнению с контролями, обработанными носителем. Еще более поразительным являлся окислительный эффект белков, оцениваемый как содержание карбонилированных белков, которое увеличилось примерно в 4 раза (фигура 34). В обоих случаях обработка комплексом значительно предотвращает окислительный стресс как липидов, так и белков. Редокс-дисрегуляцию, вызванную оксалилплатином, также подтверждали путем измерения активности супероксиддисмутазы (SOD) в мышцах (фигура 35). Снижение активности фермента, вызванное оксалилплатином, значительно предотвращалось обработкой комплексом. Картина антиоксидантной защиты согласуется с фармакодинамическим профилем экстракта виноградных косточек. Кроме того, восстановление мышечной ткани оценивали путем измерения уровней креатинкиназы в плазме (фигура 36), мышечного фермента, высвобождаемого в кровоток после повреждения мышц. Резкое увеличение (примерно в 7 раз), вызванное оксалилплатином, уменьшалось на 50% при обработке смесью. Такой эффект может быть связан со свойствами экстракта витании. Аналогично, повышение уровня тестостерона в плазме, индуцированное комплексом, согласуется с тем, что указано в литературе касательно эффектов витании. С другой стороны, увеличение глутамина, способствующего синтезу белка и ингибирующего деградацию мышц, приписывается ОКГ, прекурсору аминокислоты. Наконец, на фигуре 37 показано увеличение, зависимое от оксалилплатины, экспрессии NF- $\kappa$ B (ядерного фактора каппа-легкой цепи-энхансера активированных В-клеток) в мышце, белкового комплекса с

катаболической активностью. Повторное лечение комплексом предотвращает увеличение такого медиатора воспаления.

#### Выводы

Результаты экспериментов ясно демонстрируют, что комбинация по изобретению эффективно предотвращает повреждение мышц, индуцированное дексаметазоном. Общее увеличение массы тела обусловлено выраженным стимулирующим действием мышечной массы. Такие эффекты могут улучшить силу и моторные способности животных. Защита мышц связана с восстановлением окислительно-восстановительного баланса структуры мышц. Кроме того, результаты показывают, что компоненты комбинации демонстрируют синергетический эффект, поскольку одновременное введение НМВ, семян винограда и экстракта витании производит эффект в отношении повреждений, индуцированных дексаметазоном, который намного превышает эффект, который мог бы быть достигнут при введении взятой в отдельности НМВ.

Комбинация может, кроме того, противостоять повреждению мышц, индуцированному оксалилплатином. Общее увеличение массы тела обусловлено выраженным стимулирующим действием мышечной массы. Такие эффекты могут улучшить силу и моторные способности животных. Защита мышц сочетается с восстановлением окислительно-восстановительного баланса мышечной структуры вместе с увеличением анаболических активностей и уменьшением катаболических сигналов.

Материалы и используемые способы описаны в следующем экспериментальном разделе.

#### Краткое описание чертежей

Фигура 1. Оценка массы тела как функции времени. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. от 10 крыс на группу, которые были разделены на две разные экспериментальные сессии, \*P <0,01 против носитель + носитель; ^p <0,01 против дексаметазон + носитель.

Фигура 2. Оценка силы захвата. Тест с использованием измерителя силы захвата лапы крысы (Grip Strength Meter), выполненный на 15-й день. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. от 10 крыс для каждой группы, разделенных на две разные экспериментальные сессии, \*p <0,01 против носитель + носитель; ^p <0,01 против дексаметазон + носитель.

Фигура 3. Оценка моторной координации. Тест на вращающемся барабане «Rota rod test» выполняли на 15-й день, оценивали число падений и время, проведенное в равновесии на вращающемся барабане при 600 сек. Данные представлены в виде среднего

значения  $\pm$  S.E.M. от 10 крыс на группу, которые были разделены на две разные экспериментальные сессии, \* $p < 0,01$  против носитель + носитель;  $\wedge p < 0,01$  против дексаметазон + носитель.

Фигура 4. Ex-vivo оценка мышечной массы. На 15-й день некоторые мышцы задней лапы эксплантировали и взвешивали. В частности, представлены массы икроножных мышц, большеберцовых мышц и мышц разгибателей пальцев. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. отдельных мышц, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \* $p < 0,01$  против носитель + носитель;  $\wedge p < 0,01$  против дексаметазон + носитель.

Фигура 5. Оценка индекса саркопении, относящегося к массе задней лапы. На 15-й день некоторые мышцы задней лапы эксплантировали и взвешивали. В частности, представлена масса икроножных мышц, большеберцовых мышц и мышц разгибательных пальцев. Индекс саркопении получали путем деления массы каждой мышцы на общую массу животного. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \* $p < 0,01$  против носитель + носитель;  $\wedge p < 0,01$  против дексаметазон + носитель.

Фигура 6. Оценка перекисного окисления липидов в мышцах. На 15-й день эксплантировали икроножную мышцу. Измерение степени окисления липидов проводили посредством реакции с тиобарбитуровой кислотой, и результаты выражали в виде количества TBARS (реакционноспособные вещества тиобарбитуровой кислоты). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \* $p < 0,01$  против носитель + носитель;  $\wedge p < 0,01$  против дексаметазон + носитель.

Фигура 7. Оценка карбонилирования белков мышечных тканей. На 15-й день эксплантировали икроножную мышцу. Измерение степени окисления белков осуществляли с помощью вестерн-блоттинга после реакции гомогената белка с DNPH (2-4-динитрофенилгидразином). Для каждого образца проводили нормализацию по отношению к экспрессии эталонного белка бета-актина. На графике показано измерение интегральной плотности, и на вставке представлено репрезентативное изображение блота с соответствующими молекулярными массами, при этом контроль обозначен как C, образец, обработанный дексаметазоном, обозначен как D, образец, обработанный комбинацией, обозначен как D + C. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \* $p < 0,01$  против носитель + носитель;  $\wedge p < 0,01$  против

дексаметазон + носитель.

Фигура 8: Оценка жизнеспособности клеток на C2C12 (миоцитах), обработанных 1 мкМ дексаметазона с НМВ и без нее. Обработки в течение 48 часов. ММТ-тест (с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом). \*\* $p < 0,01$  против дексаметазона;  $^{\wedge}p < 0,01$  против 1 дексаметазона.

Фигура 9: Оценка жизнеспособности клеток на C2C12 (миоцитах), обработанных 1 мкМ дексаметазоном со смесью экстрактов виноградных косточек, витании и НМВ или без нее. Обработки в течение 48 часов. ММТ-тест (с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом). \*\* $p < 0,01$  против дексаметазона;  $^{\wedge}p < 0,01$  против 1 дексаметазона.

На фигуре 10 показаны результаты теста Ирвина, полученные с использованием комбинации, представленной в эксперименте 1.

На фигуре 11 показаны результаты гистологического исследования мышцы путем окраски гематоксилин-эозином из эксперимента 3.

На фигуре 12 показан иммуногистохимический анализ F-актина с помощью фаллоидина из эксперимента 3.

На фигуре 13 показана площадь волокон из эксперимента 3.

На фигуре 14 показано количество волокон из эксперимента 3.

На фигуре 15 показан периметр волокон из эксперимента 3.

На фигуре 16 показан минимальный диаметр Ферета из эксперимента 3.

На фигуре 17 показан диаметр мышечных трубочек из эксперимента 3.

На фигуре 18 показано количество ядер на мышечную трубочку из эксперимента 3.

На фигуре 19 показана оценка массы тела как функция времени. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \* $P < 0,05$  против носитель + носитель;  $^{\wedge}P < 0,05$  против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 20 показана оценка потери силы. Тест с использованием измерителя силы захвата лапы крысы (Grip Strength Meter) выполняли на 15-й день. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. от 10 крыс на группу, разделенных на две разные экспериментальные сессии, \* $p < 0,01$  против носитель + носитель;  $^{\wedge}p < 0,05$  против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 21 показана оценка моторной координации и сопротивления упражнению. Тест на вращающемся барабане «Rota rod test» выполняли на 15-й день, оценивали число падений и время, проведенное в равновесии на вращающемся барабане

при 600 сек. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*P <0,05 против носитель + носитель; ^p <0,05 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 22 показана оценка моторных и неврологических способностей с помощью теста Ирвина, проведенного на 15-й день. Признаки оценивали полуколичественным методом в соответствии с предварительно определенной шкалой (от 0 до +4, от -4 до 0 или от -4 до +4). Данные относятся к оценке 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии.

На фигуре 23 показана оценка ex-vivo мышечной массы. На 15-й день отдельные мышцы задней лапы эксплантировали и взвешивали. В частности, представлены массы икроножных мышц, большеберцовых мышц и мышц разгибательных пальцев. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. отдельно взятых мышц, полученных у 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*P <0,05 против носитель + носитель; ^p <0,05 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 24 показана оценка индекса саркопении в отношении массы мышц задней лапы. На 15-й день отдельные мышцы задней лапы эксплантировали и взвешивали. В частности, представлена масса икроножных мышц, большеберцовых мышц и мышц разгибательных пальцев. Индекс саркопении получали путем деления массы каждой мышцы на общую массу животного. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*P <0,05 против носитель + носитель; ^p <0,05 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 25 показан образец для гистологического исследования.

На фигуре 26 показана морфометрия и мышечные трубочки.

На фигуре 27 показана площадь волокон. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*\*P <0,01 против носитель + носитель; ^p <0,05 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 28 показано количество волокон. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*\*P <0,01 против носитель + носитель; ^p <0,05 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 29 показан периметр волокон. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две

разные экспериментальные сессии, \*P <0,05 против носитель + носитель; ^p <0,05 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 30 показан минимальный диаметр Ферета. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*\*P <0,01 против носитель + носитель; ^p <0,05 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 31 показан диаметр мышечных трубочек. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*P <0,05 против носитель + носитель; ^p <0,05 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 32 показано количество ядер на мышечную трубочку. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии.

На фигуре 33 показана оценка перекисного окисления липидов в мышцах. На 15-й день эксплантировали икроножные мышцы. Измерение степени окисления липидов проводили посредством реакции с тиобарбитуровой кислотой, и результаты выражали в виде количества TBARS (реакционноспособные вещества тиобарбитуровой кислоты). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*\*P <0,01 против носитель + носитель; ^P <0,01 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 34 показана оценка карбонилирования мышечного белка. На 15-й день эксплантировали икроножную мышцу. Измерение степени окисления белков осуществляли с помощью вестерн-блоттинга после взаимодействия гомогената белка с DNPH (2-4-динитрофенилгидразином). Для каждого образца проводили нормализацию по отношению к экспрессии эталонного белка бета-актина. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии, \*\*P <0,01 против носитель + носитель; ^P <0,01 против оксалилплатин + носитель.

На фигуре 35 показана оценка ферментативной активности супероксиддисмутазы.

На фигуре 36 показана оценка ферментативной активности супероксиддисмутазы.

На фигуре 37 показана оценка мышечных уровней NF-kB. На 15-й день эксплантировали икроножную мышцу. Измерение степени окисления белков проводили с помощью вестерн-блоттинга. Для каждого образца проводили нормализацию по отношению к экспрессии эталонного белка бета-актина. Данные представлены в виде

среднего значения  $\pm$  S.E.M. величин, полученных от 10 крыс на группу, которых разделяли на две разные экспериментальные сессии,  $**P < 0,01$  против носитель + носитель;  $^{\wedge}p < 0,05$  против оксалилплатин + носитель.

Экспериментальная часть

Пример 1

Материалы и способы

Эксперимент 1

Животные

Использовали самцов крыс Sprague-Dawley массой около 200 г, предоставленных компанией Harlan Company, Italy. Животные содержались в группах по четыре штуки в клетках размером 26 × 41 см в лаборатории Centro per la Stabulazione Animali da Laboratorio (Ce.S.A.L.) университета Università di Firenze с 12-часовым циркадным циклом с неограниченным доступом к воде и пище. Крыс кормили стандартным кормом и содержали при температуре  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Экспериментальная процедура была одобрена местным комитетом по контролю над экспериментами на лабораторных животных. Все эксперименты проводили в соответствии с законодательством Европейского Совета от 24 ноября 1986 года (DL 116/92; 86/609/EEC), касающегося манипуляций с исследуемыми животными, и в соответствии с "National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", признавая руководящие принципы "International Association for the Study of Pain". Все необходимые измерения производили для уменьшения, как минимум, количество животных и их дискомфорта.

Модель мышечного повреждения, индуцированного дексаметазоном

Дексаметазон вводили крысе внутривенно в суточной дозе 600 мкг/кг в течение 15 дней до очевидной потери массы тела по сравнению с контрольной группой, обработанной носителем.

Оценка мышечной функции и моторных способностей

Силу сжатия измеряли с помощью теста «Grip Force test». Целостность способности моторной координации животного, кроме того, анализировали с помощью прибора ротарод Rota Rod, используемого при скорости вращения 10 оборотов в минуту. Животное помещали на вращающийся барабан на 10 минут, измеряли число падений и общее время, проведенное в равновесии. После максимум 6 падений животного сеанс считался завершенным.

Тест Ирвина

Тест проводили в соответствии с работой Ирвина для оценки некоторых

поведенческих параметров, таких как: поведение (спонтанная активность, пассивность, любопытство и т.д.), возбуждение центральной нервной системы (C.N.S.) (тремор, судороги и т.д.), движения (атаксия, стереотипия и т.д.), мышечный тонус (физическая сила и т.д.), рефлекс, произвольные признаки (пилоэрекция, экзофтальмия, слюноотделение и т.д.), токсичность (мгновенная или отсроченная смерть). Все параметры оценивали в диапазоне с пределами 0-4/4-0 (за исключением измерения температуры тела в диапазоне -4/+4 в зависимости от того, является ли это гипертермией или гипотермией).

#### Биопсии тканей

В конце лечения животных умерщвляли и удаляли икрожные, передние большеберцовые мышцы и мышцы разгибателей пальцев. Сухожилия и соединительную ткань удаляли из мышц, которые затем подвергали анализу.

Липопериоксидирование (реакционноспособные вещества тиобарбитуровой кислоты, TBARS)

В лизат ткани добавляли 4 мл 36 мМ тиобарбитуровой кислоты (Sigma-Germany) (в 10% растворе уксусной кислоты (Merck-Germany), доведенном до pH 4,0 с помощью NaOH (Merck-Germany)). Образцы кипятили в течение 1 ч. Реакцию гасили посредством помещения сосудов в лёд, раствор центрифугировали в течение 10 минут при 1600 x g при 4°C. Флуоресценцию, возникающую в результате реакции между малонилдиальдегидом и тиобарбитуровой кислотой, считывали при длине волны возбуждения 530 нм и при длине волны излучения 550 нм (Cayman Chemical Company-США) на флуоресцентном ридере Perkin-Elmer.

#### Окисление белков, оценка уровня карбонилирования белков

Лизат ткани готовили в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl при pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,5% Triton X-100, протеазный ингибитор Complete Protease Inhibitor (Roche-Germany), и подвергали циклу замораживания/оттаивания для завершения лизиса мембраны. Суспензию центрифугировали при 5000 x g при 4°C, раствор супернатанта хранили и концентрацию белка определяли с помощью анализа с использованием бicineхониновой кислоты (Sigma-Germany).

10 г белков денатурировали путем добавления SDS (Sigma-Germany) с получением конечной концентрации SDS 6%. Затем образцы дериватизировали путем добавления 10 мМ DNPH (Sigma-Germany) (2-4-динитрофенилгидразин) и инкубации при комнатной температуре в течение 15 минут. Белки каждого образца разделяли с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле (Bio-Rad-CA) и переносили на

нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad-CA). После блокирования неспецифических сайтов в 1% растворе альбумина (Sigma-Germany) в фосфатном буфере, дополненном 0,1% Tween 20 (Sigma-Germany), мембрану инкубировали с анти-DNPН антителом (1:5000; Chemicon International) в течение ночи при 4°C. Затем инкубировали с анти-кроличьим вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой (1:5000, Celi signaling-USA), в течение 1 часа при комнатной температуре. Экспрессию белка оценивали методом хемилюминесценции (ECL; Pierce-USA); денситометрический анализ проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений «Scion Image». Для каждого образца проводили нормализацию относительно экспрессии эталонного белка бета-актина.

#### Пример 2

#### Эксперимент 2

#### Клеточные культуры

Культуры мышечных миобластов (C2C12) получали из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, Manassas, USA). Клетки культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ глутамина, пенициллина 100 Ед/мл и стрептомицина 100 мкг/мл. Клетки хранили в увлажненном инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> (об./об.). Дифференцировку миобластов в мышечные трубочки индуцировали после достижения 80%-й конфлюэнтности клеток путем замены FBS 2% лошадиной сывороткой. После 7 дней инкубации культура показала характерное образование мышечных трубочек.

#### Фармакологические обработки

Культуры миобластов обрабатывали дексаметазоном (Sigma - Italy), логанином (Apharm, Italy), Раеонифлорин (Apharm, Italy), экстрактом витании (Apharm, Italy), экстрактом виноградных косточек (Farmalabor, Italy) и гидроксиметилбутиратом кальция (НМВ) (Barentz - Italy) при различных концентрациях в зависимости от различных требований, предъявляемых к проведению эксперимента.

#### Анализ жизнеспособности клеток (МТТ)

Мышечные миобласты (C2C12) высевали при 3000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты. Каждая лунка содержала объем, равный 200 мкл среды для выращивания. Через 48 часов клетки обрабатывали в зависимости от различных требований, предъявляемых к проведению эксперимента, с использованием среды DMEM в качестве носителя. Что касается модели повреждения клеток, индуцированного дексаметазоном,

клетки инкубировали с различными концентрациями кортикостероида с исследуемыми веществами или без них. Исследуемые вещества тестировали в комбинации и отдельно без кортикостероидов.

В конце различных фармакологических обработок клетки промывали PBS и в каждую лунку вносили раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, Sigma-Germany) при концентрации 1 мг/мл в среде DMEM, клетки инкубировали в течение 1 часа при 37°C с таким раствором. В конце инкубации отбирали раствор МТТ и в каждую лунку добавляли 100 мкл DMSO (Sigma - Германия), чтобы растворить кристаллы формазана, образовавшиеся в митохондриях живых клеток. Поглощение полученных таким образом фиолетовых растворов измеряли на длине волны 550 нм.

### Пример 3

#### Эксперимент 3

#### Животные

Самцы крыс Sprague-Dawley массой около 200 г были предоставлены компанией Harlan Company, Italy. Животных содержали в группах по четыре штуки в клетках размером 26 × 41 см в лаборатории Centro per la Stabulazione Animali da Laboratorio (Ce.S.A.L.) университета Università di Firenze с 12-часовым циркадным циклом и неограниченным доступом к воде и пище. Крыс кормили стандартным кормом и содержали при температуре 23 ± 1°C. Экспериментальная процедура была одобрена местным комитетом по контролю над экспериментами на лабораторных животных. Все эксперименты проводили в соответствии с законодательством Европейского Совета от 24 ноября 1986 года (DL 116/92; 86/609/ЕЕС), касающегося манипуляций с исследуемыми животными, и в соответствии с "National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", признавая руководящие принципы "International Association for the Study of Pain". Все необходимые измерения производили для уменьшения, как минимум, количество животных и их дискомфорта.

#### Модель мышечного повреждения, индуцированного дексаметазоном

Дексаметазон вводили крысе внутрибрюшинно в суточной дозе 600 мкг/кг в течение 15 дней (Yamamoto et al., Muscle and Nerve, 41:819-827, 2010).

#### Оценки поведения

Моторные способности животных оценивали как спонтанную активность, способность лап к вытягиванию и преодолевать подъем в соответствии со способом, описанным Garcia et al. (Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent

of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995b;26:627-34). Силу сжатия измеряли с помощью теста «Grip Force test» (Ugo Basile, Italy). Устойчивость способности к моторной координации животного дополнительно анализировали с помощью прибора ротарод Rota Rod (Ugo Basile, Varese, Italy), используемого при скорости вращения 10 оборотов в минуту. Животное помещали на вращающийся барабан на 10 минут, измеряли количество падений и общее время, проведенное в равновесии. После максимум 6 падений животное завершало сеанс (Vaught et al., *Neuropharmacology*, 4: 211–216, 1985).

#### Биопсия тканей

В конце обработок животных умерщвляли и удаляли икроножную мышцу и мышцы разгибателя пальцев. Сухожилия и соединительную ткань удаляли из мышц, которые затем анализировали.

#### Гистологический анализ

Ткани фиксировали в 4% параформальдегиде, затем обезвоживали и заключали в парафин. Получали срезы 10 мкм и окрашивали смесью гематоксилин/эозин. Измеряли весь поперечный срез мышцы. Морфометрический и гистологический анализ проводили на оцифрованных изображениях, полученных с помощью 40x микроскопа. Измерения проводили на трех разных участках одного и того же среза (50-75% общей поверхности среза).

#### Иммунофлуоресценция

Для выявления актиновых волокон использовали TRITC-меченный фаллоидин (1:40; Life Technologies, Italy), 4',6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид (DAPI, 1:2000; Sigma-Aldrich, Milan, Italy) для детекции ядер. Предметные стекла микроскопа устанавливали с помощью ProLong (Life Technologies, Milan, Italy) и наблюдались с помощью микроскопа Leica DM6000B (Leica, Mannheim, Germany). Количественный анализ проводили с использованием следующего программного обеспечения: плагин «счетчик клеток» ImageJ; программное обеспечение FIJI (ImageJ, NIH, Bethesda, Maryland, USA); алгоритм «Моменты».

#### Морфометрические измерения

После окраски гематоксилин-эозином или флуоресцентного мечения фаллоидином морфометрические измерения проводили с использованием полных поперечных срезов (программное обеспечение ImageJ). Было проанализировано до 3000 волокон на мышцу на срез. Определяли площадь волокна, количество на световое поле, периметр, минимальный диаметр Ферета (Briguet et al., *Neuromuscular Dis*, 2004, 14:675-682).

### Уровень липофусцина

Срезы мышечной ткани массой 200 мг гомогенизировали в растворе хлороформа/метанола (2:1, об./об.), содержащем 0,005% бутилгидрокситолуола (масса/объем). После центрифугирования при  $1000 \times g$  в течение 0 минут излучаемую флуоресценцию считывали с использованием длины волны излучения 450 нм и длины волны возбуждения 350 нм. (Faist V, Koenig J, Hoeger H, Elmadfa I. Mitochondrial oxygen consumption, lipid peroxidation and antioxidant enzyme systems in skeletal muscle of senile dystrophic mice. *Pflugers Arch.* 1998 Dec;437(1):168-71; Jung T, Höhn A, Grune T. Lipofuscin: detection and quantification by microscopic techniques. *Methods Mol Biol.* 2010;594:173-93).

### Пример 4

#### Эксперимент 4

#### Животные

Использовали самцов крыс Sprague-Dawley массой около 200 г, предоставленных компанией Harlan Company, Italy. Животных содержали в группах по четыре штуки в клетках размером 26 × 41 см в лаборатории Centro per la Stabulazione Animali da Laboratorio (Ce.S.A.L.) университета Università di Firenze с 12-часовым циркадным циклом с неограниченным доступом к воде и пище. Крыс кормили стандартным кормом и содержали при температуре  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Экспериментальная процедура была одобрена местным комитетом по контролю над экспериментами на лабораторных животных. Все эксперименты проводили в соответствии с законодательством Европейского Совета от 24 ноября 1986 года (DL 116/92; 86/609/ЕЕС), касающегося манипуляций с исследуемыми животными, и в соответствии с "National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", признавая руководящие принципы "International Association for the Study of Pain". Все необходимые измерения производили для уменьшения, как минимум, количество животных и их дискомфорта.

#### Модель мышечного повреждения, вызванного оксалилплатином

Оксалилплатин вводили крысе внутрибрюшинно в суточной дозе 2,4 мг/кг в течение 15 дней (Cavaletti et al., *Eur J Cancer*, 2001; Di Cesare Mannelli et al., *Exp Neurol*, 2014).

#### Оценка мышечной функции и моторных способностей

Силу сжатия измеряли с помощью теста Grip Force test (Ugo Basile, Italy). Устойчивость способности к моторной координации животного дополнительно анализировали с помощью прибора ротарод Rota Rod (Ugo Basile, Varese, Italy), используемого при скорости вращения 10 оборотов в минуту. Животное помещали на

вращающийся барабан на 10 минут, измеряли количество падений и общее время, проведенное в равновесии. После максимум 6 падений животного сеанс считался завершенным (Vaught et al., *Neuropharmacology*, 4: 211–216, 1985).

#### Тест Ирвина

Тест проводили в соответствии с работой Ирвина (*Psychopharmacologia* 13: 222-257; 1968) для оценки некоторых параметров поведения, таких как: поведение (спонтанная активность, пассивность, любопытство и т.д.), возбуждение ЦНС (тремор, судороги и т.д.), движения (атаксия, стереотипия и т.д.), мышечный тонус (физическая сила и т.д.), рефлекс, произвольные признаки (пилоэрекция, экзофтальмия, слюноотделение и т.д.), токсичность (мгновенная или отсроченная смерть). Все параметры оценивали в диапазоне с пределами 0-4/4-0 (за исключением измерения температуры тела в диапазоне -4/+4 в зависимости от того, является ли это гипертермией или гипотермией).

#### Биопсия тканей

В конце лечения животных умерщвляли и удаляли икроножные мышцы, передние большеберцовые мышцы и мышцы разгибателей пальцев. Сухожилия и соединительную ткань удаляли из мышц, которые затем анализировали.

#### Гистологический анализ

Ткани фиксировали в 4% параформальдегиде, затем обезвоживали и заключали в парафин. Получали срезы 10 мкм и окрашивали смесью гематоксилин/эозин. Измеряли весь поперечный срез мышцы. Морфометрический и гистологический анализ проводили на оцифрованных изображениях, полученных с помощью 40x микроскопа. Измерения проводили на трех разных участках одного и того же среза (50-75% общей поверхности среза).

#### Иммунофлуоресценция

Для выявления актиновых волокон использовали TRITC-меченный фаллоидин (1:40; Life Technologies, Italy), 4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид (DAPI, 1:2000; Sigma-Aldrich, Milan, Italy) для детекции ядер. Предметные стекла микроскопа устанавливали с помощью ProLong (Life Technologies, Milan, Italy) и наблюдались с помощью микроскопа Leica DM6000B (Leica, Mannheim, Germany). Количественный анализ проводили с использованием следующего программного обеспечения: плагин «счетчик клеток» ImageJ; программное обеспечение FIJI (ImageJ, NIH, Bethesda, Maryland, USA); алгоритм «Моменты».

#### Морфометрические измерения

После окраски гематоксилин-эозином или флуоресцентного мечения фаллоидином морфометрические измерения проводили с использованием полных поперечных срезов (программное обеспечение ImageJ). Было проанализировано до 3000 волокон на мышцу на срез. Определяли площадь волокна, количество на световое поле, периметр, минимальный диаметр Ферета (Briguet et al., Neuromuscular Dis, 2004, 14:675-682).

Липопериоксидирование (реакционноспособные вещества тиобарбитуровой кислоты, TBARS)

В лизат ткани добавляли 4 мл 36 мМ тиобарбитуровой кислоты (Sigma-Germany) (в 10% растворе уксусной кислоты (Merck-Germany), доведенном до pH 4,0 с помощью NaOH (Merck-Germany)). Образцы кипятили в течение 1 ч. Реакцию гасили посредством помещения сосудов в лёд, раствор центрифугировали в течение 10 минут при 1600 x g при 4°C. Флуоресценцию, возникающую в результате реакции между малонилдиальдегидом и тиобарбитуровой кислотой, считывали при длине волны возбуждения 530 нм и при длине волны излучения 550 нм (Cayman Chemical Company-США) на флуоресцентном ридере Perkin-Elmer.

Окисление белков, оценка уровня карбонилирования белков

Лизат ткани готовили в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl при pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,5% Triton X-100, протеазный ингибитор Complete Protease Inhibitor (Roche-Germany), и подвергали циклу замораживания/оттаивания для завершения лизиса мембраны. Суспензию центрифугировали при 5000 × g при 4°C, раствор супернатанта хранили и концентрацию белка определяли с помощью анализа с использованием бицинхониновой кислоты (Sigma-Germany). 10 г белков денатурировали путем добавления SDS (Sigma-Germany) с получением конечной концентрации SDS 6%. Затем образцы дериватизировали путем добавления 10 мМ DNPH (Sigma-Germany) (2-4-динитрофенилгидразин) и инкубации при комнатной температуре в течение 15 минут. Белки каждого образца разделяли с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле (Bio-Rad-CA) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad-CA). После блокирования неспецифических сайтов в 1% растворе альбумина (Sigma-Germany) в фосфатном буфере, дополненном 0,1% Tween 20 (Sigma-Germany), мембрану инкубировали с анти-DNPH антителом (1:5000; Chemicon International) в течение ночи при 4°C. Затем инкубировали с антикроличьим вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой (1:5000, Celi signaling-USA), в течение 1 часа при комнатной температуре. Экспрессию белка оценивали методом хемилюминесценции (ECL; Pierce-USA); денситометрический анализ проводили с использованием программного обеспечения для

анализа изображений «Scion Image». Для каждого образца проводили нормализацию относительно экспрессии эталонного белка бета-актина.

#### Ферментативная активность и уровень аминокислот

Активность супероксиддисмутазы определяли с помощью реакции в системе ксантин-ксантиноксидаза (Ding et al., Mol Nutr Food Res. 2013 Feb;57(2):365-9). Уровни креатинкиназы определяли с помощью ферментативного анализа, отслеживая никотинамид-аденин-дифосфопиридин - NADPH. Тестостерон определяли методом ELISA. Уровни глутамина в плазме и мышцах определяли с помощью ферментативной реакции, основанной на гидролизе глутамина до глутамата.

#### Вестерн-блот

Ткань гомогенизировали в буфере для лизиса, содержащем 50 мМ Tris-HCl при pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,5% Triton X-100, протеазный ингибитор Complete Protease Inhibitor (Roche). Гомогенат инкубировали в течение 30 минут на льду, затем обрабатывали ультразвуком с 3 импульсами в течение 10 секунд и центрифугировали в течение 15 мин при 13000 x g при 4°C. Белки, присутствующие в супернатанте, определяли с помощью анализа с использованием бицинхониновой кислоты. 30 мкг таких белков на каждый образец разделяли с помощью электрофореза на 4-12% полиакриламидном градиенте и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. После блокирования неспецифических сайтов связывания мембрану инкубировали с поликлональным антителом, специфическим к NFκB, в течение 16 ч при 4°C; после этого следовала инкубация в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой. Экспрессию белка оценивали методом хемилюминесценции. Денситометрический анализ проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений «Scion Image». Для каждого образца проводили нормализацию относительно бета-актина.

#### Пример 5

##### Композиция по изобретению

Изготавливали композицию в форме гранул, содержащую:

- 1 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;
  - 150 мг экстракта виноградных косточек;
  - 300 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*);
  - 3 г орнитин-альфа-кетоглутарата;
- вместе с общепринятыми вспомогательными веществами и носителями.

## Пример 6

Композиция по изобретению

Изготавливали композицию в форме порошка, содержащую:

- 1 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;
  - 150 мг экстракта виноградных косточек;
  - 300 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*);
  - 3 г орнитин-альфа-кетоглутарата;
- вместе с общепринятыми вспомогательными веществами и носителями.

## Пример 7

- 1 г 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты;
  - 150 мг экстракта виноградных косточек;
  - 300 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*);
  - 3 г орнитин-альфа-кетоглутарата;
- вместе с общепринятыми вспомогательными веществами и носителями.

## Пример 8

Композиция по изобретению

Композицию изготавливали в форме порошка, содержащую:

- 1 г кальциевой соли 3-гидрокси-3-метилбутаноата;
  - 150 мг экстракта виноградных косточек;
  - 300 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*);
  - 3 г орнитин-альфа-кетоглутарата;
- вместе с общепринятыми вспомогательными веществами и носителями.

## Пример 9

Композиция по изобретению

Композицию изготавливали в форме порошка, содержащую:

- 1,5 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;
  - 250 мг экстракта виноградных косточек;
  - 250 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*);
  - 3,5 г орнитин-альфа-кетоглутарата;
- вместе с общепринятыми вспомогательными веществами и носителями.

## Пример 10

Композиция по изобретению

Композицию изготавливали в форме порошка, содержащую:

- 1,5 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;
- 250 мг экстракта виноградных косточек;
- 250 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*);
- 3,5 г орнитин-альфа-кетоглутарата;
- 10,3 г смеси L-лейцина, L-валина, L-изолейцина, L-гистидина, L-лизина, L-метионина, L-цистина или L-цистеина, L-фенилаланина, L-тирозина, L-треонина, L-глутамин, L-аргинина и L-триптофана;
- витамин B6;
- витамин D3;
- креатин;

вместе со вспомогательными веществами и добавками, среди которых ароматизаторы мальтодекстрины, гидроксипропилметилцеллюлоза, сложные эфиры сахарозы, лимонная кислота, сукралоза и диоксид кремния.

## Пример 11

Композиция по изобретению

Композицию изготавливали в форме порошка, содержащую:

- 1,5 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;
- 250 мг экстракта виноградных косточек;
- 250 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*);
- 3,5 г орнитин-альфа-кетоглутарата;
- 10,3 г смеси L-лейцина, L-валина, L-изолейцина, L-гистидина, L-лизина, L-метионина, L-цистина или L-цистеина, L-фенилаланина, L-тирозина, L-треонина L-глутамин, L-аргинина и L-триптофана;
- 1,5 мг витамина B6;
- 20 мкг витамина D3;
- 1500 мг креатина;

мальтодекстрины, гидроксипропилметилцеллюлозу, сложные эфиры сахарозы, лимонную кислоту, ароматизаторы, заменители сахара и антислеживающие агенты.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация активных ингредиентов, содержащая 3-гидрокси-3-метилбутановую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль, экстракт виноградных косточек и экстракт витании.

2. Комбинация по п. 1, отличающаяся тем, что указанная фармацевтически приемлемая соль 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты представляет собой соль кальция.

3. Комбинация по п. 1, отличающаяся тем, что указанная композиция, кроме того, содержит орнитин-альфа-кетоглутарат.

4. Комбинация по п. 2 или 3, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой фиксированную комбинацию 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция/экстракта виноградных косточек/экстракта витании/орнитин-альфа-кетоглутарата в реципрокном массовом соотношении 1/0,1-0,30/0,1-0,5/2-5, соответственно.

5. Комбинация по п. 4, отличающаяся тем, что указанная комбинация представляет собой фиксированную комбинацию 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция/экстракта виноградных косточек/экстракта витании/орнитин-альфа-кетоглутарата в реципрокном массовом соотношении 1/0,15/0,30/3, соответственно.

6. Комбинация по п. 4, отличающаяся тем, что указанная комбинация представляет собой фиксированную комбинацию 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция/экстракта виноградных косточек/экстракта витании/орнитин-альфа-кетоглутарата в реципрокном массовом соотношении 1/0,16/0,16/2,3, соответственно.

7. Фармацевтическая или нутрицевтическая композиция, содержащая комбинацию по любому из пп. 1-6 вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

8. Композиция по п. 7 в форме единичной дозы, содержащая:

- от 1 до 4 г 3-гидрокси-3-метилбутановой кислоты;

- от 100 до 500 мг экстракта виноградных косточек;

- от 100 до 1000 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*); и

- от 1 до 10 г орнитин-альфа-кетоглутарата,

вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

9. Композиция по п. 8, содержащая:

- 1 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;

- 150 мг экстракта виноградных косточек;

- 300 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania*

somnifera); и

- 3 г орнитин-альфа-кетоглутарата;

вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

10. Композиция по п. 8, содержащая:

- 1,5 г 3-гидрокси-3-метилбутаноата кальция;

- 250 мг экстракта виноградных косточек;

- 250 мг экстракта витании, предпочтительно витании снотворной (*withania somnifera*); и

- 3,5 г орнитин-альфа-кетоглутарата;

вместе с общепринятыми носителями и/или вспомогательными веществами.

11. Композиция по любому из пп. 7-10, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой твердую композицию или гель для перорального введения.

12. Композиция по п. 11, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой твердую пероральную композицию в форме гранул, порошка или геля.

13. Композиция по любому из пп. 7-12, отличающаяся тем, что указанная композиция, кроме того, содержит аминокислоты и/или витамины.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит одну или несколько аминокислот, выбранных из L-лейцина, L-валина, L-изолейцина, L-гистидина, L-лизина, L-метионина, L-цистина, L-цистеина, L-фенилаланина, L-тирозина, L-треонина, L-глутамина, L-аргинина и L-триптофана.

15. Композиция по п. 13 или 14, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит витамин B6 и/или витамин D3.

16. Композиция по любому из пп. 13-15, отличающаяся тем, что указанная композиция, кроме того, содержит креатин.

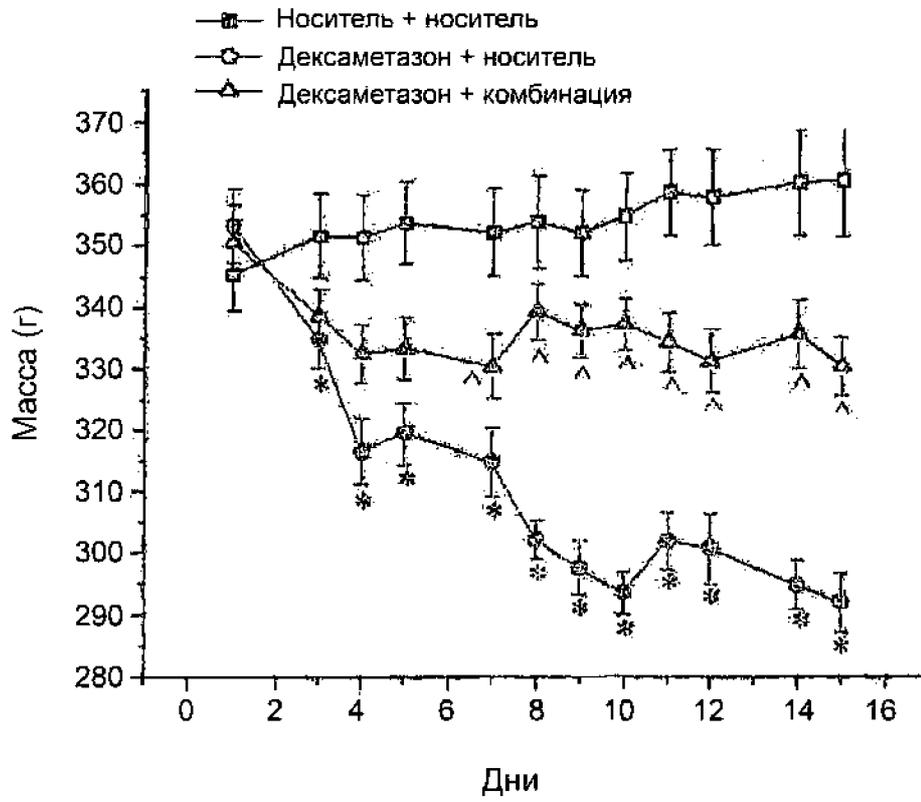
17. Комбинация по любому из пп. 1-6 для ее применения в лечении и/или предупреждении возникновения саркопении, и/или в качестве анаболического стероида.

18. Композиция по любому из пп. 7-16 для ее применения в лечении и/или предупреждении возникновения саркопении, и/или в качестве анаболического стероида.

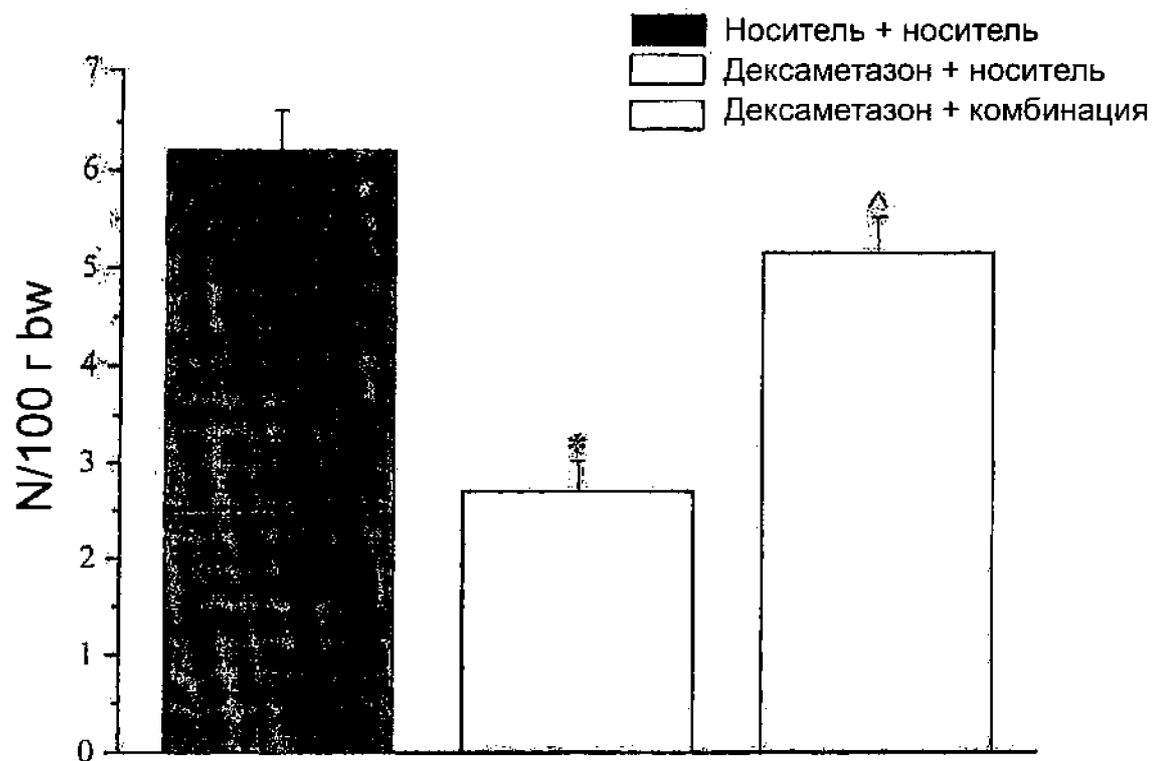
19. Комбинация для применения по п. 17 для увеличения мышечной массы во время тренировки или у пожилых и ослабленных людей, а также у людей, которые потеряли мускулатуру из-за отсутствия активности или приковывания к постели; в условиях кахексии; для защиты мышц от повреждений, индуцированных интенсивной

тренировкой, и для устранения ощущения усталости и/или улучшения физической работоспособности.

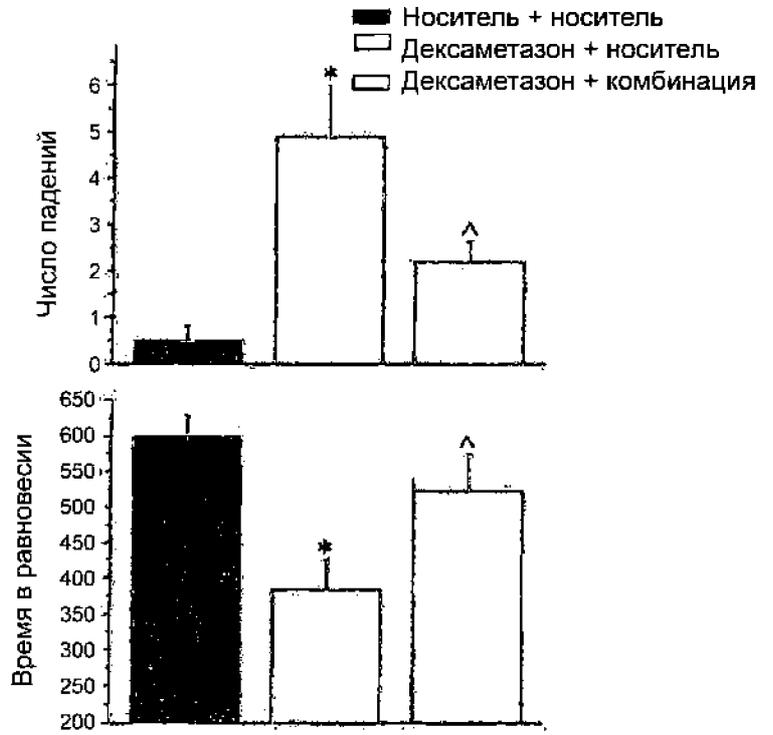
20. Композиция для применения по п. 18 для увеличения мышечной массы во время тренировки или у пожилых и ослабленных людей, а также у людей, которые потеряли мускулатуру из-за отсутствия активности или приковывания к постели; в состояниях кахексии; для защиты мышц от повреждений, индуцированных интенсивной тренировкой, и для устранения ощущения усталости и/или для улучшения физической работоспособности.



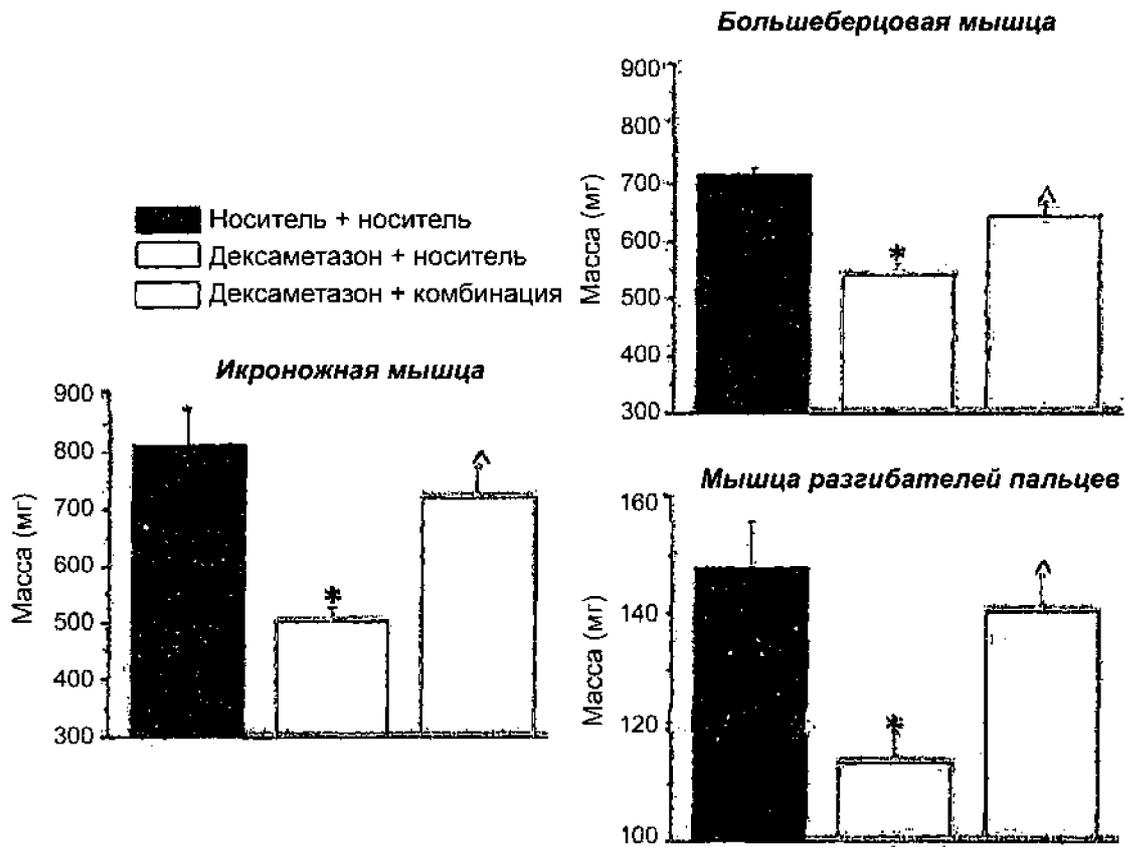
Фиг. 1



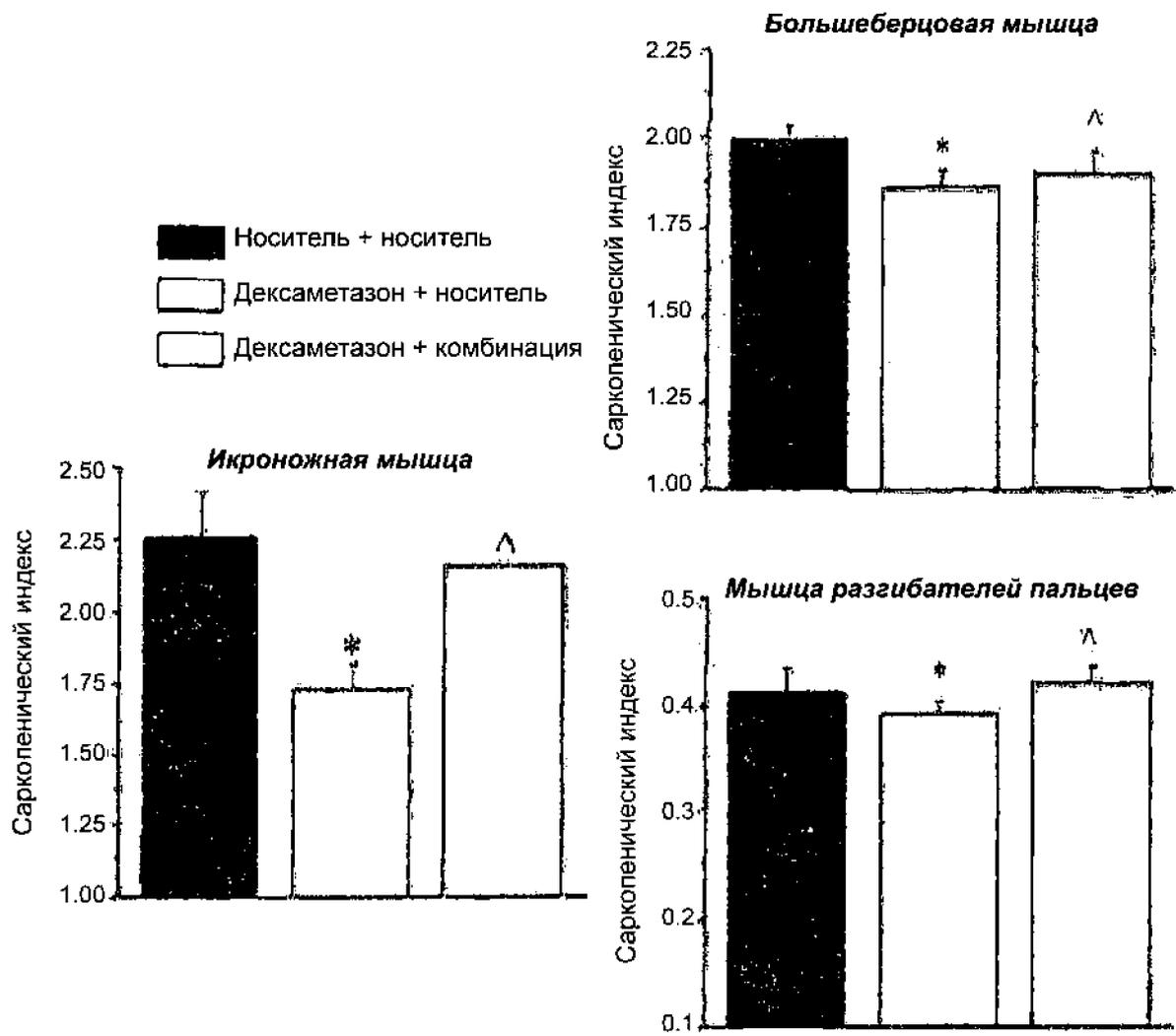
Фиг. 2



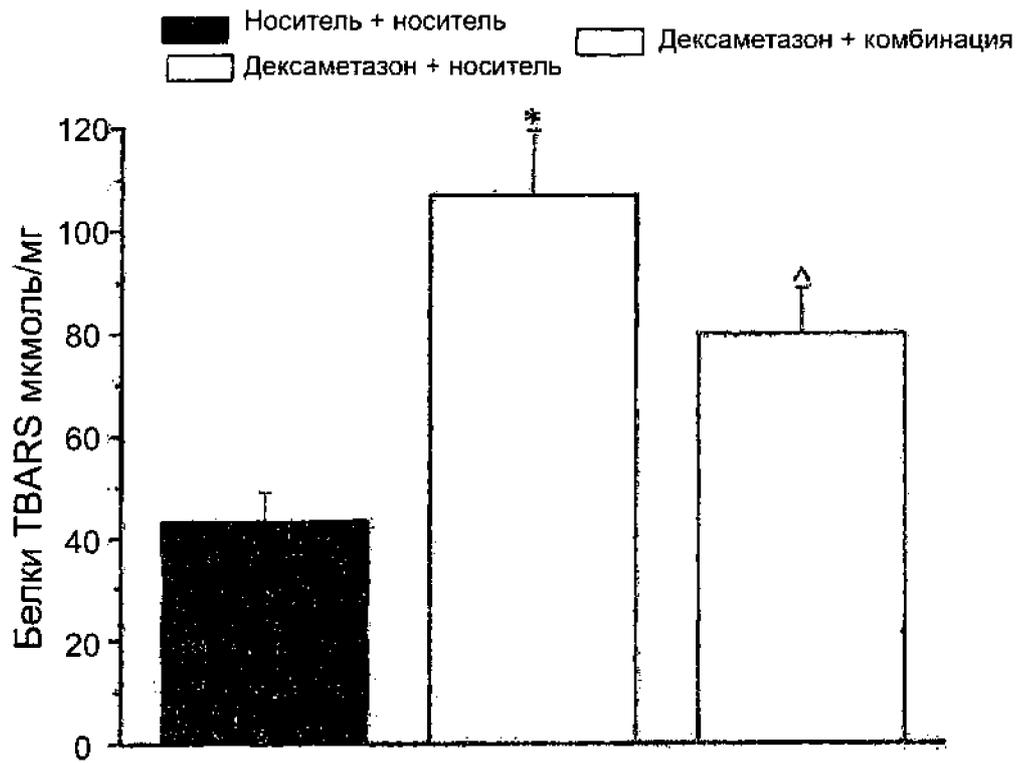
Фиг. 3



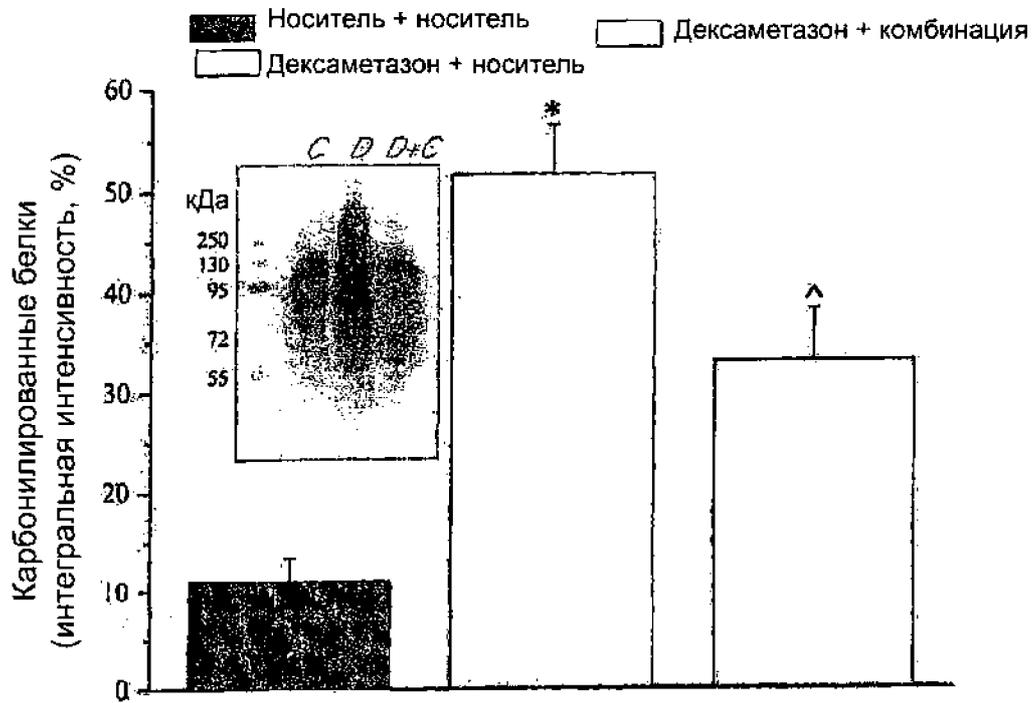
Фиг. 4



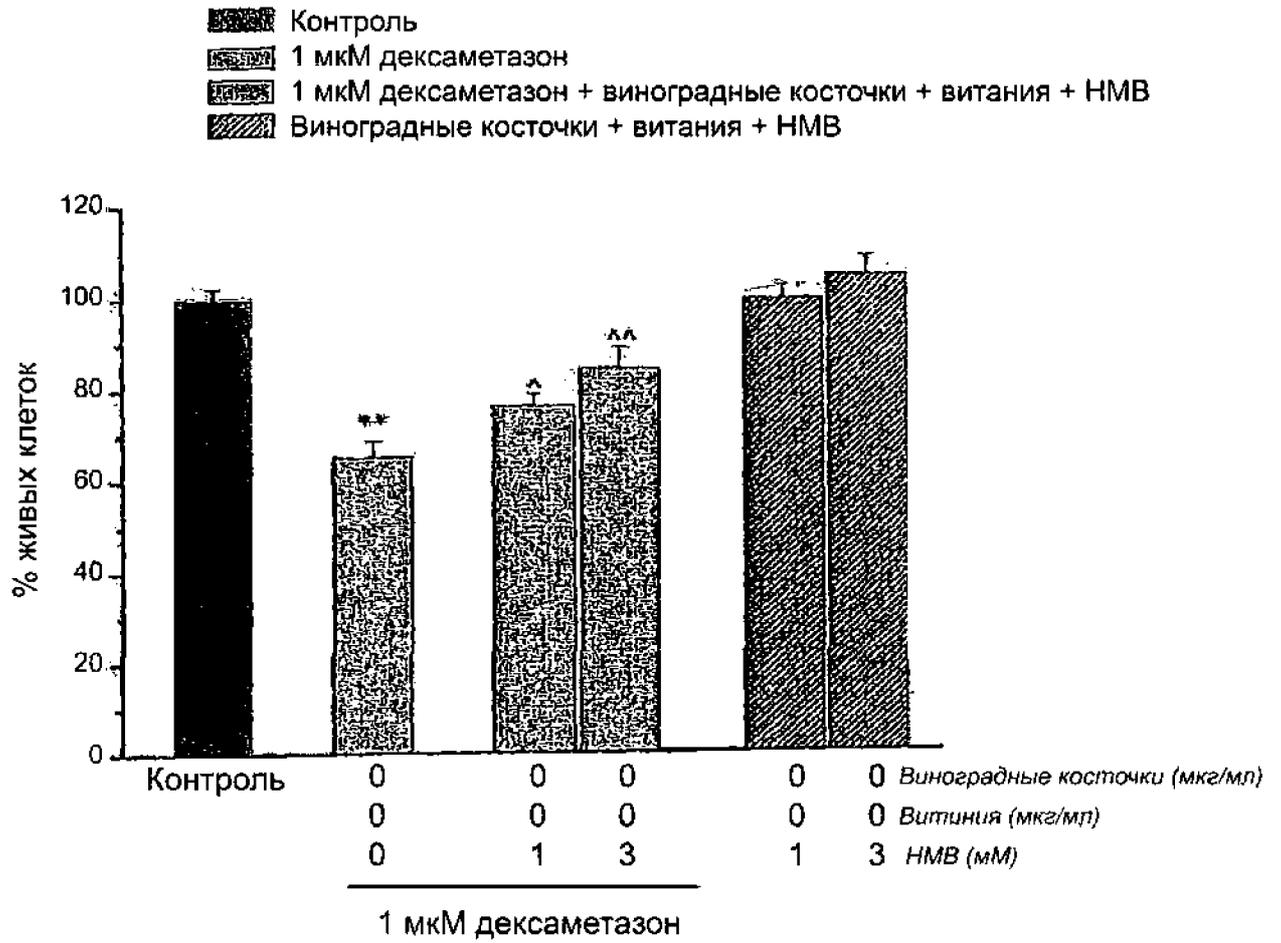
Фиг. 5



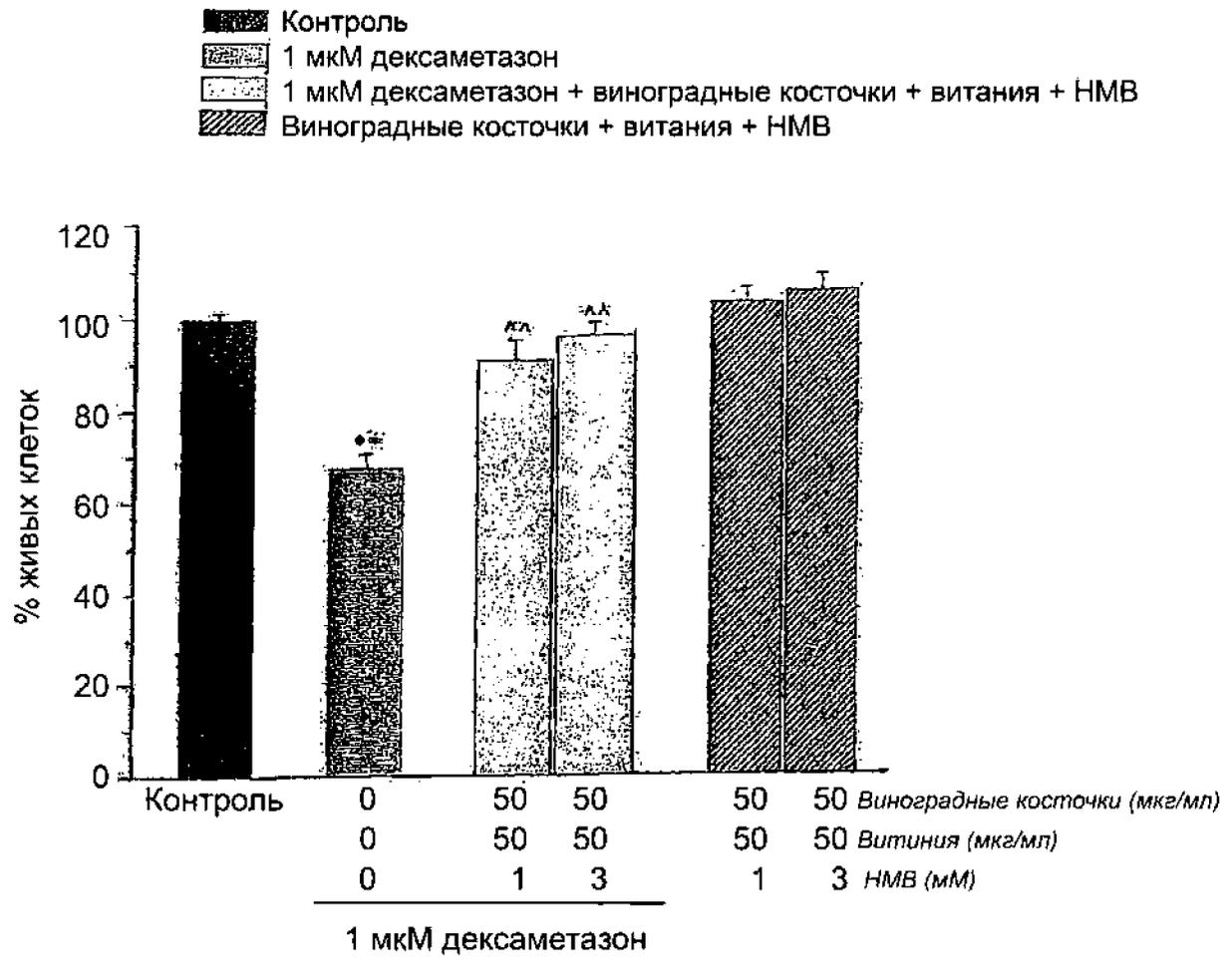
Фиг. 6



Фиг. 7



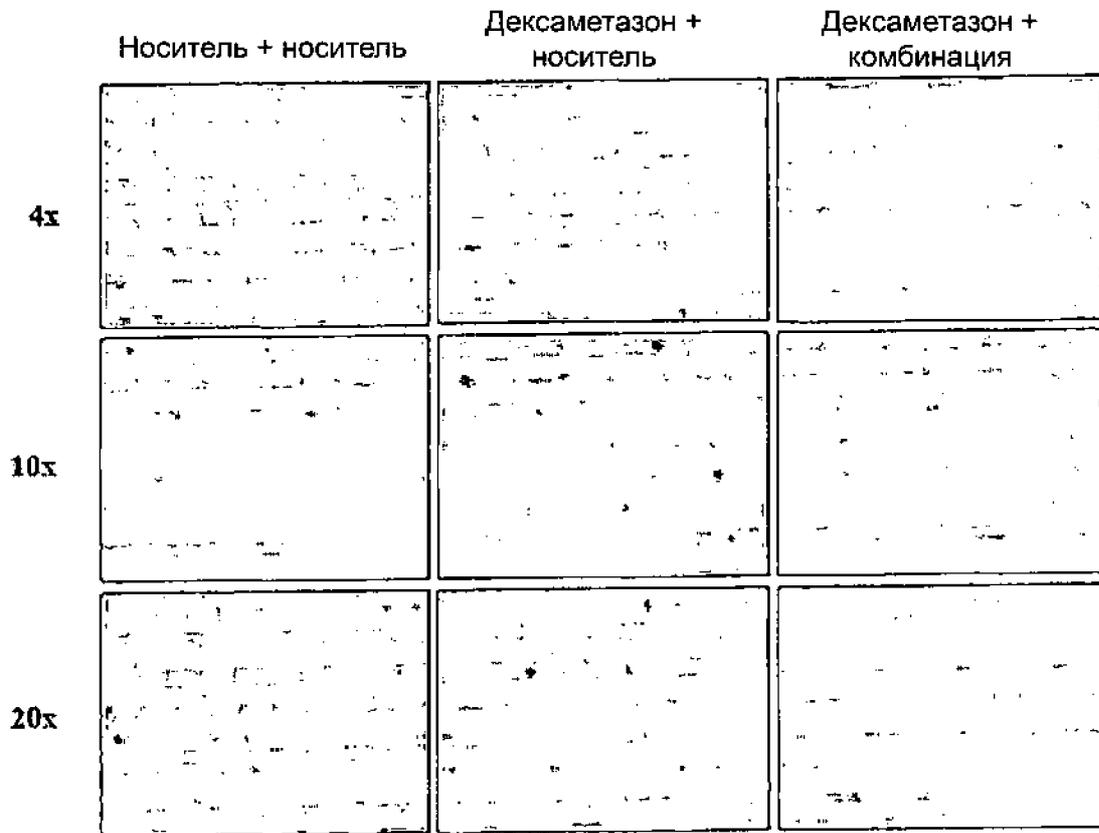
Фиг. 8



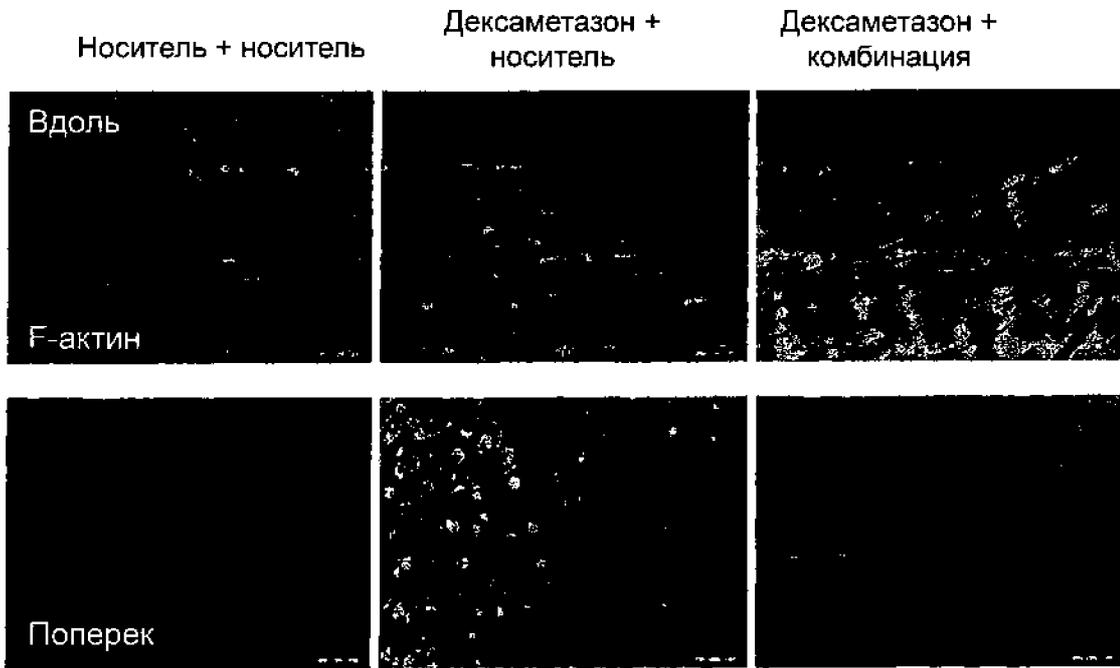
Фиг. 9

	Обработки			Пределы
	Носитель + носитель	Дексаметазон + носитель	Дексаметазон + комбинация	
<b>Поведение</b>				
Спонтанная активность	4	2	4	4-0
Пассивность	0	2	1	0-4
Уход за собой	4	4	4	4-0
Любопытство	4	3	4	4-0
Реактивность	4	3	4	4-0
Голосовая коммуникация	0	0	0	0-4
<b>Возбуждение ЦНС</b>				
Штрауб-хвост	0	0	0	0-4
Тремор	0	0	0	0-4
Конвульсии	0	0	0	4-0
<b>Движения</b>				
Атаксия	0	0	0	0-4
Стереотипия	0	0	0	0-4
Рефлексы выпрямления	4	4	4	4-0
<b>Мышечный тонус</b>				
Физическая сила	4	1	3	4-0
<b>Рефлексы</b>				
Палпебральный рефлекс	4	4	4	4-0
<b>Анатомические признаки</b>				
Пилоэрекция	0	0	0	0-4
Экзофтальмия	0	0	0	0-4
Цианоз	0	0	0	0-4
Приливы	0	0	0	0-4
Бледность	0	1	0	0-4
Открытие века	4	4	4	4-0
Слюновыделение	0	0	0	0-4
Слезотечение	0	0	0	0-4
Гипо-Гипертермия	0	0	0	-4/+4
Принимание вынужденной позы (в связи с болевым синдромом)	0	0	0	0-4
<b>Токсичность</b>				
Немедленная смерть	0	0	0	0-4
Отложенная смерть (через 48 часов)	0	0	0	0-4

Фиг. 10

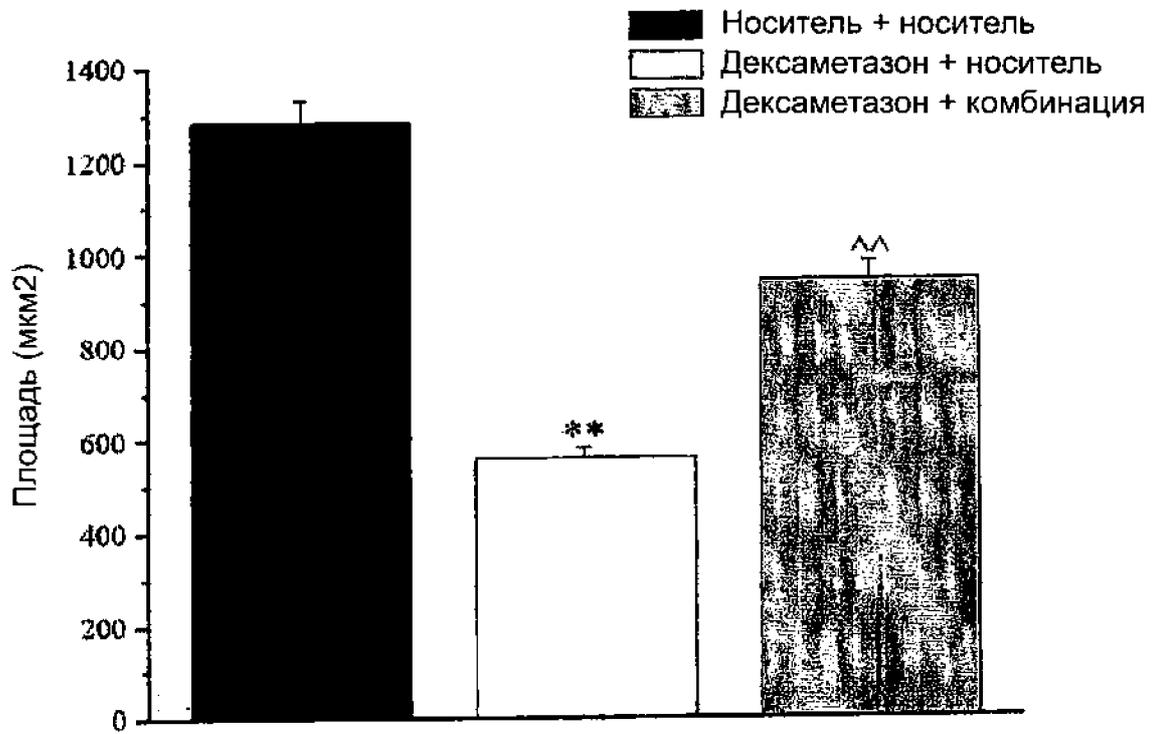


ФИГ. 11



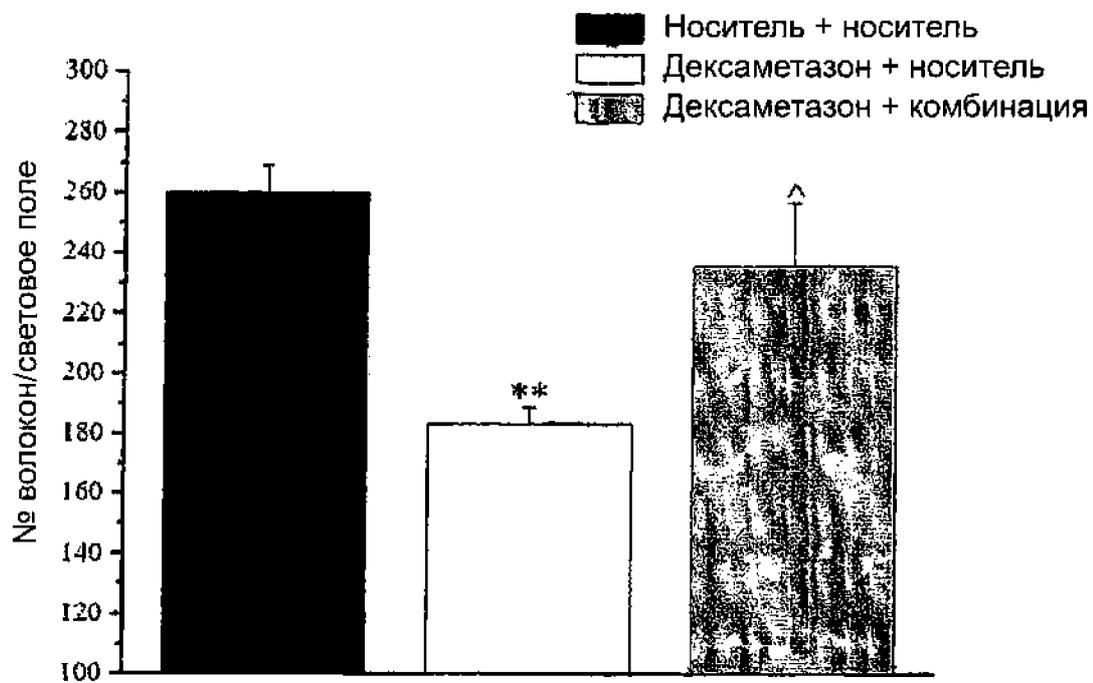
10 x увеличение

Фиг. 12



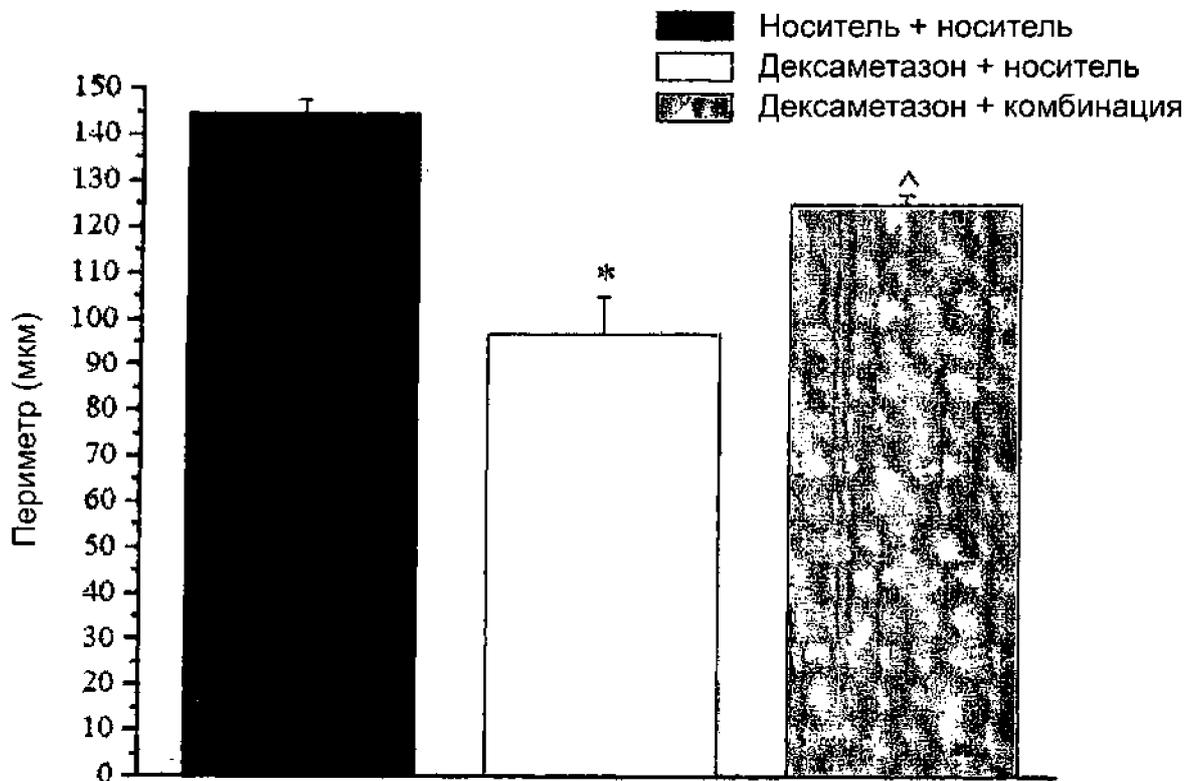
\* $P < 0,01$  против носитель + носитель;  $P < 0,01$  против дексаметазон + носитель

Фиг. 13



\* $P < 0,01$  против носитель + носитель;  $P < 0,05$  против дексаметазон + носитель

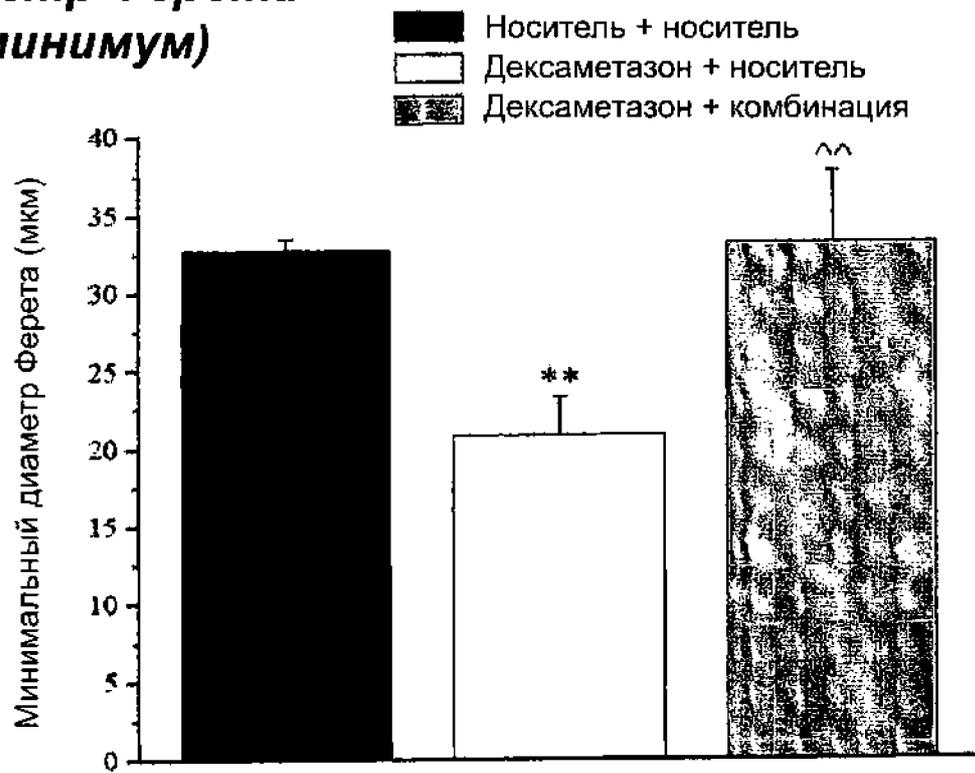
Фиг. 15



\* $P < 0,05$  против носитель + носитель;  $P < 0,05$  против дексаметазон + носитель

Фиг. 16

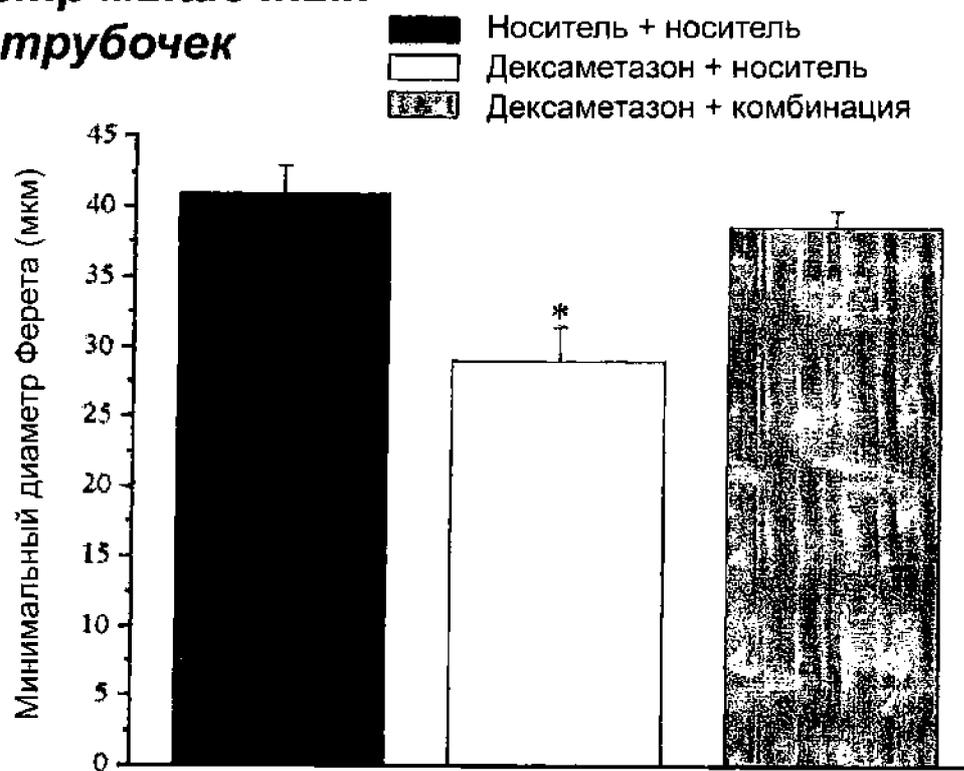
## Диаметр Ферета (минимум)



\* $P < 0,01$  против носитель + носитель;  $P < 0,01$  против дексаметазон + носитель

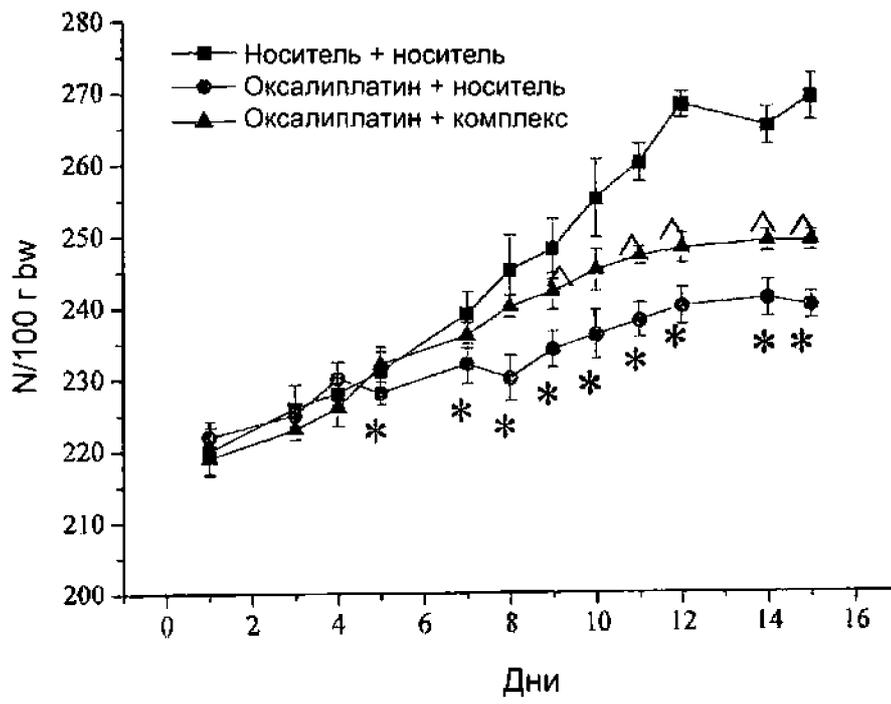
Фиг. 17

## Диаметр мышечных трубочек

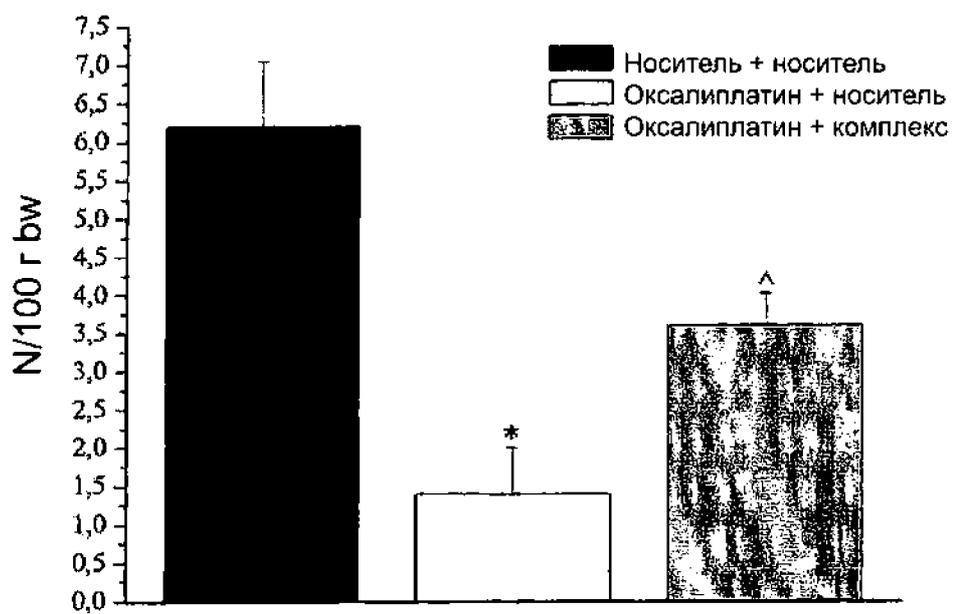


\* $P < 0,05$  против носитель + носитель;  $P < 0,05$  против дексаметазон + носитель

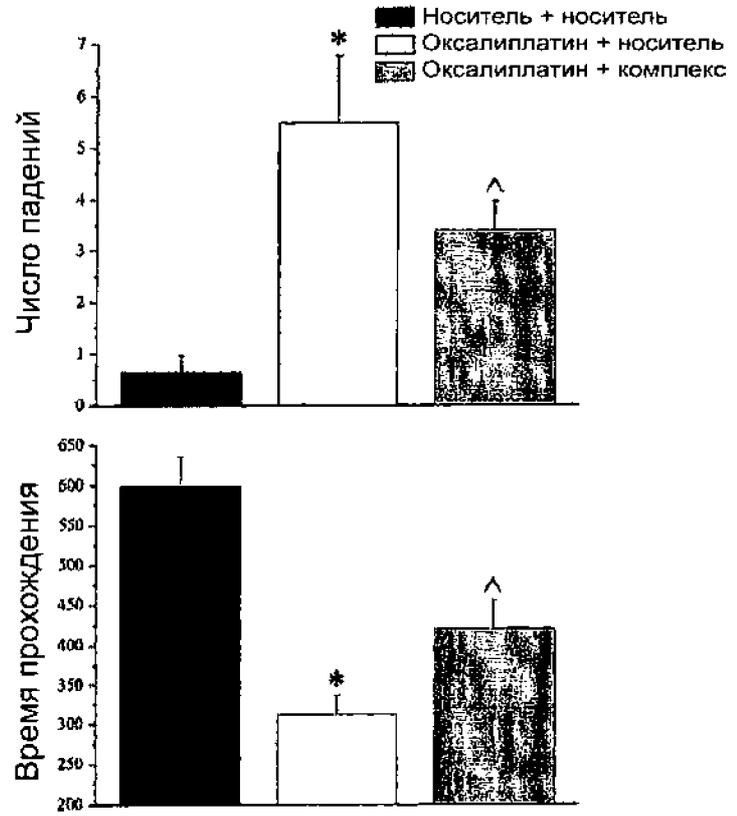
Фиг. 18



Фиг. 19



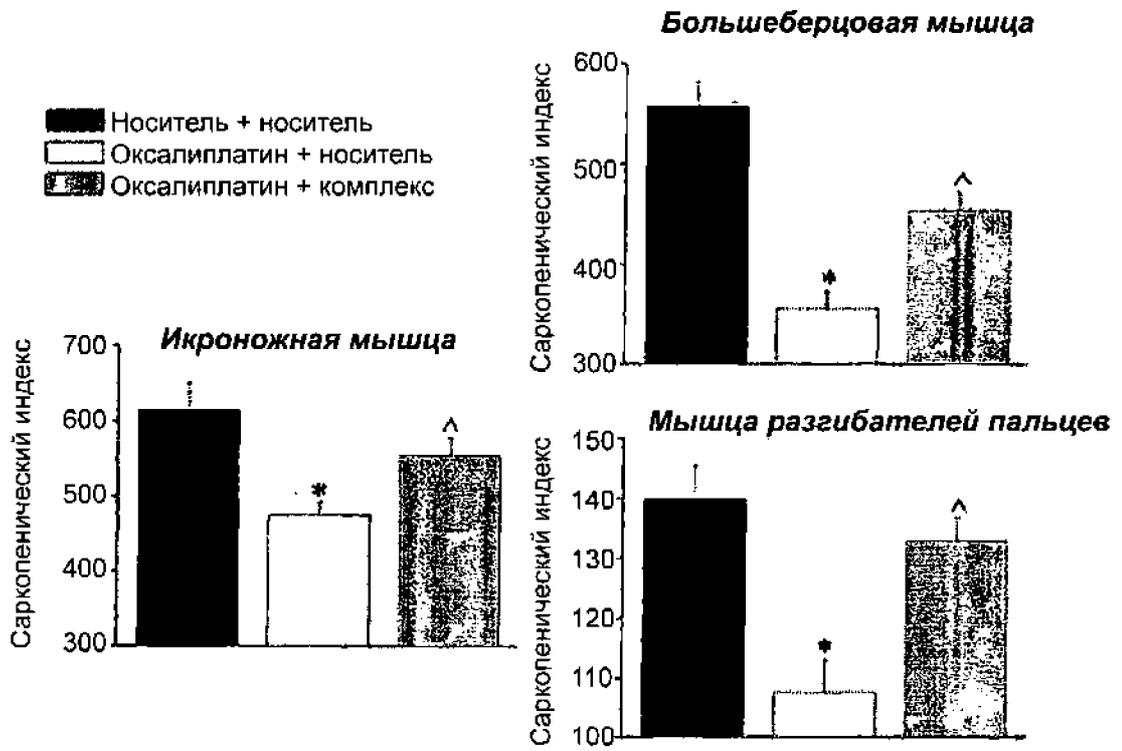
Фиг. 20



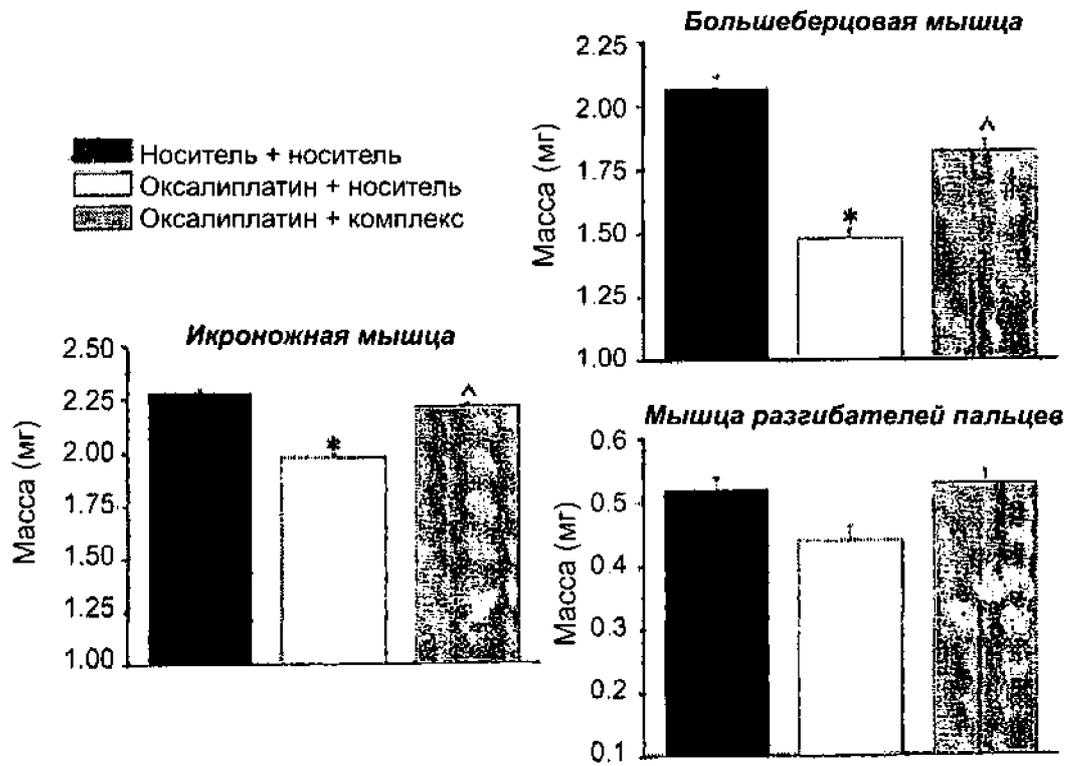
Фиг. 21

	Обработки			Пределы
	носитель + носитель	оксалиплатин + носитель	оксалиплатин + комбинация	
<b>Поведение</b>				
Спонтанная активность	4	1	4	4-0
Пассивность	0	2	1	0-4
Уход за собой	4	2	3	4-0
Любопытство	4	2	4	4-0
Реактивность	4	2	4	4-0
Голосовая коммуникация	0	0	0	0-4
<b>Возбуждение ЦНС</b>				
Штрауб-хвост	0	0	0	0-4
Тремор	0	0	0	0-4
Конвульсии	0	0	0	4-0
<b>Движения</b>				
Атаксия	0	0	0	0-4
Стереотипия	0	0	0	0-4
Рефлексы выпрямления	4	2	4	4-0
<b>Мышечный тонус</b>				
Физическая сила	4	1	3	4-0
<b>Рефлексы</b>				
Палпебральный рефлекс	4	4	4	4-0
<b>Анатомические признаки</b>				
Пилоэрекция	0	0	0	0-4
Экзофтальмия	0	0	0	0-4
Цианоз	0	0	0	0-4
Приливы	0	0	0	0-4
Бледность	0	3	1	0-4
Открытие века	4	4	4	4-0
Слюновыделение	0	0	0	0-4
Слезотечение	0	0	0	0-4
Гипо-Гипертермия	0	0	0	-4/+4
Принимание вынужденной позы (в связи с болевым синдромом)	0	0	0	0-4
<b>Токсичность</b>				
Немедленная смерть	0	0	0	0-4
Отложенная смерть (через 48 часов)	0	0	0	0-4

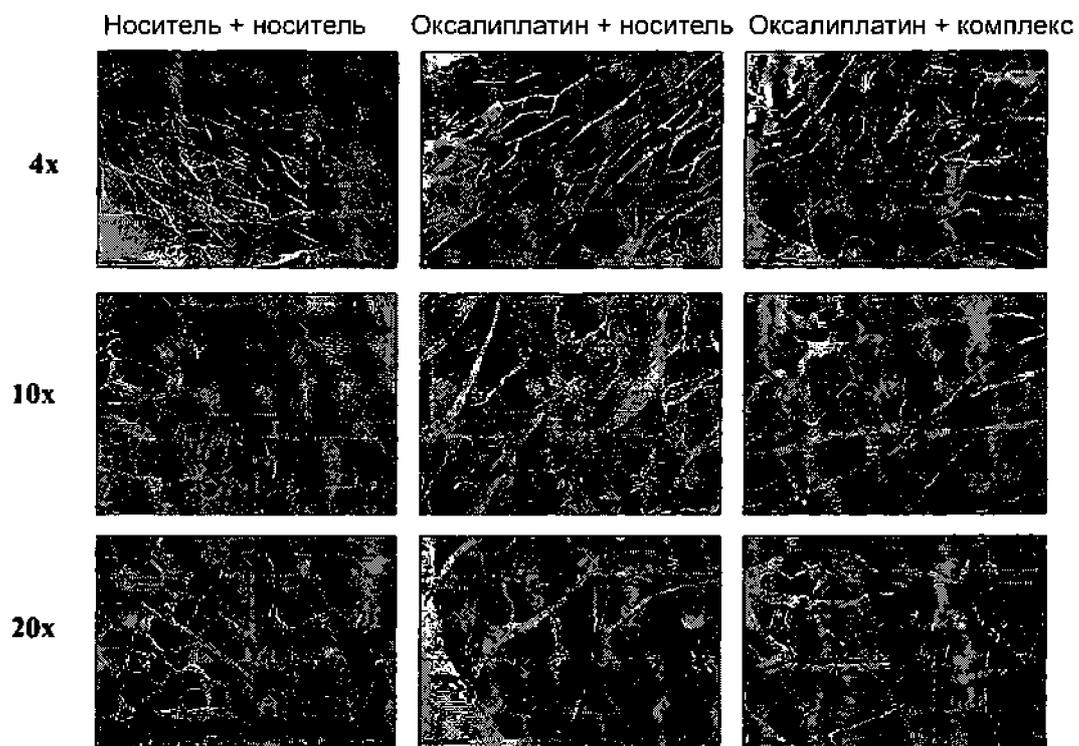
Фиг. 22



Фиг. 23

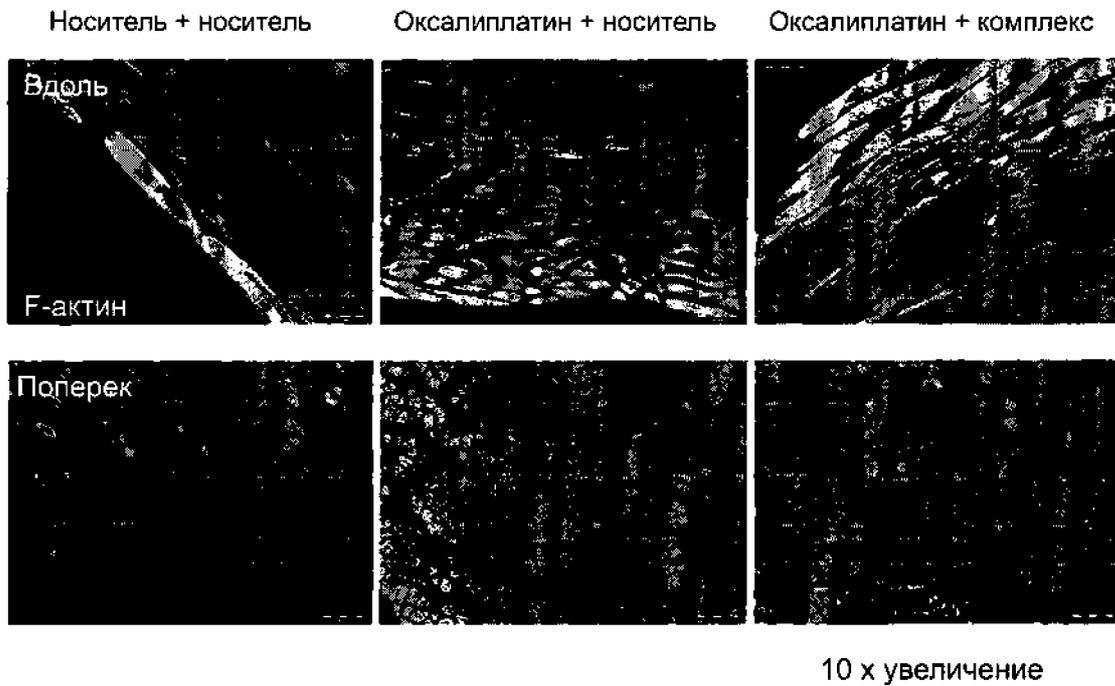


Фиг. 24

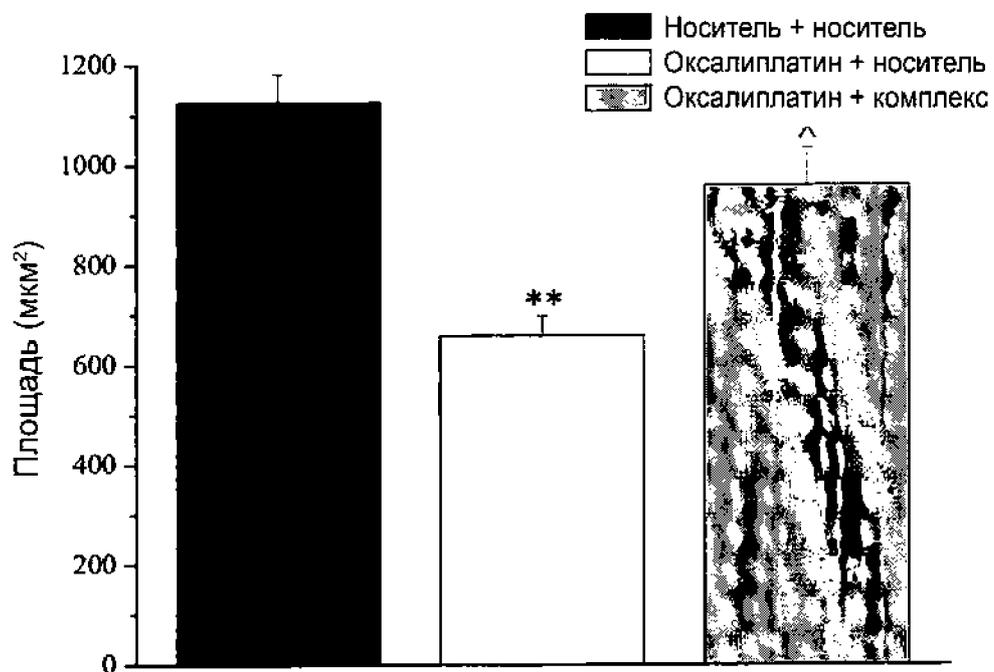
**Гистологическое исследование: окраска гематоксилин-эозином**

Фиг. 25

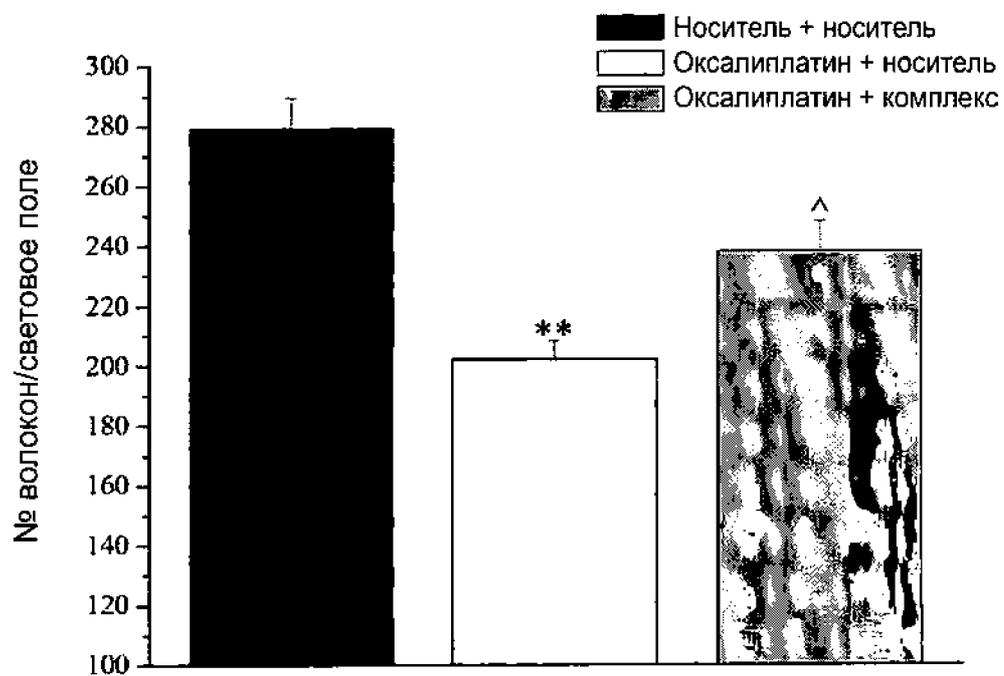
***F-актин с помощью фаллоидина: морфометрия и мышечные трубочки***



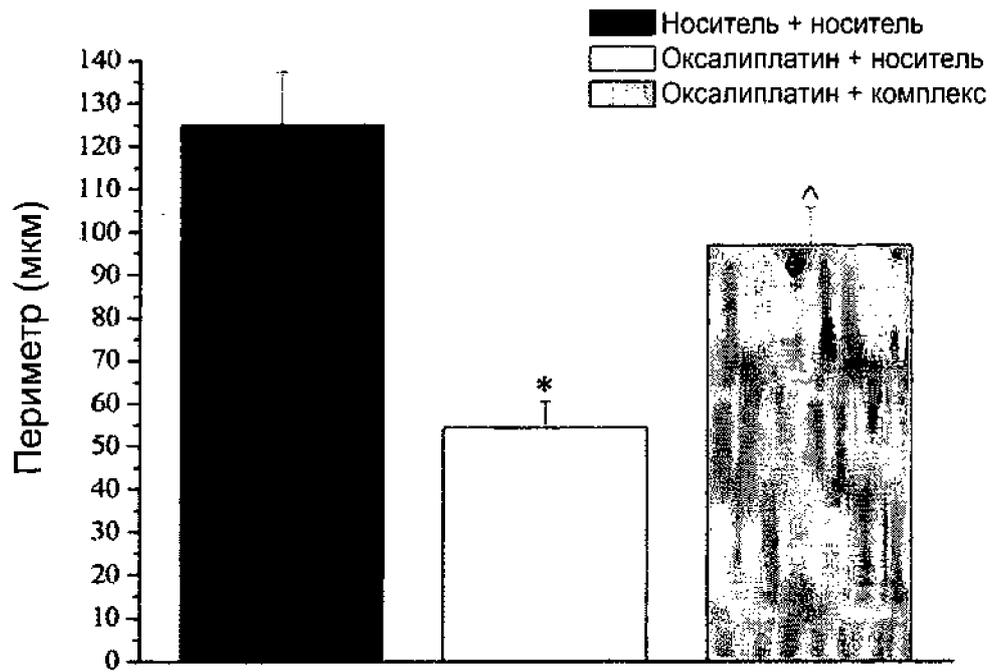
**Фиг. 26**



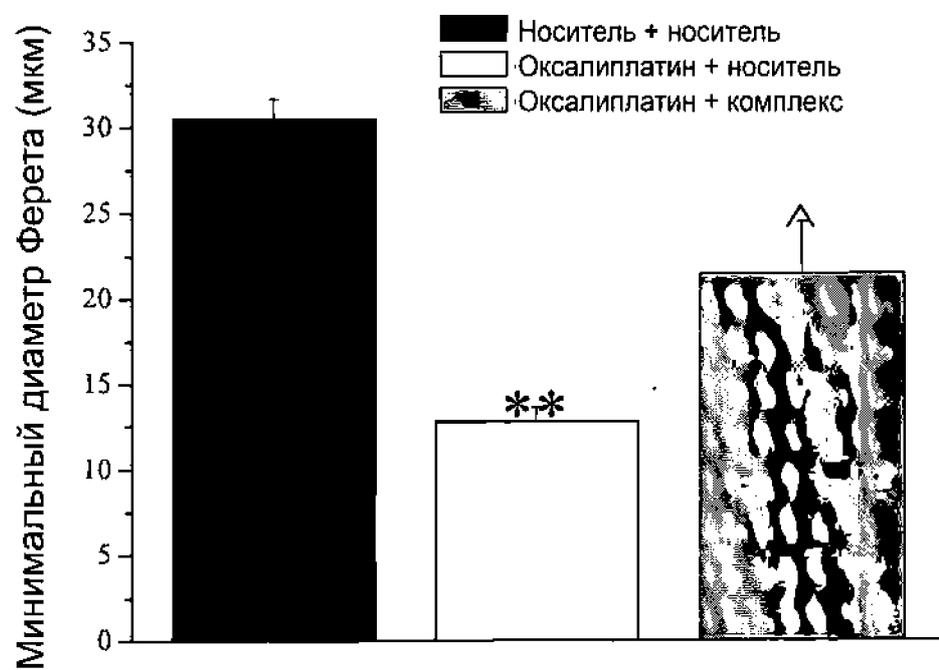
Фиг. 27



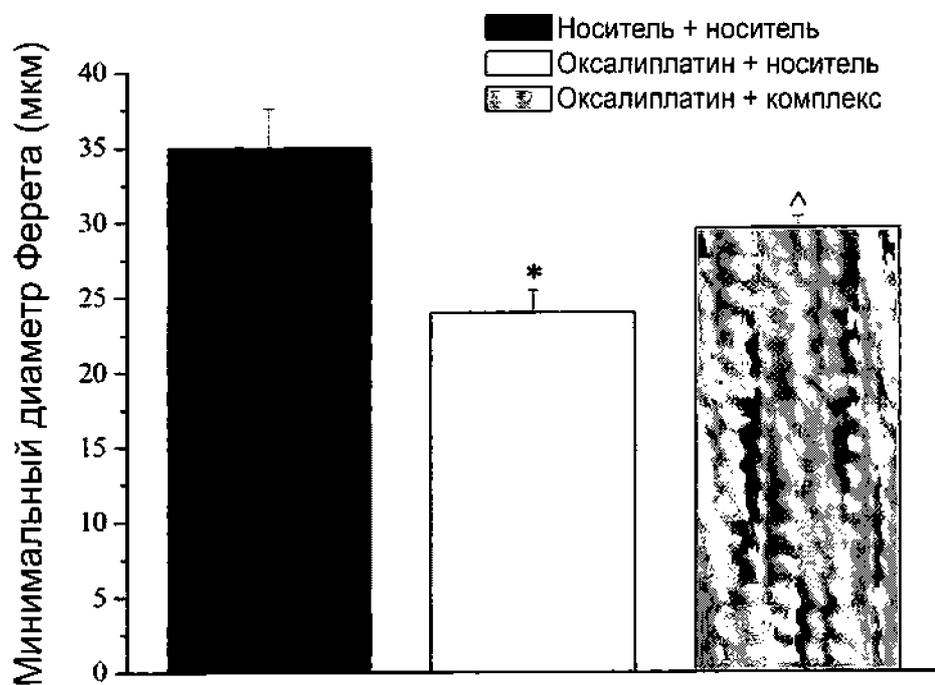
Фиг. 28



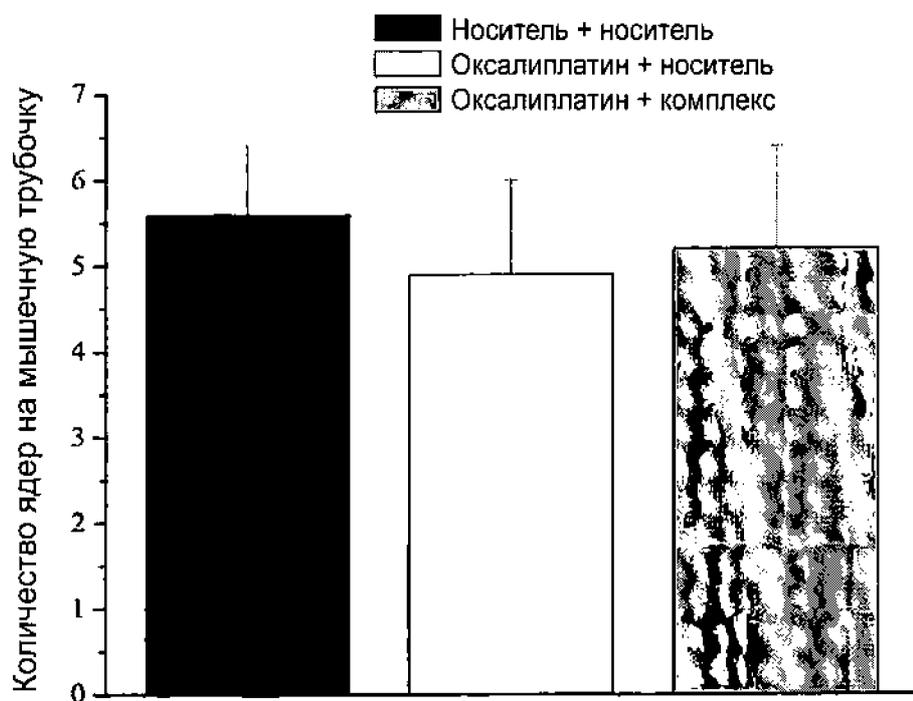
Фиг. 29



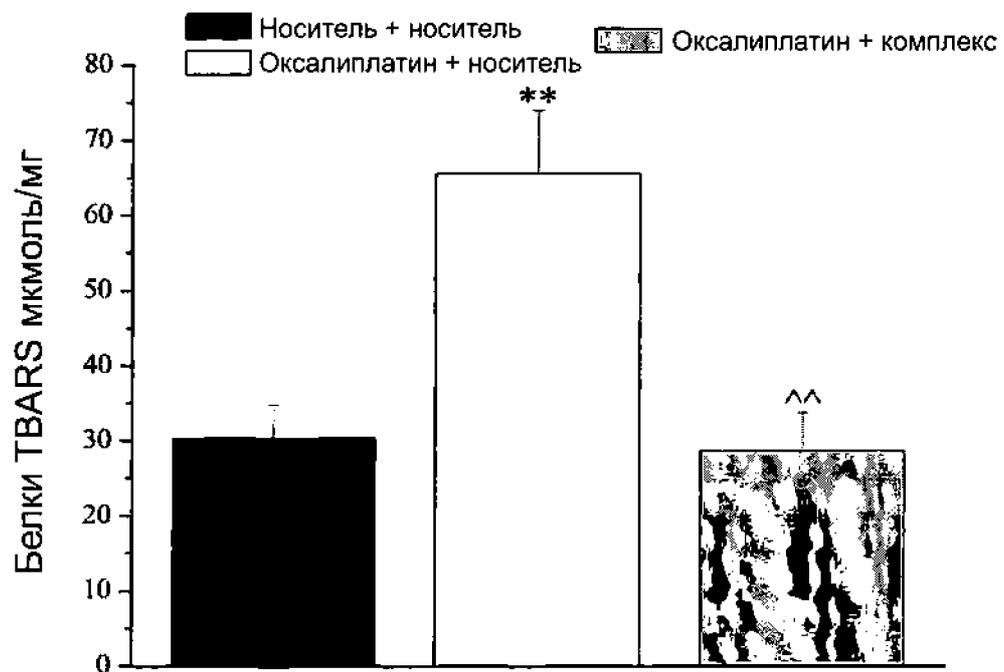
Фиг. 30



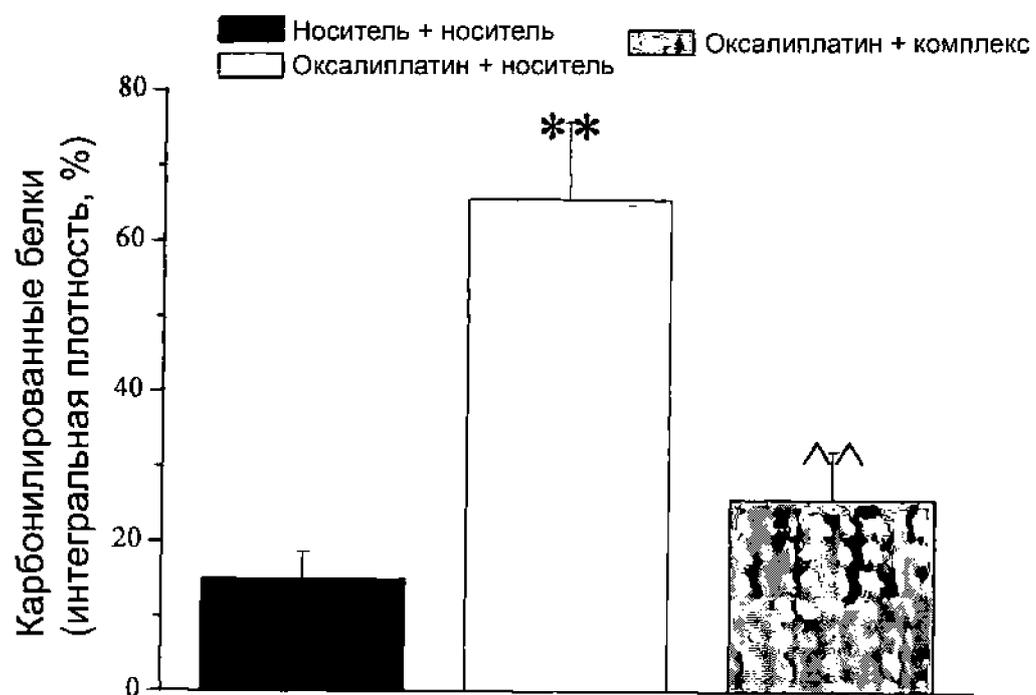
Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33



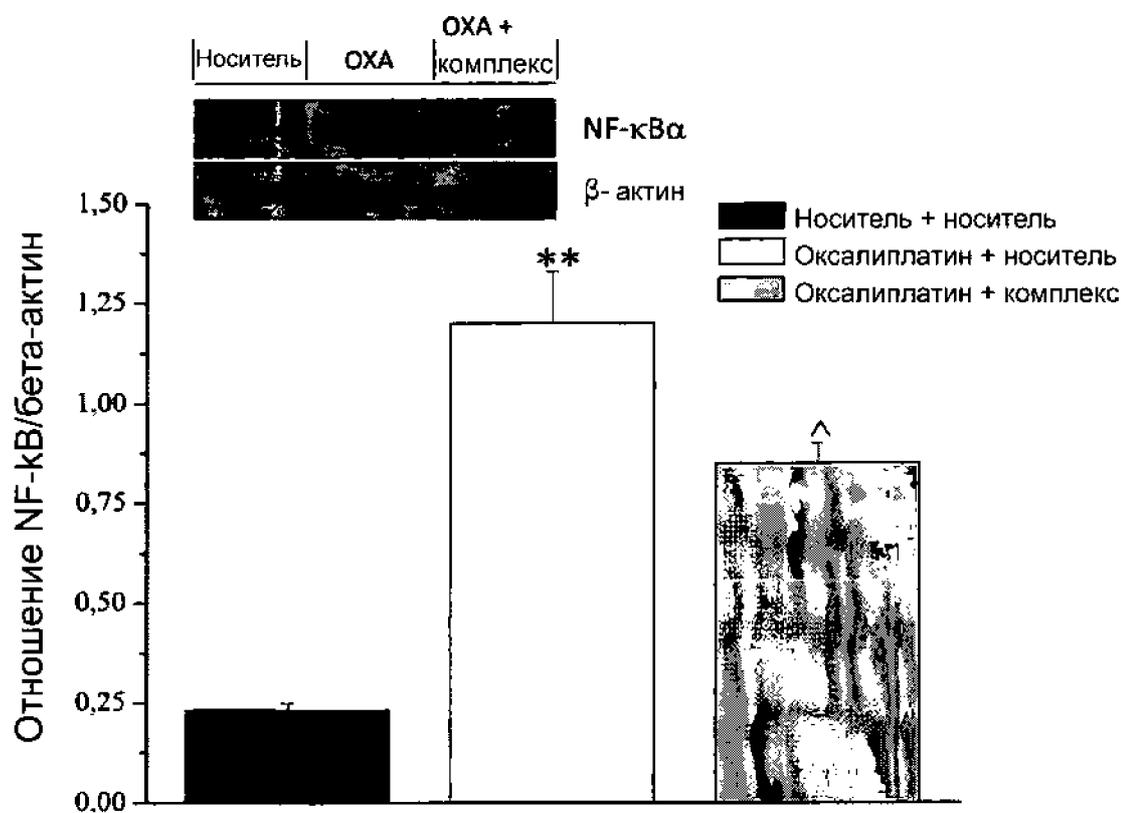
Фиг. 34

Обработка	Активность (д.м.р.н.с.)
	SOD
Носитель + носитель	$62.3 \pm 4.8$
Оксалиплатин + носитель	$42.1 \pm 3.3$
Оксалиплатин + комплекс	$56.9 \pm 2.9^{\wedge}$

Фиг. 35

Обработка	Уровни в плазме			Уровни в мышцах
	Ареалин (нмоль/мл)	Тестостерон (нмоль/мл)	Глутамин (нмоль/мл)	
Посетель + посетитель	0.145 ± 0.021	621 ± 14	742 ± 39	3807 ± 158
Оксалиплатин + посетитель	1.092 ± 0.098	615 ± 23	694 ± 45	3674 ± 98
Оксалиплатин + комплекс	0.583 ± 0.036	742 ± 36 <sup>Δ</sup>	1123 ± 56 <sup>Δ</sup>	4236 ± 106 <sup>Δ</sup>

Фиг. 36



Фиг. 37