



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107083** (13) **C2**
(51) МПК

A61K 31/197 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2012 00602**
(22) Дата подання заявки: **21.06.2010**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.11.2014**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **P-09-116, P-10-94**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **25.06.2009, 21.06.2010**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **LV, LV**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.04.2012, Бюл.№ 8**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.11.2014, Бюл.№ 22**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/LV2010/000008, 21.06.2010**

(72) Винахідник(и):
Калвінс Іварс (LV), Бірманс Анатолійс (LV), Веверіс Маріс (LV), Лебедевс Антонс (LV), Місновс Анатолійс (LV)
(73) Власник(и):
ТЕТРА, СІА,
Aizkraukles iela 21, LV-1006, Riga, Latvia (LV)
(74) Представник:
Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 2007/105793 A1, 10.05.2007
ROSENSON ROBERT S:
"Antiatherothrombotic effects of nicotinic acid."
, ATHEROSCLEROSIS, vol. 171, no. 1, November 2003 (2003-11), pages 87-96
OKUNEVICH I V ET AL: "AAnti-atherosclerotic action of mildronate in experimentU"
PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTALNAYA TERAPIYA, IZDATELSTVO MEDITSINA, RU, no. 2, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 24-27
DOLGIKH V T ET AL: "Impaired blood coagulative properties in the early postresuscitation period and their prevention", ANESTEZIOLOGIYA I REANIMATOLOGIYA, no. 6, November 2004 (2004-11), pages 35-40
STATSENKO M E ET AL: "[The use of mildronate in combined therapy of postinfarction chronic heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus]", KLINICHESKAIA MEDITSINA 2007 LNKD-PUBMED:17882808, vol. 85, no. 7, 2007, pages 39-42

UA 107083 C2

(54) ТЕРАПЕВТИЧНІ КОМБІНАЦІЇ НІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ ТА МЕЛДОНІЮ

(57) Реферат:

Даний винахід належить до синергетичної комбінації нікотинової кислоти та мелдонію для лікування захворювань, які включають агрегацію тромбоцитів, дисліпідемію, гіперліпідемію,

атеросклероз, ішемічну хворобу серця, вибрану із групи: стенокардія та інфаркт міокарда, минуле та постійне порушення мозкового кровообігу, включаючи цереброваскулярний розлад та інсульт та оклюзивне захворювання периферичних артерій.

Даний винахід відноситься до комбінації лікарського продукту та способу попередження та/або лікування метаболічно зв'язаних захворювань, включаючи дисліпідемію, гіперліпідемію, атеросклероз, ішемічну хворобу серця, вибрану з групи: стенокардія та інфаркт міокарда, минуле та постійне порушення мозкового кровообігу, включаючи цереброваскулярний розлад та інсульт, та оклюзивне захворювання периферичних артерій, попередження агрегації тромбоцитів та тромбоз.

Більш конкретний винахід відноситься до комбінації лікарського продукту, що містить нікотинову кислоту (ніацин) та мелдоній, який синергетично підсилює лікувальну дію нікотинової кислоти та до деякої міри поліпшує небажані побічні ефекти нікотинової кислоти, особливо розширення периферичних судин (приплив крові) та підвищення вмісту глюкози в крові. Крім того, винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить такий комбінований лікарський продукт та до його використання у виробництві лікарського препарату для попередження та/або лікування метаболічно зв'язаних захворювань.

Використані скорочення

Для стислості в описі будуть використовуватися наступні скорочення:

ATP – аденозинтрифосфат

C – холестерин

GL – глюкоза

HDL-C - ліпопротеїн-холестерин високої густини

I/R - ішемія/реперфузія

LDL-C - ліпопротеїн-холестерин низької густини

MD - мелдоній (INN)

NA - нікотинова кислота

NAMg – магнієва сіль нікотинової кислоти

PI – пірацетам

RPP - добуток інтенсивності тиску = середній кров'яний тиск x частота серцевих скорочень x 1000-1

SI – симвастатин

TG – тригліцериди

TR - Тритон WR1339 (Tyloxapol)

VF - фібриляція шлуночків

VT - шлуночкова тахікардія

Рівень техніки

Нікотинова кислота є важливим засобом для лікування дисліпідемії та у цей час є єдиним доступним препаратом, який впливає на всі компоненти ліпідного профілю: знижує вміст загального холестерину, TG та LDL-C у крові та має найбільш виражену активність, підвищення HDL-C серед засобів, що змінюють вміст ліпідів (Pieper J.A., Am. J. Manag. Care. 2002; 8 (12 Suppl.): S308-14).

Про використання NA при лікуванні дисліпідемії було відомо вже в 1955 році (Altshul R., Hoffer A., Stephen J.D., Arch. Biochem. Biophys. 1955; 54:558-559) і 1959 (Parsons Jr. W.B., Flinn J.H., AMA Arch. Intern. Med. 1959; 103:783-790).

Оскільки NA ефективно підвищує вміст HDL-C (Mckenney J., Arch. Intern. Med. 2004; 164(7):697-705. Carlson L.A., J. Intern. Med. 2005; 258:94-114), у цей час NA сполучається з іншими засобами, що модифікують ліпіди, які, головним чином, діють на вміст LDL-C, для того щоб підвищити рівень HDL-C (Rosenson R.C., Am. J. Med. 2005; 118(10): 1067-77).

NA є ефективним агентом, що змінюють вміст ліпідів, що попереджає розвиток атеросклерозу та послабляє серцево-судинні явища (Savel'ev A.A., Shershevskii M.G., Клин. Мед. (рос.) 1996; 74:48-52. Drexel H., European Heart Journal Supplements 2006; Vol. 8, Suppl. F: F23-F29. Brown B.G., Zhao X.Q., Am. J. Cardiol. 2008; 101 (8A): 58B-62B) за рахунок підвищення вмісту HDL-C. Нікотинова кислота знижує рівні захворюваності та смертності у пацієнтів з гіперліпідемією (Canner P.L. і ін., J. Am. Coll. Cardiol. 1986;8:1245-55). NA є найбільш ефективним препаратом для підвищення рівня HDL-C при лікуванні випадків гіперліпідемічного захворювання (Ellingworth D.R. і ін., Arch. Intern. Med. 1994; 154: 1586-95. Schechtman G. та ін., Am. J. Cardiol. 1993; 71:758-65). NA зменшує ймовірність тромбозу, знижує в'язкість крові та виявляє кардіозахисну дію, що може обмежити ішемічно реперфузійне ушкодження. (Lamping K.A. і ін., Pharm. Exp. Ther. 1984; 231(3):532-538. Trueblood N.A. і ін., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2000; 279(2), H764-H771. Rosenson R.S. Atherosclerosis 2003; 171(1):87-96).

Оскільки низький вміст HDL-C є чинником ризику інсульту (Wannamethee S.G., Shaper A.G., Ebrahim C., Stroke 2000; 31:1882. Sacco R.L., Benson R.T., Kargman D.E. JAMA 2001; 285:2729-2735. Rizos E., Mikhailidis D.P., Cardiovasc. Res. 2001; 52(2),199-207. Sanossian N., Tarlov N.E.,

Curr. Treatmt. Opt. Cardiov. Med. 2008; 10(3),195-206.), NA у якості засобу підвищення вмісту HDL-C (Carlson L.A., Curr. Opin. Cardiol. 2006; 21(4)336-344) є корисним для попередження інсульту та станів після інсульту (Koniukov S.G., Liberzon S.P., Клин. мед. (Москва) 1975; 53(9): 38-41). Було встановлено, що вміст HDL-C знижується під час гострого ішемічного інсульту (Russman A.N. і ін., J. Neurol. Sci. 2009; 279(1-2): 53-56). Було показано, що NA поліпшує функціональне відновлення після інсульту (Chen J. та ін., Ann. Neurol. 2007; 62(1):49-58). Для лікування інсульту та інших ішемічних станів був запропонований власне HDL-C (Kapur N.K. та ін., Vasc. Health Risk Manag. 2008;4(1):39-57. EP 1 425 031).

Доступні три рецептури NA (з безпосереднім виділенням, із продовженим виділенням і тривалої дії). NA, що безпосередньо виділяється, асоційований з несприятливим припливом крові та підвищенням вмісту глюкози в крові. NA тривалої дії асоційований зі зниженим припливом крові, але також з ризиком гепатотоксичних ефектів. Продовжене виділення пов'язане з меншим припливом крові та низьким гепатотоксичним ризиком (Pieper J.A., Am. J. Health. Syst. Pharm. 2003; 60(13 Suppl.2): S9-14. McKenney J., Arch. Intern. Med. 2004; 164(7):697-705. Knopp R.H., Am. J. Cardiol. 2008; 86(Suppl.): 51L-56L). Також описане застосування натрієвих, калієвих та магнієвих солей NA.

Головним недоліком NA є необхідність введення великих доз для того, щоб суттєво змінити вміст ліпідів у крові. Майже 100 % пацієнтів, оброблених NA, відчувають неприємний побічний ефект припливу крові, що в багатьох випадках попереджає лікування за допомогою NA. Було встановлено, що різке виділення простагландину D2 є безпосередньою причиною NA-індукованого припливу крові (Morrow J.D. і ін., J. Invest. Dermatol. 1992; 98:812-5). Оскільки викликаний NA приплив крові є результатом активності простагландину, ацетилсаліцилова кислота, як широко відомий інгібітор синтезу простагландину, була запропонована та застосовувалася для контролю припливу крові. Крім ацетилсаліцилової кислоти, також активні інші нестероїдні протизапальні препарати (NSAIDS) (Oberwittler H., Vaccara-Dinet M., Int. J. Clin. Pract. 2006; 60(6):707-715). Однак цим NSAIDS властиві власні побічні ефекти, причому вони можуть викликати шлунково-кишкові подразнення та виразку.

Нещодавно був запропонований специфічний антагоніст для простагландину D2 (Parhofer K.G., Vascular Health and Risk Management 2009; 5:901-908) рецепторний підтип 1, ларопіпрант, як засіб для зниження припливу крові, викликаного NA (Lai E. і ін., Clin. Pharm. Ther. 2007; 81:849-857. Davidson M.H., Am. J. Cardiol. 2008; 101 [suppl.]: 14B-19B). Хоча додавання ларопіпранту буде знижувати частоту припливу крові, LA не може повністю виключити зазначений побічний ефект. Ларопіпрант не змінює дію ніацину на ліпіди або інші побічні ефекти нікотинової кислоти. Отже, комбінація нікотинової кислоти з ларопіпрантом може забезпечити використання більш високих доз нікотинової кислоти, і тому розкривається повний потенціал лікарського препарату (Parhofer K.G., Vascular Health and Risk Management 2009; 5:901-908, Olsson A.G., Expert Opinion on Pharmacotherapy 2010;11(10):1715-1726).

У пацієнтів з діабетом типу 2 часто спостерігаються дисліпідемічні зміни, що характеризуються збільшенням вмісту TG, а також зниженням вмісту HDL-C. При розгляді фармакологічної дії NA на метаболізм ліпідів, NA повинен протидіяти дисліпідемічним змінам у пацієнтів з діабетом 2 типу. Однак у деяких публікаціях зазначено, що NA збільшує резистентність до інсуліну (Garg A., Grundy S.M., JAMA 1990; 264: 723-6. Kahn S.E. і ін., Diabetes 1989; 38: 562-8) і підвищує вміст глюкози (Elam, M.B. і ін., JAMA 2000; 284(10): 1263-1270). Тому для пацієнтів з діабетом рекомендуються тільки обмежені дози NA (<2 г/день) (Shepherd J., Betteridge J., Van Gaal L., Curr. Med. Res. Op. 2005; 21(5):665-682). Очевидно, що для покращення глікемічного контролю пацієнтів з діабетом, що використовують NA, необхідні нові препарати. У клініці була зареєстрована гіпоглікемічна здатність мелдонію (Statsenko M.E. та ін., Клин. Мед. (рос.) 2007; 85(7):39-42), отже, можна було очікувати, що зазначений препарат можна комбінувати з NA для одержання додаткових клінічних переваг.

Тромбоцити відіграють найголовнішу роль у розвитку атеросклерозу та неминучого утворення тромбу в ході ішемічної хвороби серця. Антитромбоцитарні засоби стають першорядними для попередження та терапії різних захворювань, у тому числі серцево-судинних, цереброваскулярних та периферичних артеріальних систем (Meadows T.A. та ін., Circ. Res. 2007; 100(9):1261-75). NA є ефективним агентом, що змінюють вміст ліпідів, що попереджає появу атеросклерозу та послабляє серцево-судинні явища. NA виявляє різноманітну дію на ліпопротеїн та дає ефект проти тромбозу артерій, що поліпшує ендотеліальну функцію, послабляє запалення, збільшує стабільність тромбоцитів, та зменшує тромбоз (Rosenson R.C., Atherosclerosis, 2003; 171: 87-96).

Нікотинова кислота інгібує агрегацію тромбоцитів (Lakin K.M., Фармакол. Токсикология, 1980; 43(5): 581-5). Поза організмом NA впливає на активність тромбоцитів, помірковано

інгібуючи агрегування, та стимулюючи значне виділення простагландину, головним чином, з інтактною експресією головного рецептору тромбоцитів. Вплив NA є унікальним, відрізняючись від відомого ефекту антитромбоцитарних засобів, і дозволяє припустити можливість терапевтичних комбінацій (Serebruany V.L. і ін., *Thrombosis and Haemostatic*, 2010 (у друку)).

Нікотинова кислота майже повністю попереджає внутрішньосудинне згортання крові, індуковане тромбопластином та пітуїтрином, що демонструє тромболітичний ефект ніацину (Baluda V.P., *Кардіологія* 1974; 14(11):105-7 (рос.). Антитромболітичні властивості NA описано декількома авторами (Shestakov V.A., *Пробл. Гематол. Перелив. Крови*, 1977; 22(8):29-35. Chekalina S.I., *Sov. Med.* 1982(5): 105-8). Нікотинова кислота знижує ризик згортання крові (Chesney C.M. та ін., *Am. Heart J.*, 2000;140:631-36).

Мелдоній являє собою лікарський препарат з певним корисним впливом на серце та судини. Деяка бажана активність MD була виявлена на тваринних моделях атеросклерозу (Veveris M., Smilsaraja B., *Baltic J. Lab. Anim. Sci.* 2000; 10,194-199. Veveris M. і ін., *Baltic J. Lab. Anim. Sci.* 2002; 12:116-122. Okunevich I.V., Ryzhenkov V.E., *Патол. Физиол. Эксп. Тер.* 2002; (2):24-7), та спостерігалася в клініках (Karpov R.S. і ін., *Тер. Арх.* 1991; 63(4):90-3), тому очікувалося, що цей препарат може сполучатися з NA для одержання додаткових клінічних переваг.

Крім того, було відзначено, що MD інгібує агрегацію тромбоцитів (Tsirkin V.I., *Рос. Кардиол. ж.* 2002; 1:45-52). При двотижневому терапевтичному застосуванні перорального введення MD кроликам та собакам, після експериментального артеріального тромбозу, спостерігався тромболітичний ефект (Logunova L. і ін., *Эксперим. клин. фармакотер.* 1991; 19:91-98 (рос.). Дані про профілактичний ефект MD для обмеження або попередження тромбозу не відомі.

Попередній рівень техніки

Існуюча тенденція до розробки комбінованих лікарських препаратів для лікування метаболічно зв'язаних захворювань може підвищити ефективність клінічного обслуговування (Black D.M., *Curr. Ther. Rep.* 2003; 5:39-32). Внаслідок фібрів (амфіпатичні карбонові кислоти), кожний із NA та статинів регулює сироваткові ліпіди за різними механізмами, причому комбінована терапія може надати пацієнтам особливо бажані переваги, у порівнянні з монотерапією. Оскільки прогрес у розробці нових препаратів для зниження вмісту LDL-C уповільнився, дослідження були спрямовані на розробку поліпшених препаратів, що підвищують вміст HDL-C. Для лікування метаболічно зв'язаних захворювань спостерігається підвищене використання комбінованої терапії, що включає NA, фібрати, статини та речовини, що підсилюють екскрецію жовчних кислот, завдяки додатковим профілям комбінованих продуктів (Miller M., *Mayo Clin. Proc.* 2003; 78(6):735-42. Backes J.M. і ін., *Vase Health Risk Manag.* 2005; 1(4):317-331. Belsey L. і ін., *Curr. Med. Res. Opin.* 2008; 24(9):2703-9. Rosenson R.C., Pitt B., *Nat. Clin. Praet. Cardiovasc Med.* 2009; 6(2):98-100). Спостерігається підвищене використання комбінованої терапії, що включає NA та інші препарати, наприклад, ацетилсаліцилову кислоту та інші NSAIDS, як тромбоцитні інгібітори (USP 5,981,555). Однак зазначені комбінації не збільшують активність NA, тобто, синергетичний ефект не спостерігається. Отже, будь-які препарати, які могли б підсилити лікувальну дію NA у метаболічно зв'язаних захворюваннях, без посилення небажаних побічних ефектів NA, можуть давати позитивний результат у клініках.

Цілі винаходу

Ціль даного винаходу полягає у розробці комбінованого лікарського продукту для попередження та/або лікування метаболічно зв'язаних захворювань та способу попередження та/або лікування метаболічно зв'язаних захворювань для пацієнта, який цього потребує, з використанням NA у комбінації з MD, що дає додатковий позитивний результат полегшення небажаних побічних дій NA. Очікується, що комбінований лікарський продукт даного винаходу буде давати синергетичний ефект у способі лікування та/або попередження метаболічно зв'язаних захворювань, які включають дисліпідемію, гіперліпідемію, атеросклероз, ішемічну хворобу серця, вибрану із групи стенокардії та інфаркту міокарда, минуле та постійне порушення мозкового кровообігу, що включає цереброваскулярний розлад та інсульт, та оклюзивне захворювання периферичних артерій, попереджаючи агрегацію тромбоцитів та тромбоз.

Згідно із даним винаходом, комбінований лікарський продукт визначається, як такий, що має синергетичну дію, якщо терапевтичний ефект вище ефекту NA або MD, взятих окремо. Зрозуміло, що використовуваний у винаході комбінований фармацевтичний продукт означає одночасне, послідовне або роздільне призначення препаратів комбінації. Додаткова мета винаходу полягає в одержанні фармацевтичної композиції, яка містить NA, а також MD для зазначеної вище мети. Додаткові цілі винаходу стануть очевидними надалі, а інші цілі будуть очевидними для фахівця в цій галузі техніки.

Опис винаходу

Винахід містить у собі комбінацію NA та MD, у результаті якої виходить ефективна синергетична комбінація для лікування метаболічно зв'язаних захворювань, переважно у формі однократного дозування. Альтернативно, зазначені два компоненти можуть бути введені окремо, одночасно або послідовно у будь-якому порядку. Точна форма, у якій вводяться зазначені активні компоненти, не має значення за умови, що виходить бажаний ефект винаходу. Активні компоненти можуть бути використані у формі капсул, суспензій, дисперсій, еліксирів, сиропів, або тому подібного, незалежно від призначення: окремого або в єдиній композиції.

У цей час автори винаходу неочікувано виявили, що NA та MD мають синергетичну дію на метаболічно зв'язані захворювання та інші позитивні ефекти. Неочікувано було встановлено, що MD є першим препаратом, який підсилює позитивні ефекти NA, а саме, знижує вміст TG та LDL-C та збільшує вміст HDL-C, підвищує антиагрегуючу дію NA і виключає небажані побічні ефекти NA, особливо приплив крові та підвищення вмісту глюкози в крові.

Отже, можна чекати, що зазначена комбінація буде кращим препаратом для лікування дисліпідемії у пацієнтів, що хворіють на діабет. Крім того, автори неочікувано виявили, що комбінація даного винаходу виключає наслідки експериментального інфаркту та інсульту.

Тепер автори винаходу неочікувано виявили, що NA та MD мають синергетичну дію на агрегацію тромбоцитів. Неочікувано було встановлено, що MD є першим препаратом, який підсилює антитромбоцитну дію NA.

Комбінація згідно з винаходом може бути у формі, що підходить для перорального використання (наприклад, у вигляді таблеток, капсул, водних суспензій або диспергованих порошків або гранул), для парентерального призначення (наприклад, у вигляді стерильного водного розчину для внутрішньовенного, підшкірного або внутрішньом'язового дозування) або як супозиторії для ректального дозування. Переважно композиція винаходу знаходиться у формі, що підходить для перорального використання, наприклад, у вигляді таблеток або капсул.

Крім того, комбінований продукт згідно із даним винаходом включає комбінацію окремих фармацевтичних композицій для активних препаратів, що містять першу композицію NA або її фармацевтично прийнятну сіль та фармацевтично прийнятний наповнювач або носій, та другу композицію, що містить MD або його фармацевтично прийнятну сіль та фармацевтично прийнятний наповнювач або носій. Зазначена комбінація фармацевтичних композицій дозволяє одержати комбінований лікарський продукт згідно з винаходом для одночасного або послідовного використання. Перевагою зазначеної комбінації є можливість для лікаря регулювати співвідношення активних препаратів для окремих пацієнтів. Можна чекати, що комбінований лікарський продукт даного винаходу також містить у собі рецептури уповільненого виділення та продовженого виділення NA, а також фармацевтично прийнятні солі NA (натрію, калію або магнію) і MD, та його солі.

Крім того, комбінований лікарський продукт даного винаходу може містити в собі інші лікарські продукти, що мають відому активність в метаболічно зв'язаних захворюваннях, а саме, статини, зокрема симвастатин.

Комбінований лікарський продукт даного винаходу також може містити в собі інші лікарські продукти, що мають відому активність в метаболічно зв'язаних захворюваннях, а саме, інгібітори агрегації тромбоцитів, зокрема клопідогрел або дипіридабол.

Фармацевтична композиція винаходу може бути отримана за допомогою традиційних методик, з використанням традиційних фармацевтично прийнятних наповнювачів або носіїв та прийомів.

Наступні приклади передбачені для ілюстрації, але не для обмеження винаходу.

Приклади

Випробування: Фармакологічну активність випробуваних речовин досліджували стандартними методами, застосовуваними в рівні техніки. Тварин утримували в групах по 6 особин у відповідних клітках, у камерах штучного клімату, при 22 ± 1 °C, відносній вологості 60 ± 5 % та 12/12 годинних циклах чергування світла та темноти, при вільному доступі до їжі та води. Усі експерименти проводилися відповідно до Директиви Ради ЄЕС від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЄЕС), що стосується утримання експериментальних тварин. Були прийняті всі заходи, щоб звести до мінімуму страждання тварин і знизити кількість використаних тварин.

Речовини: Холестерин (фірма Acros Organics), мелдоній (Orindex), корм для тварин (R 70 Lactamin), масло (наявне у продажу), холат Na (Acros Organics), NA (Acros Organics), Ларопірант (МК 0524, Cayman Chemicals). Усі інші хімікалії одержували із промислових джерел.

Приклад 1. Визначення активності проти атеросклерозу

Методика. Була використана модель атеросклерозу на мишах C57BL/6J, генетично

сприйнятливих до атеросклерозу, яка описана в літературі (Smith J.D., Breslow J.L., J. Intern. Med. 1997; 242:99-109). Контрольна група тварин одержувала стандартний корм для лабораторних тварин. Експериментальний атеросклероз був індукований шляхом додавання до стандартного харчування 1,15 % холестерину, 15 % вершкового масла та 0,5 % холату Na (Nishina P. і ін., J. Lipid Res. 1993; 34:1413-1422). Експериментальні групи одержували випробовувані речовини окремо та у комбінації в дозах, які є активними, як встановлено з пілотних експериментів. На 22-ий тиждень рівень атеросклеротичних змін оцінюють морфологічно, біохімічно та гістологічно з використанням стандартних методів та критеріїв (Paigen B. та ін., Atherosclerosis. 1987; 68:231-240). Вміст загального холестерину, HDL-C, LDL-C і TG у сироватці визначали за допомогою стандартних комплектів для випробувань. Співвідношення LDL-C/HDL-C приймали як стандартний критерій для оцінки ризику серцево-судинного захворювання (Fernandez M.L., Webb D., J. Am. Coll. Nutr., 2008; 27(1):1-5).

Показник атеросклерозу (відображує коронарний атеросклероз та є детектором периферичного атеросклерозу) розраховували в такий спосіб:

Показник = LDL-C/HDL-C.

Коефіцієнт атеросклерозу (відображує коронарний атеросклероз) розраховували в такий спосіб:

Коефіцієнт = Загальний холестерин/HDL-C.

Статистика. Дані представляли як "середнє значення \pm стандартна помилка вимірювання" (СПВ) з 7-10 вимірювань для окремих тварин. Відмінності між експериментальними групами зіставляли з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з повторним зіставленням (тест Tukey). Імовірність $P < 0,05$ вважалася значимою.

Результати. Перша серія експериментів була спланована з метою визначення дії різних співвідношень та доз препаратів у комбінації. Як показано в таблиці 1, через 22 тижні у контрольних тварин групи С, що одержували харчування, збагачене ліпідами та холестерином, розвиваються атеросклеротичні зміни в аорті, особливо в дузі аорти. При роздільному застосуванні для NA та MD спостерігається тенденція до зменшення області ураження. Неочікувано виявлено, що комбінація NA та MD дає значно більш високу та статистично значиму захисну дію проти атеросклеротичного ушкодження, ніж кожна речовина окремо, тобто, спостерігається синергетичний ефект.

Таблиця 1

Вплив NA та MD на атеросклеротичне ушкодження аорти; $n=7-10$; Середнє значення \pm СПВ

Група	Площа ушкодження в дузі аорти, мкм^2	Площа ушкодження аорти, %
Контрольна	$44 \pm 25,8^{**}$	$0,02 \pm 0,01^{**}$
С контрольна	6076 ± 1282	$5,44 \pm 1,12$
NA 50 мг/кг	5867 ± 975	$5,21 \pm 1,07$
NA200 мг/кг	4153 ± 742	$3,39 \pm 0,69$
MD 50 мг/кг	4741 ± 786	$3,87 \pm 0,64$
MD 150 мг/кг	3801 ± 573	$3,30 \pm 0,49$
MD 200 мг/кг	3098 ± 547	$2,74 \pm 0,47^*$
NA50+MD50	3106 ± 368	$2,58 \pm 0,31^{**\$}$
NA50+MD150	$2231 \pm 390^{*\$}$	$1,93 \pm 0,40^{*\$}$
NA200+MD200	$1602 \pm 404^{*\$}$	$1,19 \pm 0,38^{*\$}$

NA50+MD50=NA 50 мг/кг+ MD 50 мг/кг. NA50+MD 150=NA 50 мг/кг+ MD 150 мг/кг

NA200+MD200=NA 200 мг/кг+ MD 200 мг/кг

* $P < 0,05$ відносно С контролю

** $P < 0,005$ відносно С контролю

$^{\$}P < 0,05$ відносно NA у такій же дозі

$^{\&}P < 0,05$ відносно MD у такій же дозі

Як показано нижче в таблиці 2, комбінація NA та MD дає статистично значимий ефект зниження вмісту LDL-C та TG і підвищення вмісту HDL-C. Для комбінованої дози NA50+MD150, де NA вводився в такий дозі, яка не виявляє значної дії на вміст ліпідів, сумарний ефект неочікувано виявився вище ефекту від кожної речовини окремо. Це особливо помітно по атеросклеротичному показнику та відношенню загальний холестерин/HDL-C, де спостерігався синергізм дії NA та MD.

Таблиця 2

Вплив випробовуваних речовин на ліпіди в сироватці; n=7 - 10, середнє значення \pm СПВ

Група	Загальний С, мг/дл	HDL-C, мг/дл	LDL-C, мг/дл	Показник, LDL-C/HDL-C	Співвідношення загальний С/HDL-C	TG, мг/дл
Контрольна	66,5 \pm 4,5"	57 \pm 3,4	9,7 \pm 2,1"	0,17 \pm 0,04"	1,17 \pm 0,04"	22,1 \pm 2,19"
С контрольна	161 \pm 10,4	50 \pm 5,0	110 \pm 9,9	2,12 \pm 0,2S	3,13 \pm 0,2S	48,8 \pm 4,93
NA50 мг/кг	156 \pm 9,4	56 \pm 5,2	100 \pm 6,9	1,78 \pm 0,19	2,77 \pm 0,18	37,8 \pm 4,56
NA200	153 \pm 11,1	59 \pm 4,7	93 \pm 8,3	1,63 \pm 0,15*	2,60 \pm 0,2*	31,7 \pm 4,21"
MD50 мг/кг	157 \pm 9,5	54 \pm 5,0	102 \pm 7,5	1,97 \pm 0,20	2,94 \pm 0,2	44,3 \pm 4,84
MD 150 мг/кг	153 \pm 11,8	59 \pm 5,0	94 \pm 9,1	1,65 \pm 0,18*	2,63 \pm 0,18*	42,9 \pm 4,62
MD200 мг/кг	151 \pm 11,1	56 \pm 3,9	95 \pm 10,0	1,72 \pm 0,20	2,70 \pm 0,2	42,1 \pm 3,35
NA50+MD50	156 \pm 10,2	58 \pm 5,5	97 \pm 7,9	1,71 \pm 0,23	2,72 \pm 0,23	40,1 \pm 3,75
NA50+MD150	148 \pm 8,9	65 \pm 5,7	83 \pm 4,4 ^{\$}	1,31 \pm 0,09 ^{\$&}	2,30 \pm 0,08 ^{\$&}	36,1 \pm 2,23
NA200+MD200	152 \pm 7,1	67 \pm 5,2*	85 \pm 5,1*	1,29 \pm 0,11 ^{\$&}	2,31 \pm 0,12 ^{\$&}	33,6 \pm 2,45 ^{\$&}

NA50+MD50=NA 50 мг/кг+ MD 50 мг/кг. NA50+MD150=NA 50 мг/кг+ MD 150 мг/кг

NA200+MD200=NA 200 мг/кг+ MD 200 мг/кг

*P<0,05 відносно С контролю

**P<0,005 відносно С контролю

"P<0,0005 відносно С контролю

\$P<0,05 відносно NA у такій же дозі

&P<0,05 відносно MD у такій же дозі

В іншій серії експериментів активність проти атеросклерозу комбінації даного винаходу оцінювали більш докладно, і крім того, у комбінацію також додавали відомий анти-ліпідемічний препарат, SI. При окремому використанні NA та MD, проявлялася тенденція до зменшення площі ушкодження (таблиця 3). Неочікувано виявлено, що комбінація NA+MD дає значно більш високу та статистично значиму захисну дію проти атеросклеротичного ушкодження, ніж кожна речовина окремо. Додавання комбінації даного винаходу до SI додатково збільшує активність захисної дії проти атеросклеротичного ушкодження.

Таблиця 3

Вплив випробовуваних речовин на атеросклеротичне ушкодження аорти; n=7-9; середнє значення \pm СПВ

Група	Площа ушкодження в дузі аорти, мкм ²	Площа ушкодження аорти, %
Контрольна	29,4 \pm 14,8**	0,01 \pm 0,01 [#]
С контрольна	6416 \pm 860	5,97 \pm 0,89
NA 50 мг/кг	5001 \pm 726	4,52 \pm 0,64
MD 150 мг/кг	4189 \pm 628	3,58 \pm 0,67*
SI 10 мг/кг	2819 \pm 447**	2,67 \pm 0,36**
NA50+MD150	2413 \pm 442**&\$	2,28 \pm 0,40**\$
NA50+MD50+SI10	2263 \pm 314**\$&	2,19 \pm 0,30**\$&

NA50+MD150=NA 50 мг/кг + MD 150 мг/кг. NA50+MD50+SI10=NA 50 мг/кг + MD 50 мг/кг + SI 10 мг/кг

*P<0,05 відносно С контролю.

**P<0,005 відносно С контролю.

#P<0,0005 відносно С контролю.

\$P<0,05 відносно NA.

&P<0,05 відносно MD

У такій же експериментальній серії визначали загальний холестерин, HDL-C, LDL-C і TG у сироватці. Як показано нижче в таблиці 4, при окремому використанні NA та MD тільки незначно

- поліпшують співвідношення холестеринових фракцій та показник атеросклерозу без статистичної значимості. Неочікувано виявлено, що комбінація NA та MD значно поліпшує співвідношення холестеринових фракцій та статистично значимо знижує показник атеросклерозу та відношення загальний С/HDL-С. Крім того, зазначена комбінація попереджає збільшення LDL-С та TG у сироватці. Таким чином, комбінація згідно з винаходом виявляє значно більш високу захисну дію проти змін у метаболізмі ліпідів, ніж компоненти комбінації, взяті окремо. Виражена захисна дія зберігається також у потрійній комбінації з SI.

Таблиця 4

Вплив випробуваних речовин на ліпіди в сироватці; n=7-9, середнє значення \pm СПВ

Група	Загальний С, мг/дл	HDL-С, мг/дл	LDL-С, мг/дл	Показник, LDL-С/HDL-С	Співвідношення загальний С/HDL-С	TG, мг/дл
Контрольна	66,8 \pm 3,7 [#]	58 \pm 3,4	8,7 \pm 1,94 [#]	0,15 \pm 0,03 [#]	1,15 \pm 0,03 [#]	22,8 \pm 1,82 [#]
С контрольна	167 \pm 8,64	54 \pm 4,7	113 \pm 8,4	2,24 \pm 0,25	3,23 \pm 0,24	52,2 \pm 3,98
NA 50 мг/кг	158 \pm 9,9	57 \pm 5,2	100 \pm 7,6	1,76 \pm 0,21	2,75 \pm 0,19	41,0 \pm 4,62
MD 150 мг/кг	159 \pm 7,8	62 \pm 4,1	95 \pm 8,2	1,58 \pm 0,21	2,60 \pm 0,21	44,2 \pm 4,05
SI 10 мг/кг	132 \pm 9,9*	55 \pm 5,0	77 \pm 6,7*	1,4 \pm 0,08*	2,4 \pm 0,08*	47,7 \pm 3,73
NA50+MD150	139 \pm 7,5*	60 \pm 6,1	79 \pm 6,2*	1,32 \pm 0,20 ^{\$}	2,30 \pm 0,20*	39,5 \pm 3,96*
NA50+MD50+SI10	141 \pm 7,3*	61 \pm 5,5	80 \pm 5,7*	1,31 \pm 0,16 ^{\$}	2,30 \pm 0,16 ^{\$}	42,2 \pm 3,65

NA50+MD150=NA 50 мг/кг+MD 150 мг/кг.

NA50+MD50+SI10=NA 50 мг/кг+MD 50 мг/кг + SI 10 мг/кг).

*P<0,05 відносно С контролю.

[#]P<0,0005 відносно С контролю.

^{\$}P<0,05 відносно NA

- У ще одній серії експериментів, у порівняльну оцінку були включені комбінації NAMg та NA+SI (Таблиця 5).

Комбінація NAMg була зіставлена з NA на півниках (Burststein J., Telkka A., Acta Pathol. Microbial Scand. 1962; 56:261-265). Комбінація NA (50 мг/кг) та MD (150 мг/кг) показала найбільш виражену позитивну дію відносно аорти, краще ніж NA та NAMg, а також перевершує ефект від комбінації SI та NA, використаної в дозі, основаної на клінічному досвіді (Pandian A. і ін., Vasc. Health Risk Manag. 2008; 4(5):1001-1009).

Таблиця 5

Вплив випробуваних речовин на атеросклеротичне ушкодження аорти; n=7-9; середнє значення \pm СПВ

Група	Площа ушкодження в дузі аорти, мкм ²	Площа ушкодження аорти, %
Контрольна	35 \pm 19,8***	0,02 \pm 0,01***
С контрольна	6216 \pm 839	5,75 \pm 0,82
NA 50 мг/кг	4978 \pm 688	4,23 \pm 0,67
NAMg 60 мг/кг	4053 \pm 518*	3,39 \pm 0,44*
MD 150 мг/кг	3904 \pm 489*	3,47 \pm 0,45*
NA50+MD150	2105 \pm 215 ^{**\$@#&}	1,95 \pm 0,30 ^{**\$@#&}
NA50+SI2	3068 \pm 297*	2,67 \pm 0,48*

NA50+MD150=NA 50 мг/кг + MD 150 мг/кг. NA50+SI2=NA 50 мг/кг + SI 2 мг/кг

*P<0,05 відносно С контролю. **P<0,005 відносно С контролю.

***P<0,0005 відносно С контролю. ^{\$}P<0,05 відносно NA.

[@]P<0,05 відносно NAMg. [&]P<0,05 відносно MD. [#]P<0,05 відносно NA50+SI2

- Подібно морфометричним даним, біохімічні випробування підтвердили, що комбінація NA+MD значно краще, ніж NA або NAMg нормалізує вміст ліпідів (таблиця 6).

Таблиця 6

Вплив випробуваних речовин на ліпіди в сироватці; n=7-9, середнє значення \pm СПВ

Група	Загальний С, мг/дл	HDL-C, мг/дл	LDL-C, мг/дл	Показник, LDL-C/HDL-C	Співвідношення загальний С/HDL-C	TG, мг/дл
Контрольна	67 \pm 3,9***	56 \pm 3,0	7,8 \pm 1,83***	0,14 \pm 0,03***	1,19 \pm 0,04***	26,5 \pm 2,13**
С контрольна	164 \pm 9,2	50 \pm 3,8	107 \pm 7,4	2,21 \pm 0,18	3,33 \pm 0,19	54,8 \pm 5,56
NA 50 мг/кг	158 \pm 8,7	57 \pm 4,7	96 \pm 6,2	1,74 \pm 0,15	2,82 \pm 0,16	40,8 \pm 3,46
NAMg 60 мг/кг	151 \pm 9,6	55 \pm 4,0	91 \pm 7,7	1,67 \pm 0,12	2,73 \pm 0,14	41,4 \pm 1,06
MD 150 мг/кг	154 \pm 8,1	55 \pm 3,3	95 \pm 5,5	1,75 \pm 0,14	2,74 \pm 0,11	43,2 \pm 1,25
NA50+MD150	148 \pm 7,4	63 \pm 3,9	81 \pm 4,1	1,31 \pm 0,11**@&	2,35 \pm 0,10**@&	37,5 \pm 0,97*@&
NA50+SI2	144 \pm 4,7	58 \pm 4,4	82 \pm 4,8	1,49 \pm 0,12**	2,52 \pm 0,12**	42,4 \pm 1,74

NA50+MD150=NA 50 мг/кг + MD 150 мг/кг. NA50+SI2=NA 50 мг/кг + SI 2 мг/кг

*P<0,05 відносно С контролю. **P<0,005 відносно С контролю.

***P<0,0005 відносно С контролю. @P<0,05 відносно NA.

@P<0,05 відносно NAMg. &P<0,05 відносно MD

Комбінація NA+MD подібна комбінації NA+SI при зниженні вмісту загального холестерину та LDL-C, але суттєво перевершує її по позитивному впливу на вміст HDL-C та TG, а також виявляє більш виражений вплив на атеросклеротичний показник та співвідношення загальний холестерин/HDL-C.

Зазначена серія випробувань підтверджує, що комбінація NA та MD дає значно більш поліпшений позитивний результат відносно експериментального атеросклерозу, ніж NA або NAMg та краще, ніж застосовувана клінічно комбінація NA та SI.

Приклад 2. Вплив NA та MD, взятих окремо та у комбінації, на ліпіди в щурячій моделі гіперліпідемії

Методика. Експериментальну хронічну гіперліпідемію/гіперхолестеринемію індукували за допомогою TR, використовуючи метод, описаний Levine і Saltzman (Levine S., Saltzman A., J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 2007; 55: 224-226). Тварини одержували розчин 250 мг/кг TR через хвостову вену три рази на тиждень, протягом 3 тижнів. Розчини випробуваних речовин для експериментальних груп або воду для Контрольної групи вводили п/о, один раз на день, за годину до ін'єкції розчину TR або узяття проби крові. Самці щурів Wistar вагою 220-240 г були розподілені на наступні 8 груп:

Група	Число тварин, n
1. Контрольна	10
2. TR (TR 250 мг/кг)	14
3. NA (TR 250 мг/кг+ NA 50 мг/кг/д)	14
4. MD (TR 250 мг/кг+ MD 150 мг/кг/д)	14
5. NA+MD (Triton 250 мг/кг+ NA 50+MD 150 мг/кг/д)	14
6. SI10 (TR 250 мг/кг+ SI 10 мг/кг/д)	12
7. NA+SI2 (TR 250 мг/кг+ SI 2+NA 50 мг/кг/д)	12
8. NA+SI2+MD (TR 250 мг/кг+ SI 2+NA 50+MD 150 мг/кг/д)	12

Біохімічний аналіз крові проводили через 1, 2 та 3 тижня (наступного дня після ін'єкції TR) шляхом пункції серця під ефірним наркозом. Сироватку відокремлювали шляхом центрифугування та аналізували на вміст загального холестерину, HDL-C, LDL-C і TG за допомогою наборів, наявних у продажу.

Статистика. Отримані дані математично обробляли з використанням програми Microsoft Excel, та результати виражали як "середнє значення \pm СПВ". Середні результати для різних груп зіставляли з використанням однофакторного аналізу ANOVA та критерію Ст'юдента. Відмінність результатів вважалася значимою при P<0,05.

Результати. Повторні ін'єкції TR приводили до розвитку вираженої та стабільної гіперхолестеринемії та гіперліпідемії, що характеризується значним збільшенням загального вмісту холестерину, LDL та TG у порівнянні з контрольною групою. Терапевтична обробка NA, більш значно в перший тиждень, обмежувала збільшення загального холестерину, LDL-C та TG,

але значно підвищувала вміст HDL-C тільки через 2 та 3 тижні. Мелдоній (MD) був ненабагато менш активним для зниження вмісту загального холестерину, LDL-C та підвищення рівня HDL-C, однак він не попереджав підвищення вмісту TG. Неочікувано виявлено, що комбіноване використання NA+MD більш ефективно, ніж окремі компоненти, знижувало вміст LDL-C та TG і, крім того, збільшувало вміст HDL-C. Більше того, при тривалому використанні NA+MD (2 або 3 тижня в зазначеному експерименті) було продемонстровано набагато більш виражене зниження вмісту LDL-C та TG та збільшення рівня HDL-C, ніж при використанні NA+SI (дивіться нижче). Таким чином, можна чекати, що комбінація NA+MD буде застосовуватися в клініці для попередження та/або лікування гіперхолестеринемії та гіперліпідемії.

Застосування SI у дозі 10 мг/кг значно знижує збільшення загального холестерину та LDL-C, індукованого TR, але тільки незначно впливає на вміст HDL-C та TG.

Комбіноване використання SI та NA у клінічно прийнятному співвідношенні продемонструвало значний захист від збільшення загального холестерину, LDL-C і TG у сироватці та підвищення вмісту HDL-C. Неочікувано виявлено, що комбіноване використання NA, SI та MD продемонструвало ще кращий захист проти змін, індукованих TR, тобто, краще ніж ефект від кожного окремого компоненту, та значно краще, ніж NA+SI для зниження вмісту TG та LDL-C. Особливо важливим спостереженням для клінічної практики є те, що комбінація NA, SI та MD збільшує вміст HDL-C значно краще, ніж SI або NA окремо. Таким чином, можна чекати, що комбінації NA+MD та NA+SI+MD будуть застосовуватися в клініці для попередження та/або лікування гіперхолестеринемії та гіперліпідемії.

Таблиця 7

Вплив NA, SI і MD, взятих окремо
та у комбінації, на ліпіди в щурячій моделі гіперліпідемії; n=9-14; середнє значення \pm СРВ

Група	Загальний холестерин через 1, 2 та 3 тижня, мг/дл		
	C1	C2	C3
Контрольна	77,6 \pm 4,9 ^{***}	75,1 \pm 5,1 ^{***}	72,7 \pm 2,5 ^{***}
TR	487,6 \pm 25,4	501 \pm 16,7	513 \pm 41,1
NA	345 \pm 15,7 ^{***}	401,1 \pm 25,1 ^{**}	405,5 \pm 25,9 [*]
MD	412 \pm 24,7	414,7 \pm 23,2 [*]	401 \pm 22,8 [*]
NA+MD	340,5 \pm 19,5 ^{***&}	360 \pm 21,7 ^{***}	346,4 \pm 32,8 ^{**}
SI	314 \pm 29,6 ^{***}	329,5 \pm 36,2 ^{**}	335,7 \pm 31,6 ^{**}
NA+SI	345,9 \pm 27,5 ^{**}	388,7 \pm 32,3 [*]	384,5 \pm 33,9 [*]
NA+SI+MD	333,5 \pm 26,2 ^{***&}	376,4 \pm 23,1 ^{***}	333,4 \pm 19,3 ^{***&\$}

Група	HDL-C через 1, 2 та 3 тижня, мг/дл		
	HDL-C1	HDL-C2	HDL-C3
Контрольна	54,6 \pm 1,9 [*]	54,1 \pm 1,3	53,7 \pm 1,0 [*]
TR	76,3 \pm 6,9	76,2 \pm 11,4	77 \pm 10,2
NA	111,3 \pm 9,1 [*]	144,7 \pm 13,5 ^{**}	127,3 \pm 10,9 ^{**}
MD	107,3 \pm 8,4 [*]	118,6 \pm 10,3 [*]	115,9 \pm 9,6 [*]
NA+MD	126,2 \pm 11,1 ^{**}	150,4 \pm 11,2 ^{***&#}	136,9 \pm 18,1 [*]
SI	84,5 \pm 12,5	98,5 \pm 20,5	94,4 \pm 10,2
NA+SI	99 \pm 12,9	116,2 \pm 11,7 [*]	114,9 \pm 11,9 [*]
NA+SI+MD	124,8 \pm 18,2 [*]	157,3 \pm 15 ^{**&#}	143,2 \pm 9,7 ^{***}

Група	LDL-C через 1, 2 і 3 тижня, мг/дл		
	LDL-C1	LDL-C2	LDL-C3
Контрольна	18,7 \pm 3,8 ^{***}	19,7 \pm 4,4 ^{***}	16,3 \pm 2,0 ^{***}
TR	388,7 \pm 26,7	402,1 \pm 19,2	405,1 \pm 41,7
NA	216,3 \pm 14,0 ^{***}	250,3 \pm 20,6 ^{***}	265,1 \pm 18,4 [*]
MD	290,8 \pm 21 [*]	275 \pm 22,3 ^{***}	270 \pm 16,9 [*]
NA+MD	209,6 \pm 16,7 ^{***&}	197,6 \pm 15,4 ^{***&\$#}	203,3 \pm 20,3 ^{***&\$#}
SI	212 \pm 24,1 ^{***}	228,9 \pm 20,6 ^{***}	232,7 \pm 22,8 ^{**}
NA+SI	227,2 \pm 26,1 ^{***}	272,5 \pm 21,3 ^{**}	268 \pm 23,2 [*]
NA+SI+MD	193,2 \pm 16,5 ^{***&}	216,6 \pm 17 ^{***&\$#}	197,1 \pm 16,6 ^{***&\$#}

Група	TG через 1, 2 і 3 тижня, мг/дл		
	TG1	TG2	TG3
Контрольна	38±2,9 ^{***}	37±3,2 ^{***}	38±4,4 ^{***}
TR	1240±80,1	1297±78,3	1234±114,1
NA	734±81,6 ^{**}	860±73,8 ^{**}	828±44,7 [*]
MD	1040±91	1081±63,2	1010±72,5
NA+MD	785±62,9 ^{***&}	792±73,8 ^{***&}	774±39,2 ^{**&#}
SI	849±96,8 [*]	879±72,1 ^{**}	891±129,1
NA+SI	769±69,2 ^{***}	868±36,1 ^{***}	879±31 [*]
NA+SI+MD	734,4±95,7 ^{***&}	763±36 ^{***&#}	692±45 ^{**&#}

*P<0,05 відносно TR. **P<0,005 відносно TR. ***P<0,0005 відносно TR

\$P<0,05 відносно NA. &P<0,05 відносно MD. #P<0,05 відносно NA+SI

Приклад 3. Визначення кардіозахисних характеристик

Методика. Самців щурів Wistar розподіляли по 6 групах (від 12 до 16 тварин у групі):

- 1) Контрольна група одержувала п/о 0,9 %-ий сольовий розчин;
- 2) група NA50 одержувала п/о 50 мг/кг/день NA;
- 3) група MD50 одержувала п/о 50 мг/кг/д MD;
- 4) група NA50+MD50 одержувала п/о 50 мг/кг/д NA плюс 50 мг/кг MD;
- 5) група MD150 одержувала п/о 150 мг/кг/д MD;
- 6) група NA50+MD150 одержувала п/о 50 мг/кг/д NA плюс 150 мг/кг/д MD.

Тварини випробуваних груп одержували експериментальні речовини у вигляді водних розчинів через канюлю в шлунку за 48, 24 та 1 година до експерименту. Тварини контрольної групи одержували такий же об'єм сольового розчину. Тварин анестезували (пентобарбіталом натрію 60 мг/кг, в/ч) та при механічному газообміні в легенях підготовляли до блокування лівої коронарної артерії. Експериментальний інфаркт був викликаний за рахунок закупорки коронарної артерії протягом 45 хвил., з наступною реперфузією протягом 2 годин. Реєструвалися наступні дані: кількість тварин з вентрикулярною тахікардією (VT), вентрикулярною фібриляцією (VF), летальність, середній артеріальний тиск, добуток інтенсивності тиску (RPP), який характеризує функціональний стан серцевого м'язу, відбиває одержання аденозинтрифосфату (АТФ) у серцевому м'язі та є широко застосовуваним показником при аналізі клінічних і експериментальних даних (Broderick T.L., Drugs R D 2008; 9(2):83-91). Після експерименту визначали ішемічну та некротичну області з використанням методу перфузійного фарбування синім барвником Еванса (трифенілдіазолієвий барвник). Лівий шлуночок розрізали, зважували та розраховували морфологічні критерії: відсоток ішемічної зони лівого шлуночку, відсоток некротичної зони лівого шлуночку, та відношення некротичної зони до ішемічної зони (показник некрозу).

Статистика. Результати представляли як "середнє значення ± СПВ" для кожної групи. Статистичний аналіз всередині груп здійснювали за допомогою критерію Ст'юдента. Дані, отримані при реєстрації кров'яного тиску та частоти серцевих скорочень, розраховували для тварин, що вижили в ішемічно-реперфузійному експерименті. Кількість випадків аритмії (VT і VF) та летальність розраховували для всіх тварин. Відмінності між експериментальними групами зіставляли з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з повторним зіставленням (тест Tukey). Імовірність P<0,05 вважалася значимою.

Результати. Серцева ішемія з наступною реперфузією викликає серйозні порушення серцевого ритму в контрольній групі з 7 летальними кінцями в групі з 16 тварин. Група NA незначно відрізнялася від контрольної групи відносно порушень ритму. У групах MD і NA+MD спостерігалися менш виражені небезпечні для життя порушення ритму (VF і VT) відносно контролю, однак летальність була значно нижче тільки в групах NA50+MD50 та NA50+MD150 (таблиця 8 нижче).

Таблиця 8

- Вплив випробуваних речовин на порушення серцевого ритму та летальність у ході закупорки та реперфузії коронарної артерії

Група	n	Вентрикулярна тахікардія		Вентрикулярна фібриляція		Летальність	
		n	%	n	%	n	%
I/R контроль	16	16	100	13	81,3	7	43,8
NA50	12	12	100	8	66,7	3	25
MD50	12	11	91,7	7	58,3	3	25
MD150	12	10	83	7	58,3	2	17
NA50+MD50	12	10	83	6	50	1*	8,3
NA50+MD150	12	9	75	5	42	0*	0

*P<0,05 відносно I/R контролю

Середній артеріальний тиск та частота серцевих скорочень були подібні у всіх експериментальних групах, однак падіння RPP, відзначене в контрольній групі, було статистично значимо попереджене тільки в групах NA50+MD50 і NA50+MD150 під час реперфузії (Таблиця 9).

Це вказує на істотний захист від інфаркту, викликаного функціональним кровопусканням, уже після короткої (протягом 3 діб) попередньої обробки комбінованим лікарським препаратом винаходу.

Таблиця 9

Вплив випробуваних речовин на добуток інтенсивності тиску (RPP) у ході закупорки коронарної артерії та реперфузії; n=9-12; середнє значення \pm СПВ

Група	Вихідне значення	Закупорка 45 хвил.	Реперфузія 120 хвил.
I/R контроль	44,2 \pm 3,0	39,7 \pm 2,3 [*]	34,2 \pm 2,1 [#]
NA	43,1 \pm 2,8	40,4 \pm 2,7	36,0 \pm 1,3 [*]
MD50	44,8 \pm 1,7	41,5 \pm 2,9	37,6 \pm 1,9 [*]
MD150	44,3 \pm 1,8	40,3 \pm 2,5	37,9 \pm 1,8
NA50+MD50	42,7 \pm 3,1	40,5 \pm 1,9	38,6 \pm 1,8*
NA50+MD150	43,9 \pm 2,7	41,2 \pm 1,8	40,1 \pm 1,6**

*P<0,05 відносно I/R контролю.

**P<0,005 відносно I/R контролю

^{*}P<0,05 відносно вихідного значення.

[#]P<0,01 відносно вихідного значення

Зазначене також підтверджується статистичною значимістю зменшення відсотку некротичної зони в лівому шлуночку та в ішемічній зоні (таблиця 10) для комбінованих лікарських препаратів, що містять NA+MD в обох комбінаціях дозування.

Таблиця 10

Вплив випробуваних речовин на морфологію серця щурів, що зазнали закупорки коронарної артерії та реперфузії; n=9-12; середнє значення \pm СПВ

Група	Лівий шлуночок, мг	Ішемічна зона/лівий шлуночок, %	Некротична зона/лівий шлуночок, %	Показник некрозу, %
I/R контроль	872,9 \pm 25,1	48,4 \pm 2,4	34,4 \pm 2,8	70,9 \pm 3,7
NA	880,4 \pm 25,2	47,0 \pm 1,4	29,8 \pm 2,4	63,0 \pm 3,9

Продовження таблиці 10

MD50	878,9±48,1	48,4±1,5	28,4±3,1	58,4±4,3
MD150	873,2±41,8	48,1±1,9	28,1±1,8*	58,2±2,9*
NA50+MD50	887,6±22,3	46,8±1,6	22,8±1,9**\$	49,1±2,1**\$&
NA50+MD150	867,0±31,5	47,7±2,1	21,5±1,3**\$&	45,6±2,6**\$&

*P<0,05 відносно I/R контролю.

**P<0,005 відносно I/R контролю.

P<0,0005 відносно I/R контролю.

\$P<0,05 відносно MD при тій же дозі.

\$P<0,05 відносно NA. Показник некрозу = (некротична зона/ішемічна зона)х 100

Таким чином, неочікувано встановлений високий рівень захисту від розвитку інфаркту міокарда шляхом синергетичної дії комбінованого лікарського препарату NA та MD. Комбінація (NA+MD) у значній мірі зберігає функції серцевого м'язу, підвищуючи ступінь виживаності тварин (таблиці 8, 9), причому більш значно, ніж NA і MD окремо, захищає серцевий м'яз від некрозу, викликаного ішемією та реперфузією (таблиця 10).

Приклад 4. Визначення антигіпоксичних та антиішемічних ефектів у мозку

Були проведені додаткові експерименти з метою визначення дії комбінованого лікарського препарату NA та MD в експериментальних моделях ішемії центральної нервової системи (ЦНС), гіпоксії та інсульту у порівнянні з ефектами окремих компонентів.

4.1. Мишача модель гіпоксичної недостатності мозкового кровообігу

Методика. Експериментальна гіпоксична недостатність кровообігу була індукована введенням $MgCl_2$ (2 % $MgCl_2$, доза 200 мг/кг) протягом 3 с., у хвостову вену (Berga P. та ін., *Arzneimittelforschung* 1986; 36(9): 1314-1320) самців мишей ICR. Тварини одержували випробовувану речовину або у вигляді окремої дози, або таку ж дозу один раз на день протягом 7 діб. Випробовувані речовини вводили через внутрішньошлунковий катетер. Тварин випадково розподіляли по 7 групах (по 6-10 тварин у кожній):

Контрольна група одержувала воду 0,01 мл/г

Група PI500 (активний контроль) одержувала дозу 500 мг/кг пірацетаму

Група NA50 одержувала дозу 50 мг/кг NA

Група MD50 одержувала дозу 50 мг/кг MD

Група MD150 одержувала дозу 150 мг/кг MD

Група NA50+MD50 одержувала дозу 50 мг/кг NA плюс 50 мг/кг MD

Група NA50+MD 150 одержувала дозу 50 мг/кг NA плюс 150 мг/кг MD

Останню дозу випробовуваної речовини давали за 1 годину до випробування. Період між кінцем ін'єкції $MgCl_2$ та припиненням останнього респіраторного руху реєструють як час виживання.

Статистика. Результати представляли як "середнє значення \pm СПВ" для кожної групи. Статистичний аналіз всередині груп здійснювали за допомогою критерію Ст'юдента. Відмінності між різними експериментальними групами зіставляли з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з повторним зіставленням (тест Tukey). Імовірність $P<0,05$ вважалася значимою.

Результати. Результати підсумовано в таблиці 11. При повторному введенні був продемонстрований захисний антигіпоксичний ефект за рахунок клінічного використання препарату PI, а також MD (таблиця 11). Неочікувано виявлено, що комбінація NA+MD продемонструвала значний захист уже після одноразового застосування, особливо в дозуванні NA50+MD150, де ефект був краще, ніж від кожної речовини окремо. Повторне застосування зазначеної комбінації дає ще більш виражений ефект. Отримані в цьому випробуванні результати вказують на можливе застосування комбінації NA+MD для лікування гіпоксичних станів у клініці.

Таблиця 11

Вплив випробуваних речовин на гіпоксичну недостатність
мозкового кровообігу в мишачій моделі; n=6-10; середнє значення \pm СПВ

Випробувана група	Час виживання, з	
	Окрема доза	7-денна обробка
Контроль	25,75 \pm 1,01	25,4 \pm 1,07
PI500	28,5 \pm 1,04	29,8 \pm 1,32*
NA50	27,3 \pm 0,68	27,8 \pm 0,86
MD50	26,5 \pm 1,07	28,9 \pm 1,20*
MD150	27,0 \pm 0,93	29,8 \pm 1,19*
NA50+MD50	30,8 \pm 1,44* [#]	32,6 \pm 1,18* ^{#&\$}
NA50+MD150	31,1 \pm 1,33* ^{#&}	34,4 \pm 1,50* ^{@\$\$}

*P<0,05 відносно контролю.

[#]P<0,005 відносно контролю.

@P<0,0005 відносно контролю.

\$P<0,05 відносно MD при такій же дозі.

&P<0,05 відносно NA.

^{\$}P<0,005 відносно NA

4.2. Модель закупорки середньої артерії великого мозку

Методика. Використовували самців мишей ICR з масою тіла від 21 до 25 г. Початок середньої артерії великого мозку (MCA) було закупорено за допомогою методики нитки, що знаходиться в просвіті, за відомим методом (Longa E.Z. і ін., Stroke 1989; 20:84-91), пристосованим для мишей згідно з публікацією Zhang Q. і ін. (Behavioural Brain Research 2006; 169:66-74). Були використані протоколи лікування у профілактичному (один раз на день протягом 7 діб, для моделі постійної закупорки MCA) та терапевтичному (початок обробки через 1 год. після тимчасової закупорки MCA) режимі.

Контрольні тварини одержували тільки сольовий розчин. Це випробування є гарною моделлю реального крововиливу в мозок та клінічної ситуації інсульту, коли часто зустрічається закупорка середньої артерії великого мозку. Потім експеримент тривав відповідно до двох протоколів. У першому – закупорка була постійною. У другому – закупорка за допомогою нитки, що знаходиться в просвіті, була тимчасовою, причому нитку видаляли через 2 години та здійснювали реперфузію. Неврологічний стан усіх тварин оцінювали через 24 години після закупорки. Оцінку проводили з використанням бальної оцінки, у якій 0 балів одержують тварини без патології, 4 бала – тварини, нездатні до самовільного руху (Longa E.Z. і ін., Stroke 1989; 20:84-91). Після оцінки неврологічного дефіциту тварини одержували занадто велику дозу пентобарбіталу натрію, головний мозок ізолювали та нарізали 6 шарів товщиною близько 1,5 мм. Зазначені шари забарвлювали за допомогою 2 % натрій-трифенілтетразолію при 37 °C протягом 30 хвил. та фотографували. Як найбільшу представницьку ділянку для розрахунків ішемічного ушкодження мозку вибирали 3-й шар від краніальної сторони, на перехресті зорових нервів, оскільки він повністю забезпечується кров'ю із середньої артерії великого мозку.

Статистика. Дані представляли як "середнє значення \pm СПВ" для 7-9 окремих тварин. Відмінності між експериментальними групами зіставляли з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з повторним зіставленням (тест Tukey). Відмінності неврологічних оцінок між групами аналізували за допомогою критерію Ст'юдента. Імовірність P<0,05 вважалася значимою.

Результати. Через 24 години після закупорки у всіх 8 контрольних тварин проявлялися неврологічні порушення в середньому в 2,63 бали (Таблиця 12 нижче).

Таблиця 12

Вплив випробовуваних речовин на неврологічний стан
у групі тварин з постійною закупоркою; n=7-9; середнє значення \pm СПВ

Випробувана група	Неврологічний стан, бали
Контрольна	2,63 \pm 0,38
Симуляційна	0,14 \pm 0,14 [#]
NA50 \times 7	2,25 \pm 0,25
MD150 \times 7	1,63 \pm 0,29
NA50+MD150 \times 7	1,38 \pm 0,26 ^{*&}

*P<0,05 відносно контролю.

[#]P<0,0005 відносно контролю.

[&]P<0,05 відносно NA

У симуляційній групі тільки в одній тварині спостерігалось незначне порушення. Повторне застосування MD протягом 7 діб частково попереджало погіршення неврологічного стану, викликаного дією закупорки МСА. Неочікувано виявлено, що комбінація NA+MD забезпечувала значний захист від неврологічних порушень, який перевищував ефект NA (Таблиця 12).

Закупорка середньої артерії великого мозку викликала в контрольній групі тварин ішемічне ураження, що охоплює 22,1 % області мозкової тканини, на перехресті зорових нервів (Таблиця 13). Застосування комбінації NA+MD протягом 7 діб забезпечувало значний захист від ураження мозкової тканини, який перевищував ефект індивідуального NA.

Таблиця 13

Вплив застосування випробовуваних речовин протягом 7 днів на розмір зони ураження мозку ішемічним інфарктом при постійній закупорці в групі тварин; n=7-9; середнє значення \pm СПВ

Випробувана група	Зона ішемічного ураження, %
Контроль	22,2 \pm 2,21
NA	19,0 \pm 1,75
MD	16,9 \pm 1,82
NA50+MD150	12,9 \pm 1,54 ^{*&}

*P<0,005 відносно контролю. [&]P<0,05 відносно NA

У наступному експерименті тимчасова закупорка середньої артерії великого мозку протягом 2 год. з наступною реперфузією привела до серйозних порушень функцій мозку в контрольній групі тварин, випробовуваних через 24 години (Таблиця 14 нижче). Введення випробовуваних речовин через 1, 3 та 6 годин після закупорки не забезпечує значного захисту ні в групі NA25 (25 мг/кг \times 3), ні в групі MD75 (75 мг/кг \times 3). Неочікувано виявлено, що тільки в групі NA25+MD75 (25 мг/кг + 75 мг/кг) з випробованою комбінацією, введеною 3 рази після закупорки, отриманий значний захист функцій мозку, що значно перевищує ефект від індивідуальних NA та MD (таблиця 14 нижче).

Таблиця 14

Терапевтичний ефект випробовуваних речовин
на неврологічні функції після тимчасової закупорки; n=7-9; середнє значення \pm СПВ

Випробувана група	Неврологічний стан, бали
Контроль	2,75 \pm 0,31
Симуляційна група	0,29 \pm 0,18 [#]
NA25	2,25 \pm 0,16

Продовження таблиці 14

MD75	2,13±0,23
NA25+MD75	1,44±0,18* ^{&} [§]

*P<0,005 відносно контролю.

#P<0,0005 відносно контролю

§P<0,05 відносно MD.

&P<0,05 відносно NA

- Морфометричний аналіз показав, що індивідуальні NA або MD не дають значного захисту від ураження мозкової тканини, викликаного тимчасовою закупоркою та реперфузією МСА (таблиця 15 нижче). Неочікувано виявлено, що комбінація NA+MD (25 мг/кг+ 75 мг/кг), введена відразу після закупорки, забезпечує істотний захист від ураження мозкової тканини, що значно перевищує ефект від індивідуальних NA та MD (таблиця 15).

Таблиця 15

Терапевтичний ефект випробуваних речовин на розмір зони ішемічного ураження від тимчасової закупорки в групі тварин; n=7-9; середнє значення ± СПВ

Випробувана група	Зона ішемічного ураження, %
Контроль	22,3±1,3
NA25	18,9±1,8
MD75	18,2±1,3
NA25+MD75	13,3±1,7 [#] ^{&} [§]

P<0,005 відносно контролю. §P<0,05 відносно MD. &P<0,05 відносно NA

- Таким чином, автори винаходу неочікувано виявили, що комбінація NA плюс MD забезпечує значно кращий захист функціональних та морфологічних ушкоджень мозкової тканини, ніж окремі компоненти, при терапевтичному використанні або до, або після закупорки МСА. Ці результати вказують, що комбінований лікарський продукт може бути корисний при лікуванні та/або попередженні ішемічно-гіпоксичних станів ЦНС, включаючи інсульт, також завдяки власній інгібуючій активності у випробуваннях агрегації тромбоцитів та тромбозу, які описані нижче.

Активність проти агрегації тромбоцитів та антитромботична активність

Були здійснені випробування: Агрегація тромбоцитів *in vitro*; модель тромбозу у щурів *in vivo*; реєстрація змін температури шкіри *in vivo*.

- Приклад 5. Вплив MD та NA на агрегацію тромбоцитів

- Методика. Агрегацію тромбоцитів досліджували в цільній крові, отриманій від здорового донора В. (вік 37 років), який не приймав ASA або які-небудь інші антитромбоцитні засоби, з використанням приладу Multiplate (Багатофункціональний аналізатор тромбоцитів, фірма Dynabyte Medical, Німеччина) за методом, розробленим Toth O. та ін. (Thromb. Haemost. 2006; 96:781-788) та Velik-Salchner C. і ін. (Anesth. Analg. 2008; 107: 1798-1806). Проби крові збирали в пластикові пробірки, покриті антикоагулянтом - гірудином (Dynabyte Medical, Germany), і використовували для вимірювань між 30 хвил. та 4 год. після відбору крові. Вимірювання проводили згідно з модифікованим протоколом фірми Dynabyte Medical. Підігрівали до 37 °C ізотонічний розчин хлориду натрію (0,3 мл, або фізіологічний розчин досліджуваних речовин (в остаточній концентрації від 10⁻⁶ до 10⁻⁴ ммоль/мл), та додавали з піпетки у випробувані клітини та вводять пробу 0,3 мл цільної крові, що містить антикоагулянт - гірудин. Вимірювання починають через 5 хвил. після інкубації та перемішування при 37 °C, шляхом додавання розчину відповідного агоністу (отримані від фірми Dynabyte Medical, Germany):

- 1) аденозиндифосфат (ADP) - ADP-Тест. ADP стимулює активацію тромбоцитів під дією ADP рецепторів (P2Y12 та інші).

2) тест ADP HS (простагландин E₁ у комбінації з ADP). Додаток ендогенного інгібітору PGE₁ робить тест ADP HS більш чутливим у порівнянні з тестом ADP.

Криві агрегування реєстрували протягом 6 хвил. та аналізували з використанням програмного забезпечення Dynabyte Medical. Були розраховані наступні параметри агрегації

тромбоцитів:

1) A_{max} , максимальне значення агрегації тромбоцитів, виражене в умовних одиницях (AU) агрегування;

2) AUC, загальна площа під кривою агрегування ($AU \cdot хв$). На величину площі впливає загальна висота кривої агрегування, а також нахил кривої, причому AUC щонайкраще виражає сумарну активність тромбоцитів.

Статистика. Результати виражали як "середнє значення \pm СПВ". Для оцінки значимості відхилень використовували однофакторний аналіз ANOVA. Якщо недейсна гіпотеза відхилена, тоді після цього використовують тест Student-Newman-Keuls.

Результати. Перша серія випробувань була спланована з метою визначення впливу різних концентрацій препаратів. Як показано в таблиці 16, MD у широкому діапазоні концентрацій забезпечує значний захист від агрегації тромбоцитів, викликаній дією $ADP+PGE_1$. Величина A_{max} знижується від 100 % у контрольній групі до 55-58 % у групах MD 10^{-5} та 10^{-4} . Нікотинова кислота (у групах 10^{-4} і 10^{-3} ммоль/мл) також зменшує агрегування, викликане дією ADP. Комбінована дія обох речовин забезпечує більш високе та виражене зниження агрегації тромбоцитів, викликане дією ADP або $ADP+PGE_1$, що проявляється у величинах AUC, а також A_{max} .

Таблиця 16

Індивідуальна та комбінована дія MD та NA
на індуковану ADP і PGE_1+ADP агрегацію тромбоцитів; середнє значення \pm СПВ; N=5-8

Група	ADP			PGE_1+ADP		
	AUC ($AU \cdot хв$.)	A_{max}		AUC ($AU \cdot хв$.)	A_{max}	
		AU	%		AU	%
Контроль	942 \pm 43,7	169,3 \pm 6,4	100	1005 \pm 46,5	175,3 \pm 8,9	100
MD 10^{-6}	897 \pm 23,4	159,5 \pm 4,4	94	874 \pm 31,0	151,8 \pm 5,2	87
MD 10^{-5}	882 \pm 26,0	157,7 \pm 3,4	93	579 \pm 48,4**	96,6 \pm 48,3**	55
MD 10^{-4}	869 \pm 36,3	153,2 \pm 6,1	90	587 \pm 37,4**	101,4 \pm 2,2**	58
NA 10^{-4}	859 \pm 62,5	148,0 \pm 5,2*	87	862 \pm 51,9	146,7 \pm 8,6	84
MD 10^{-4} +NA 10^{-4}	474 \pm 34,9***##\$	81 \pm 5,7***##\$	48	306 \pm 35,5***##\$	54,5 \pm 5,8***##\$	31

*P<0,05 відносно контролю. **P<0,005 відносно контролю. ***P<0,0005 відносно контролю.

****P<0,00005 відносно контролю. #P<0,005 відносно MD 10^{-4} .

##P<0,0005 відносно MD 10^{-4} . \$P<0,005 відносно NA 10^{-4} . \$\$P<0,0005 відносно NA 10^{-4} .

Приклад 6. Вплив MD та NA на тромбоз

Методика. Автори винаходу вибрали експериментальну модель тромбозу на основі артеріального тромбозу щурів, індукованого дією $FeCl_3$ (Kurz K. і ін., Thromb. Res. 1990, 60:269-280, Wang X., Xu L., Thromb. Res. 2005, 115:95-100). Ушкодження тканини, ініційоване хімічним окисненням при опосередкованій дії заліза, викликає злипання ушкодженої області та агрегування тромбоцитів з наступною активацією коагуляції та осадженням фібрину. В експериментах використовували самців щурів Wistar з масою тіла 350-420 г. Щурів статистично розділяли по різних експериментальних групах, у кожній з яких утримувалося не менше семи тварин. Носій або випробувана сполука MD (25 мг/кг), NA (25 мг/кг) і комбінація MD+NA (25+25 мг/кг) були введені через рот, за 2 години до ініціювання тромбозу.

Щурів анестезували за допомогою пентобарбіталу натрію (50 мг/кг, в/ч) та протягом експерименту тримали на терморегульованому столі, для підтримки температури тіла, рівною 37 °C. Одну з каротидних артерій піддавали розрізуванню на шиї, відокремлювали від тканини, що примикає, блукаючого нерву, і поміщали датчик потоку (електромагнітний вимірювач кровотоку MFV 1200, Nicon Kohden, Japan) на оголеному сегменті звичайної каротидної артерії, щоб реєструвати кровоток. Через 15 хвил. періоду стабілізації індукували тромбоз шляхом місцевого накладення (у контакт з адвентиціальною поверхнею судини) двох шматків (2 \times 1 мм) фільтрувального паперу Whatman, просоченого 15 %-им розчином $FeCl_3$. Час тромбозу каротидної артерії реєстрували як час, необхідний для повного припинення кровотоку, та записували як час до закупорки (ТТО).

Крім того, у ході експериментального тромбозу вимірювали час кровотечі із хвоста щурів. На хвості робили поперечний надріз скальпелем (на відстані 5 мм від кінця), і хвіст занурювали

безпосередньо в теплий (37 °C) ізотонічний фізіологічний розчин до моменту припинення кровотечі. Припинення кровотечі визначали як час повної зупинки кровотечі, без поновлення кровотечі протягом наступних 30 с.

5 Статистика. Результати обробляли з використанням програми Microsoft Excel 2007. Дані виражали як "середнє значення \pm СПВ" з вимірювань на 7-8 окремих тварин. Відмінності між експериментальними групами зіставляли з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з повторним зіставленням (тест Tukey). Імовірність $P < 0,05$ вважалася значимою.

10 Результати. Середній час для індукованого FeCl_3 тромбозу артерії, з результуючою зупинкою артеріального кровотоку, у контрольній групі становить 24,4 хвил. (таблиця 17).

Таблиця 17

Вплив MD, NA та їх комбінації на індукований FeCl_3 тромбоз; середнє значення \pm СПВ; N=7-8

Група	Час до закупорки		Час кровотечі хвоста	
	хвил.	%	хвил.	%
Контрольна	24,4 \pm 1,45	100	8,9 \pm 1,28	100
MD 25 мг/кг	29,8 \pm 2,29	122	10,5 \pm 1,01	118
NA 25 мг/кг	30,3 \pm 3,12	124	11,5 \pm 1,39	129
MD+NA (25+25 мг/кг)	34,0 \pm 2,78*	139	11,4 \pm 1,42	128

* $P < 0,05$ відносно контролю

15 Мелдоній у дозі 25 мг/кг не забезпечує значного збільшення часу ТТО. Нікотинава кислота викликає невелике збільшення ТТО, яке не є значимим. Вплив NA на час кровотечі хвоста є аналогічним. Комбіноване використання MD та NA неочікувано викликає досить значне збільшення ТТО (39 %), без істотного збільшення часу кровотечі хвоста.

20 Враховуючи позитивний ефект для комбінації MD і NA проти агрегації тромбоцитів *in vitro* та продовження часу ТТО *in vivo*, зазначена комбінація може знайти застосування для зменшення ризику тромбозу у пацієнтів з вираженим атеросклерозом, потенційним інфарктом міокарда та інсультом, а також у післяопераційний період. Той факт, що комбінація MD та NA не пролонгує час кровотечі хвоста, вказує на можливе застосування цієї комбінації для пацієнтів зі збільшеним ризиком кровотечі в період до та після операції.

25 Приклад 7. Порівняльне дослідження комбінованого застосування MD/NA та LA/NA для зменшення припливу крові

30 Нікотинава кислота (ніацин, NA) ефективно знижує рівень сироваткового холестерину, LDL та тригліцеридів при збільшенні HDL. Однак обмежуючим несприятливим ефектом у пацієнтів, що одержують нікотинаву кислоту безпосередньо або у вигляді тривалого виділення, є швидкий розвиток значного шкірного тепла та розширення судин, що називається "припливом", що приводить до хворобливого припинення (Gupta E.K., Ito M.K., Heart Dis. 2002;4:124-137). Як один з найбільш активних та перспективних препаратів для зниження припливу крові під дією ніацину був запропонований Ларопірант (МК-0524) (Cheng K. і ін., PNAS 2006; 103:6682-6687). Метою даного дослідження було зіставлення впливу MD та на приплив крові (зміни температури шкіри та кровоток), викликаний дією NA в експерименті.

7.1.1. Визначення розширення шкірних судин

35 Модель. Самців щурів Wistar анестезували за допомогою пентобарбіталу натрію (50 мг/кг, в/ч) та тримали під наркозом, вводючи додаткові дози (10 мг/кг) щогодини. Кров'яний тиск вимірювали в лівій каротидній артерії, електрокардіограму (ECG) записували за допомогою стандартного провідника II. Кровоток у правій вушній артерії визначали за допомогою лазерного доплерівського вимірювача витрати (OXYFLOW 2000, USA). Кровоток, ECG і артеріальний тиск реєстрували за допомогою системи AD Instruments Powerlab, і дані зберігали в комп'ютері для наступної обробки. Після реєстрації базового рівня протягом 10 хвил. випробовували речовини вводили підшкірно (п/ш) в область зашийка, і продовжували реєстрацію протягом 30 хвил. Дані середнього кровотоку для кожної тварини обчислювали, беручи до уваги середній тиск крові, та зіставляли з початковим та контрольним значенням. Результати обчислювали для 5-8 окремих експериментів та виражали у %, як максимальну зміну кровотоку відносно базового рівня (Carballo-Jane E. і ін., J. Pharmacol. Toxicol. Methods 2007; 56(3):308-316).

Статистика. Результати для кожної групи виражали як середнє значення \pm СПВ. Статистичний аналіз всередині груп здійснювали за допомогою критерію Ст'юдента для

непарних даних та критерію χ^2 -квадрат. Відмінності між кожною експериментальною групою зіставляли з використанням однофакторного дисперсійного аналізу з повторними порівняннями (тесту Tukey's). Імовірність $P < 0,05$ вважалася значимою.

Результати. Як можна побачити нижче з таблиці 18, ніотинова кислота в дозі 15 мг/кг викликає значне збільшення кровотоку у вушній артерії для цієї тваринної моделі. MD, подібно контролю, викликає незначне варіювання кровотоку. NA разом з MD викликає загальмоване (повільно зростаюче) та статистично значно менш виражене абсолютне збільшення кровотоку у порівнянні з одним NA (Таблиця 18).

Потенціал MD для протидії розширенню периферичних судин, викликаному дією NA, може мати позитивний результат у клініці для зменшення шкірних ефектів (приплив крові) від ніотинової кислоти, отже, це буде додатково докладно досліджене, як описано нижче.

Таблиця 18

Вплив експериментальних речовин
на розширення шкірних судин; середнє значення \pm СПВ, N=5-8

Група	Зміни кровотоку, %
Контроль/розчинник	2,15 \pm 4,29
NA (15 мг/кг)	46,1 \pm 7,52 [#]
MD (45 мг/кг)	7,15 \pm 3,72
NA+MD (15+45 мг/кг)	19,33 \pm 6,44 ^{\$}

[#] $P < 0,01$ відносно контролю. ^{\$} $P < 0,05$ відносно NA

7.1.2. Визначення розширення шкірних судин

Матеріали та методики. Дивіться розділ 7.1.

Програма експерименту

Група	Обробка	Кількість тварин
Розчинник для NA та MD		5
NA	NA 15 мг/кг	7
Розчинник для LA		5
LA	LA 0,3 мг/кг	6
LA+NA [0]	LA 0,3 мг/кг+NA 15 мг/кг	6
LA+NA [30]	LA 0,3 мг/кг+NA 15 мг/кг	7
MD	MD 45 мг/кг	6
NA+MD [0]	NA 15 мг/кг+MD 45 мг/кг	6
NA+MD [30]	NA 15 мг/кг+MD 45 мг/кг	6

Статистика. Результати для кожної групи виражали як середнє значення \pm СПВ. Статистичний аналіз всередині груп здійснювали за допомогою критерію Ст'юдента. Відмінності між кожною експериментальною групою зіставляли з використанням однофакторного дисперсійного аналізу з повторними порівняннями (тест Tukey). Імовірність $P < 0,05$ вважалася значимою.

Результати. При індивідуальному введенні, MD подібно LA викликав лише незначні зміни кровотоку. Коли NA давали одночасно з MD (час попередження = 0), підйом кровотоку був повільніше та виражений слабкіше, ніж у випадку одночасного призначення NA та LA (LA+NA [0], дивіться таблицю 19). Були відсутні значні відмінності вушного кровотоку між MD+NA [0] (коли MD додавали разом з NA) та MD+NA [30] (попередня обробка мелдонієм 45 мг/кг за 30 хвил. до NA). В експерименті винаходу тільки при попередній обробці LA, за 30 хвил. до NA (NA+LA [30]) значно знижувався індукований NA підйом кровотоку у вушних судинах щура (таблиця 19).

Вплив MD та LA на індуковане
NA розширення шкірних судин; N=5-7, середнє значення \pm СПВ

Група	Зміни кровотоку, %
Розчинник для NA і MD	2,12 \pm 1,66 ^{\$\$}
NA	52,27 \pm 8,5 ^{**}
MD	6,04 \pm 2,02 ^{\$}
NA+MD [0]	25,11 \pm 5,25 ^{\$\$}
NA+MD [30]	28,07 \pm 5,74 ^{\$\$}
Розчинник для LA	7,31 \pm 1,93 ^{\$\$}
LA	9,87 \pm 2,60 ^{\$}
NA+LA [0]	29,34 \pm 7,82 [*]
NA+LA [30]	16,32 \pm 6,21 ^{\$}

*P<0,05 відносно розчиннику. **P<0,005 відносно розчиннику.

^{\$}P<0,05 відносно NA. ^{\$\$}P<0,005 відносно NA.

Потенціал MD відносно протидії розширенню периферичних судин, викликаному дією NA, може мати позитивний результат у клініці для зменшення шкірних ефектів NA (приплив крові). В експериментах винаходу неможливо оцінити всі переваги одночасного приймання комбінації NA та LA у порівнянні з одночасним прийманням NA та MD.

7.2. Оцінка змін температури шкіри, індукованих ніотиновою кислотою

Матеріали та методики. Для реєстрації змін температури шкіри інтактних щурів використовували безконтактний метод реєстрації температури (Papaliodis D. і ін., Br. J. Pharmacol. 2008; 153:1382-1387). Вимірювання температури проводили з використанням портативного інфрачервоного термометра (Model Proscan 510, TFA-Dostman). Тварин привчали до маніпулювання та до інфрачервоного датчика протягом 3 діб до дослідження. Показання температури на тильній стороні кожного вуха реєстрували три рази без знеболювання безпосередньо до п/ш ін'єкції або NA (в область зашийка) або розчинник/випробувана сполука (в область хвоста). Потім температуру вуха замірювали кожні 5 хвил. протягом періоду 60 хвил. Між вимірюваннями тварин повертали в клітки. Для кожного моменту часу усереднювали дані шести вимірювань температури вуха (по три для кожного вуха). Ларопірант [МК 0524, фірма Cayman Chemicals] (LA) спочатку розчиняли в диметилсульфоксиді, та потім свіжий розчин розбавляли 0,9 % розчином NaCl, у кожен день експерименту. Пропорція в комбінації NA та LA основана на Зведенні характеристик продукту для таблеток модифікованого виділення Tredaptive™ 1000 мг/20 мг (ніотинова кислота/ларопірант).

Програма експерименту

I. Випробування впливу часу та розчиннику на температуру шкіри

Група	Обробка	Кількість тварин
Розч.LA	Розчинник для LA	6
Розч.NA	Розчинник для NA, MASA і MD	6
NA	NA 15 мг/кг підшкірно	6

II. Дослідження впливу комбінацій NA/LA та NA/MD на температуру шкіри

Ларопірант вводили одночасно з NA у вигляді NA+LA [0] або за 30 хвил. до NA у вигляді NA+LA [30], MD вводили одночасно з NA у вигляді NA+MD [0] або за 30 хвил. до NA у вигляді NA+MD [30]; крім того, реєстрували вплив індивідуальних LA та MD на температуру шкіри.

Група	Обробка	Кількість тварин
Контрольна/розчинник		6
NA	NA 15 мг/кг	6
LA	LA 0,3 мг/кг	6
NA+LA	NA 15 мг/кг +LA 0,3 мг/кг	6*

Група	Обробка	Кількість тварин
MD	MD 45 мг/кг	6
NA+MD	NA 15 мг/кг + MD 45 мг/кг	6*

*у кожній часовій групі

Статистика. Дані обробляли з використанням програми Microsoft Excel, і результати виражали як "середнє значення \pm стандартна помилка середнього". Середні результати для різних груп зіставляли з використанням однофакторного аналізу ANOVA та критерію Ст'юдента. Імовірність $P < 0,05$ вважалася значимою.

Результати. На базовому рівні середня температура вуха, що реєструється з 10 до 14 годин, становила $28,1-30,2^{\circ}\text{C}$. Дослідження часу відгуку на введення NA (15 мг/кг, п/ш) показало максимальне збільшення температури на 10-ій хвил. рівне $2,32 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$ від базового рівня та $2,57 \pm 0,43^{\circ}\text{C}$ у порівнянні із групою Розчинник ($P < 0,005$) на 10-ій хвилині (див. нижче). Встановлено, що вплив LA/розчинник на температуру вуха суттєво відрізняється від впливу NA і MD/розчинник тільки в перші 5 хвил. після ін'єкції, тому використовувалася тільки одна контрольна група.

Підшкірна ін'єкція MD або LA не викликає значних змін температури вуха щурів (таблиця 21). Одночасне приймання NA та MD (група NA+MD [0]; час попередження = 0) викликає зменшення припливу крові від NA, що подібне ефекту, який викликаний одночасним введенням NA та LA. Підвищення температури, викликане дією NA, знижується відповідно на 69 % і 67 % (Таблиця 21).

Відсутня значна відмінність температури між групами MD+NA [0] (коли MD додається разом з NA) і MD+NA [30] (попередня обробка мелдонієм 45 мг/кг, за 30 хвил. до NA). В експерименті винаходу тільки попередня обробка ларопірантом, який вводиться п/ш у дозі 0,3 мг/кг за 30 хвил. до ін'єкції NA, забезпечує істотний захист від підвищення температури шкіри, індукованого NA (таблиця 21).

Таблиця 21

Вплив LA і MD на підвищення температури шкіри, викликане дією NA; N=6, середнє значення \pm СПВ

Група	Початкова температура, $^{\circ}\text{C}$	Максимальна температура, $^{\circ}\text{C}$	Збільшення, %
Контрольна/розчинник	$29,5 \pm 0,29$	$29,62 \pm 0,25^{***}$	-
NA	$29,61 \pm 0,4$	$32,2 \pm 0,42^{***}$	100
LA	$29,43 \pm 0,27$	$29,5 \pm 0,35^{***}$	-
NA+LA [0]	$29,72 \pm 0,31$	$31,45 \pm 0,4^{**}$	67
NA+LA [30]	$29,51 \pm 0,32$	$30,73 \pm 0,34^{*}$	47
MD	$29,42 \pm 0,38$	$29,7 \pm 0,31^{***}$	-
NA+MD [0]	$29,53 \pm 0,29$	$31,33 \pm 0,48$	69
NA+MD [30]	$29,68 \pm 0,26$	$31,40 \pm 0,39$	65

* $P < 0,05$ відносно контролю.

** $P < 0,005$ відносно контролю.

*** $P < 0,0005$ відносно контролю.

$^{\circ}$ $P < 0,05$ відносно NA.

\$\$\$ $P < 0,0005$ відносно NA

Таким чином, у винаході встановлено, що комбінація NA з MD не тільки має неочевидну синергетичну антитромбоцитну активність, але також пригнічує побічний ефект - приплив крові.

Приклад 8. Визначення впливу на вміст цукру в крові

Добре відомо, що навіть єдина велика пероральна доза NA збільшує вміст глюкози в крові тварин (Thornton J.H., Schultz L.H. J. Dairy Sci. 1980; 63,262-268), причому для використання NA при лікуванні пацієнтів з діабетом потрібен моніторинг вмісту цукру (Goldberg R.B., Jacobson T.A., Mayo Clin. Proc. 2008; 83(4):470-8).

Методика. В експериментах використовували дорослих самців щурів Wistar. Тварин

піддавали нічному голодуванню до експерименту для того, щоб стабілізувати вміст цукру в крові. Вміст глюкози у венозній крові визначали до експерименту та через 45 хвил. після перорального введення контрольної проби або випробовуваної речовини. Вміст глюкози визначали за допомогою стандартного набору (фірма Optium, Abbott Diabetes Care Ltd., USA).

Використовували велику дозу NA (300 мг/кг, п/о), яка, як відомо, викликає стабільний і тривалий ріст вмісту GL у крові. Застосовували таку ж дозу MD (300 мг/кг).

Тварин розподіляли по 4 групах (n=8):

1) Контрольна група одержувала 1 % розчин NaCl, доза 2 мл/кг)

2) група NA одержувала NA, доза 300 мг/кг

3) група MD одержувала MD, доза 300 мг/кг

4) група NA+MD одержувала 300 мг/кг NA та 300 мг/кг MD.

Статистика. Результати представляли як "середнє значення \pm СПВ" для кожної групи. Статистичний аналіз всередині груп здійснювали за допомогою критерію Ст'юдента. Відмінності між будь-якими експериментальними групами зіставляли з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з повторним зіставленням (тест Tukey). Імовірність $P < 0,05$ вважалася значимою.

Результати. Нікотинова кислота викликає статистично значимий ріст вмісту GL відносно базового та контрольного рівня (Таблиця 22, нижче). MD викликає незначне зниження вмісту GL, яке не відрізняється від контролю. Комбінація NA та MD викликає значно менш виражений ріст вмісту GL (зміна відносно базового рівня 27,5 %, у порівнянні з 61,1 %, викликане дією NA). Цей позитивний ефект вказує, що комбінований лікарський продукт NA+MD може викликати менш виражені побічні ефекти у пацієнтів з нестабільним або порушеним гліцемічним контролем.

Таблиця 22

Вплив випробуваних речовин на вміст глюкози в крові щурів; n=8, середнє значення \pm СПВ

Група	Базовий рівень	Експеримент	Зміна від базового рівня, %	% від контролю
Контрольна (сольовий розчин)	3,84 \pm 0,51	3,9 \pm 0,53	+1,6	0
NA	3,8 \pm 0,344	6,12 \pm 0,42**	+61,1	+56,9
MD	3,92 \pm 0,34	3,72 \pm 0,31	-5,1	-4,6
NA+MD	4,03 \pm 0,349	5,14 \pm 0,56	+27,5	+31,8

* $P < 0,05$ відносно контролю.

** $P < 0,01$ відносно базового рівня

Сумарні висновки

Неочікувано виявлено, що комбінація NA та MD підсилює лікувальну дію NA відносно розладів, що включають дисліпідемію, гіперліпідемію, атеросклероз, ішемічні хвороби серця, вибрані із групи: стенокардія та інфаркт міокарда, минуле та постійне порушення мозкового кровообігу, у тому числі цереброваскулярний розлад та інсульт, та оклюзивне захворювання периферичних артерій, поліпшуючи стан серця та мозку в ішемічно-гіпоксичних станах. Крім того, зазначена комбінація поліпшує розширення периферичних судин, викликане дією NA. Тому можна чекати, що новий комбінований лікарський продукт проявляє підвищену активність у порівнянні з NA при лікуванні метаболічно зв'язаних порушень, що дозволяє знизити щоденні дози NA, та має менш виражені небажані побічні ефекти.

Способи здійснення винаходу

Термін "комбінований лікарський продукт", використовуваний у винаході, припускає одночасне, послідовне або окреме призначення компонентів зазначеної комбінації. Таким чином, даний винахід надає комбінований лікарський продукт, який містить NA та MD або їх фармацевтично прийнятні солі, для одночасного, послідовного або роздільного застосування для попередження агрегації тромбоцитів. Комбінований лікарський продукт винаходу може бути призначений у формі фармацевтичної композиції. Відповідно до цього аспекту винаходу запропонована фармацевтична композиція, яка містить NA або її фармацевтично прийнятну сіль та MD або його фармацевтично прийнятну сіль у суміші з фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм.

Фармацевтична композиція згідно із даним винаходом також містить у собі окремі

композиції, що містять першу композицію NA або її фармацевтично прийнятну сіль та фармацевтично прийнятний розріджувач або носій, та другу композицію, що містить MD або його фармацевтично прийнятну сіль та фармацевтично прийнятний розріджувач або носій. Зазначена композиція призначається для послідовного або роздільного застосування. Оскільки лікування або попередження метаболічно зв'язаних захворювань припускає тривале використання лікарського продукту, у найбільш кращому способі здійснення винаходу передбачається форма, що підходить для перорального застосування, наприклад, у вигляді таблеток або капсул. Кількість кожного активного компоненту даного комбінованого лікарського продукту у фармацевтичній композиції може змінюватися залежно від стану пацієнта. Фахівці у галузі лікування метаболічно зв'язаних захворювань пацієнтів зможуть легко вибрати відповідну кількість кожного активного компоненту та підходящий режим дозування. Краще співвідношення активних компонентів NA та MD або їх солей знаходиться в діапазоні від 3:1 до 1:3.

Відповідно до додаткового аспекту винаходу запропоноване застосування комбінованого лікарського продукту, який визначений вище, або його фармацевтичної композиції, яка визначена вище, для виробництва лікарського препарату для одночасного, послідовного або роздільного призначення для попередження агрегації тромбоцитів/тромбозу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Терапевтична комбінація ніотинової кислоти, що містить ефективну кількість ніотинової кислоти або її фармацевтично прийнятної солі та ефективну кількість мелдонію або його фармацевтично прийнятної солі.

2. Комбінація за п. 1, у якій ніотинова кислота або її фармацевтично прийнятна сіль знаходиться у формі рецептури швидкого вивільнення, уповільненого вивільнення або продовженого вивільнення.

3. Комбінація за п. 1, у якій мелдоній або його фармацевтично прийнятна сіль знаходиться у формі рецептури швидкого вивільнення, уповільненого вивільнення або продовженого вивільнення.

4. Комбінація за п. 1 для застосування у попередженні та/або лікуванні захворювань, викликаних дисліпідемією, які вибрані з групи, яка включає гіперліпідемію, атеросклероз, оклюзивні захворювання периферичних артерій, стенокардію, інфаркт міокарда, порушення мозкового кровообігу та інсульт, викликані швидкоплинним або постійним ішемічним нападом.

5. Комбінація за п. 1 для застосування у попередженні та/або лікуванні захворювань, викликаних агрегацією тромбоцитів, зокрема тромбозу та тромбоемболії.

6. Комбінація за п. 1 для застосування у виробництві лікарського засобу для введення одночасно, послідовно або роздільно пацієнту для лікування або попередження захворювань, викликаних дисліпідемією або патології, викликані агрегацією тромбоцитів.

7. Комбінація за п. 6, де захворювання, викликане дисліпідемією, вибране з групи, яка включає гіперліпідемію, атеросклероз, коронарне серцеве захворювання, вибране з групи, яка включає стенокардію та інфаркт міокарда, швидкоплинний або постійний ішемічний напад, який викликає порушення мозкового кровообігу та інсульт, і оклюзивне захворювання периферичних артерій.

8. Комбінація за п. 6, де патологія, викликана агрегацією тромбоцитів, включає тромбоз та тромбоемболію.

9. Комбінація за п. 6, яка додатково включає статин, вибраний із групи аторвастатину, церивастатину, флувастатину, ловастатину, мевастатину, пітавастатину, правастатину, розувастатину та симвастатину для попередження і/або лікування захворювання, вибраного з групи дисліпідемії, гіперліпідемії та атеросклерозу.

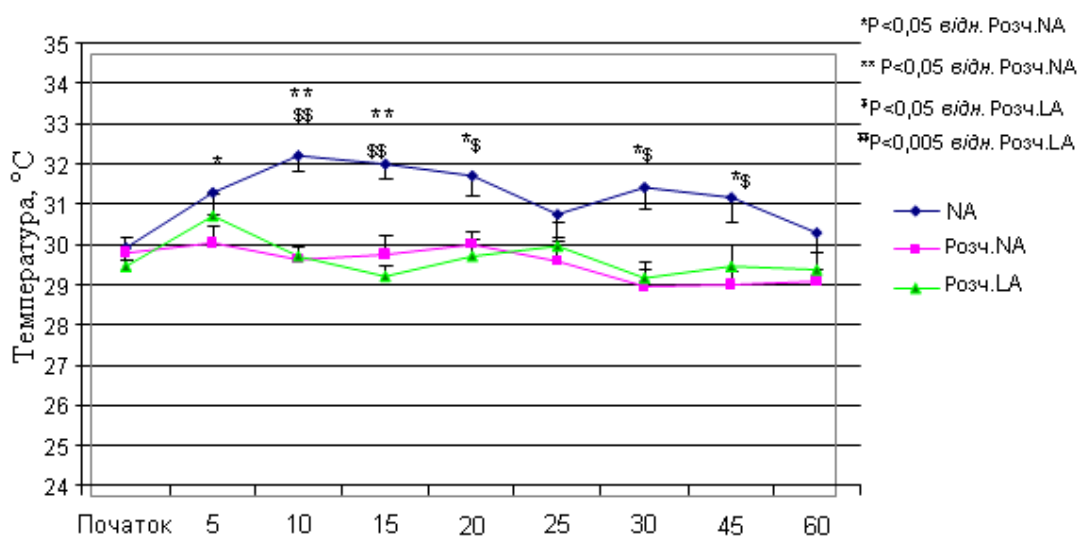
10. Фармацевтична композиція, що підходить для застосування у попередженні і/або лікуванні захворювань, викликаних дисліпідемією, які вибрані з групи, яка включає гіперліпідемію, атеросклероз, оклюзивні захворювання периферичних артерій, стенокардію, інфаркт міокарда, порушення мозкового кровообігу та інсульт, викликані швидкоплинним або постійним ішемічним нападом, яка містить ефективну кількість ніотинової кислоти або її фармацевтично прийнятної солі та ефективну кількість мелдонію або його фармацевтично прийнятної солі у комбінації з фармацевтично прийнятним ексципієнтом або носієм.

11. Композиція за п. 10, у якій ніотинова кислота або її фармацевтично прийнятна сіль знаходиться у формі рецептури швидкого вивільнення, уповільненого вивільнення або продовженого вивільнення.

12. Композиція за п. 10, у якій мелдоній або його фармацевтично прийнятна сіль знаходиться у формі рецептури швидкого вивільнення, уповільненого вивільнення або продовженого вивільнення.

13. Композиція за п. 10, яка містить приблизно 50-500 мг нікотинової кислоти або її фармацевтично прийнятної солі та приблизно 50-500 мг мелдонію або його фармацевтично прийнятної солі.
14. Композиція за п. 10 для лікування та/або попередження патології, викликані агрегацією тромбоцитів, зокрема тромбозу та тромбоемболії.
15. Композиція за п. 10 для одержання лікарського препарату для одночасного, послідовного або роздільного введення пацієнту для лікування або попередження захворювань, викликаних дисліпідемією, або патології, викликані агрегацією тромбоцитів.
16. Композиція за п. 10, яка додатково включає статин, вибраний із групи аторвастатину, церивастатину, флувастатину, ловастатину, мевастатину, пітавастатину, правастатину, розувастатину та симвастатину для попередження і/або лікування захворювання, вибраного з групи дисліпідемії, гіперліпідемії та атеросклерозу.

Фігура 1- Вплив NA, розчинник/NA та розчинник/LA на температуру вуха щурів



Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601