



УКРАЇНА

(19) UA (11) 89042 (13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 31/58

A61K 31/7048 (2009.01)

A61K 36/8964 (2009.01)

A61P 9/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ЗАСТОСУВАННЯ ТИМОСАПОНІНУ ВІІ ПРИ ОТРИМАННІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ АБО ПРОДУКТУ  
ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ І ЛІКУВАННЯ ІНСУЛЬТУ

1

2

(21) a200612539

(22) 21.04.2005

(24) 25.12.2009

(86) PCT/CN2005/000553, 21.04.2005

(31) 200410037347.X

(32) 29.04.2004

(33) CN

(31) 200510059466.X

(32) 25.03.2005

(33) CN

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) МА БАЙПІН, СЯН ЦЮПІН, СЯН ЧЖАО  
ЯН, СЯН ЧЕНЦИ, СЯН ТАН ДАВЕЙ, СЯН(73) ДЗЕ ІНСТІТУТ ОФ РАДІЕЙШН МЕДСІН,  
ЕКЕДЕМІ ОФ МІЛІТАРІ МЕДІКАЛ САЙЄНСІЗ, ПІЕ-  
ЛЕЙ, СЯН

(56) CN 1451384 A, опубл. 29.10.2003

US 6593301 B1, 15.07.2003 & CN 1212966 A,  
07.04.1999

ZHANG ET AL: "Effect of six steroidal saponins isolated from Anemarrhenae rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood" CLINICA CHIMICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 289, no. 1/2, 1999, pages 79-88, XP002409220 ISSN: 0009-8981

YANG L.R. ET AL: 'Study on chemical component and pharmacological action of Anemarrhea asphodeloides.' FOREIGN MEDICAL SCIENCE SECTION OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE MATERIA MEDICIA. vol. 24, no. 4, 2002, pages 207 - 210, XP008081745

(57) 1. Застосування тимосапоніну ВІІ при отриманні лікарського засобу або продукту для профілактики або лікування інсульту (апоплексії).  
2. Застосування тимосапоніну ВІІ за п. 1, яке відрізняється тим, що чистота тимосапоніну ВІІ складає  $\geq 90\%$ .

Даний винахід стосується застосування тимосапоніну ВІІ, зокрема, застосування тимосапоніну ВІІ при отриманні лікарського засобу або продукту для профілактики і лікування інсульту (апоплексії).

Інсульт (апоплексія) включає раптову втрату нервової функції внаслідок порушення мозкового кровообігу внаслідок оклюзії внутрішньочерепних і позачерепних судин або судинного крововиливу, які серйозно шкодять здоров'ю осіб немолодого і середнього віку, будучи головною причиною втрати працездатності і смерті. Приблизно в одній третині пацієнтів, уражених захворюванням, розвиток захворювання викликає смерть; ті, що навіть вижили втрачають працездатність або здатність самостійного догляду внаслідок таких наслідків як геміплегія і афазія. У цей час є 2 способи лікування інсульту: один полягає в зменшенні недостатності кисню і глюкози за допомогою збільшення кровотоку в артеріях; інший полягає в захисті нейронів за допомогою блокування загибелі нейронів,

викликаного церебральною ішемією і ексцитотоксичністю. Захищаючі нейрони засоби, що клінічно застосовуються, включають блокатори кальцієвих каналів, антагоністи рецепторів глутамату і антагоністи NMDA і т.д. Однак в зв'язку з високою частотою ускладнень, смертністю і інвалідністю, є небагато розроблених лікарських засобів для профілактики і лікування інсульту, що далеко недостатньо для задоволення клінічної потреби.

Rhizome Anemarrhenae як трав'яний лікарський засіб являє собою кореневище Anemarrhena asphodeloides Bge, Anemarrhena сімейства Liliaceae, яка, головним чином, продукується в Hebei, Внутрішня Монголія, Shanxi і Північно-Східному Китаї. У традиційній китайській медицині вона використовується як препарат для лікування температури при застуді з ефектами полегшення екзогенних гарячкових станів, гіперпірексії і полідипсії, підвищеної температури, пов'язаної з легеневою патологією, і сухого кашлю, пірексії і гаряч-

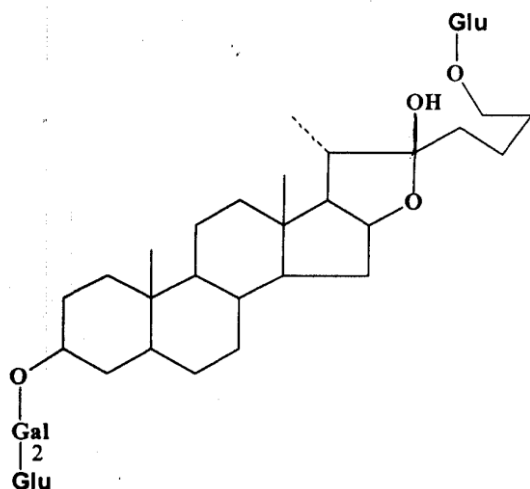
(13) C2

(11) 89042

(19) UA

кового стану, пов'язаних з кістковою патологією, запальних процесів внутрішніх органів, цукрового діабету і дистрофії слизової кишечника із запором. Основним компонентом *Anemarrhena* є стероїдні сапоніни. До теперішнього часу повідомлялося про 32 види стероїдних сапонінів і сапогенін, виділених з *Anemarrhena*, а також про інші компоненти, такі як хромокор, олігосахариди, полісахариди, жирні кислоти і т.д. Kawasaki et al. уперше виділили тимосапонін BII в 1963 р., але не з'ясували його хімічну структуру. Seiji Nagumo et al. уперше з'ясували хімічну структуру тимосапоніну BII у 1991 р. (Seiji Nagumo et al. J. Pharm. (Japanese), 1991; 111(1): 306-310). Відтоді, про екстракцію і визначення активності тимосапоніну BII послідовно повідомили Noboru Nakashima (NOBORU NAKASHIMA et al., Journal of Natural Products, 1993; 56(3): 345-350), Ma Bai ping (Ma BP et al., Yao Xue Xue Bao, 1996; 31(4):271-277), Masayasu Kimura (Masayasu KIMURA et al., Biol. Pharm. Bull, 1996; 19(7): 926-931), Jianying ZHANG (Jianying Zhang et al., Clinica Chimica Acta, 1999; 289:79-88).

Тимосапонін BII, який також називають прототимосапоніном AIII, являє собою основний компонент *Anemarrhena*. Його хімічною назвою є (25S)-26-O- $\beta$ -D-глюкопіранозил-22-гідрокси-5 $\beta$ -фуростан-3 $\beta$ ,26-діол-3-O- $\beta$ -D-глюкопіранозил (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-галактопіранозид, з наступною структурною формулою:



Види фармакологічної активності тимосапоніну BII, про які повідомляли, головним чином, включають:

1. Гіпоглікемічну активність. Тимосапонін BII може знижувати рівень цукру в крові у мишей з цукровим діабетом, викликаним стрептозоцином, без сприяння всмоктуванню глюкози і вивільненню інсуліну. Передбачається, що механізм зниження рівня глюкози в крові полягає в інгібуванні руйнування цукру в печінці (NOBORU NAKASHIMA et al., Journal of Natural Products, 1993; 56(3):345-350).

2. Інгібування агрегації тромбоцитів. Тимосапонін BII володіє очевидною активністю інгібування агрегації тромбоцитів і подовження часу згортання (Jianying ZHANG et al., Clinica Chimica Acta, 1999; 289:79-88).

3. Виведення вільних радикалів. Спостереження з використанням парамагнітного способу

показує, що тимосапонін BII може вивести 57% вільних радикалів, генерованих системою реакції Fenton (Ma BP, et al., Yao Xue Xue Bao, 1996; 31(4):271-277).

4. Активність проти деменції. Ma Bai ping et al. повідомили, що тимосапонін BII надає профілактичний і терапевтичний ефект проти сенільної деменції (заявка на патент Китаю №CN1212966, Заявка №97119680.X).

Chen Wan sheng et al. повідомили про застосування загальних тимосапонінів при отриманні лікарських засобів для профілактики і лікування інсульту (заявка на патент Китаю №CN1451384A, Заявка №03116824.8). Розкриті в цьому документі загальні сапоніни характеризуються сумарним вмістом тимосапонінів BII, E, B, AIII  $\geq 50\%$ .

Після декількох років інтенсивних досліджень, заявники уперше виявили і підтвердили активність одного тимосапоніну BII в профілактиці і лікуванні інсульту. Вказана сполука може значно полегшити неврологічні симптоми у щурів з ішемією, зменшити розмір інфаркту мозку і зменшити міру набряку мозку і значно поліпшити гемореологію в експериментальних тварин і знизити запальне пошкодження, викликане церебральною ішемією.

Тому даний винахід стосується застосування тимосапоніну BII при отриманні лікарського засобу або продукту для профілактики або лікування інсульту.

Даний винахід також стосується фармацевтичної композиції або продукту для профілактики або лікування інсульту, що включає тимосапонін BII як активний інгредієнт і фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт.

Відповідно до даного винаходу, тимосапонін BII використовують по суті в чистій формі, наприклад, чистота тимосапоніну BII складає  $\geq 90\%$ .

Відповідно до даного винаходу, фармацевтична композиція або продукт, що включає тимосапонін BII, можна вводити різними шляхами і включати в різні лікарські форми, наприклад, пероральні лікарські форми, такі як таблетка, капсула, і розчин, суспензія; парентеральні лікарські форми, такі як розчин для ін'єкцій, мазь, трансдермальна система і т.д.

Відповідно до даного винаходу, безперервне введення тимосапоніну BII (20мг/кг і 40мг/кг) протягом 7 днів може значно знизити бальну оцінку неврологічних симптомів у щурів, що мають тромбоз середньої мозкової артерії (MCA) і значно зменшити розмір інфаркту мозку на моделі щурів; введення в дозі 40мг/кг може значно знизити вміст води в мозку, в порівнянні з модельною групою ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ).

Відповідно до даного винаходу, спосіб підшкірної ін'єкції адреналіну плюс занурення в крижану воду може привести до гострого стазу крові на моделі щурів, а введення тимосапоніну BII (10мг/кг, 20мг/кг, 40мг/кг) може значно знизити в'язкість цільної крові і плазми при високій, середній і низькій швидкостях зсуву, в порівнянні з модельною групою ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ). Тимосапонін BII в дозі 40мг/кг може значно поліпшити деформаційну здатність еритроцитів і знизити показник аглютинації еритроцитів, в порівнянні з модельною гру-

пою ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ).

Емболічний нитковий спосіб використовували при отриманні моделі церебральної ішемії-реперфузії у щурів, і ELISA використовували для визначення рівнів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 і TGF- $\beta$  в кожній групі. Результати показали, що тимосапонін BII надавав значний захисний ефект проти запальних реакцій на моделі церебральної ішемії-реперфузії у щурів.

Підводячи підсумок, можна сказати, що тимосапонін BII можна використовувати при профілактиці і лікуванні інсульту.

Способи здійснення винаходу

Наступні приклади представлені для подальшої ілюстрації винаходу, але жодним чином не призначені для його обмеження.

Приклад 1

Вплив тимосапоніну BII на ішемічне пошкодження мозку при тромбозі середньої церебральної артерії, викликаний FeCl<sub>3</sub> (MCAT), у щурів.

I. Метод

1. Вплив тимосапоніну BII на неврологічні симптоми і розмір інфаркту мозку у щурів з тромбозом середньої церебральної артерії

1.1. Розділення на групи і введення

Експериментальних тварин випадковим методом ділили на 6 груп, тобто, групу моделі MCAT, групу несправжньої операції, групу гідергіну (0,6мг/кг), групу тимосапоніну BII 10мг/кг, групу тимосапоніну BII 20мг/кг і групу тимосапоніну BII 40мг/кг. Безперервне оральне введення препаратів виконували протягом 7 днів щодобовим об'ємом 5мл/кг. Операцію виконували через 1 год. після введення препарату на 7-ий день. Тваринам з груп моделі MCAT і несправжньої операції давали такий же об'єм 0,5% розчину СМС.

1.2. Отримання ішемічного пошкодження мозку, викликаного у щурів тромбоемболією МСА

Для отримання моделі використовували способи Tamura і Liu з модифікаціями. Щурів наркотизували внутрішньочеревинною ін'єкцією 10% хлоралгідрату (0,35г/кг) і фіксували з відкинутою правою передньою лапою. Аркоподібний розріз довжиною приблизно 1,5см робили в середній точці в проміжку між краєм повік і зовнішнім слуховим проходом, і скроневої м'яз видаляли для оголення скроневої кістки. У кістці під стереоскопічним мікроскопом за допомогою свердла проробляли отвір діаметром 2,5мм в 1мм в головному напрямку від точки з'єднання виличної кістки і скроневої кістки, залишки тканин видаляли для оголення середньої церебральної артерії (розташованої між нюховим трактом і нижньою церебральною веною). Навколишні тканини були захищені шматочком пластикової плівки. Невеликий шматочок фільтрувального паперу, що використовується для кількісного аналізу, який був просочений 10мкл 50% розчином хлориду тривалентного заліза, наклали на цей відрізок середньої мозкової артерії. Фільтрувальний папір видаляли через 30хв., і місцеві тканини промивали фізіологічним сольовим розчином з подальшим поширеним зашиванням. Потім включених в експеримент щурів знову вміщували в клітки утримання. Температуру регулювали, підтримуючи на рівні 24°C. У групи

несправжньої операції оперативні процедури були такими ж, як у модельної групи, за винятком накладення розчину хлориду тривалентного заліза.

1.3. Оцінка неврологічних симптомів в балах

Експериментальних тварин тестували через 6 год. і 24 год. після операції відповідно до способу Bederson з модифікаціями для виявлення типів поведінки. Критерії: (1) Щурів підіймали за хвіст для спостереження за згинальними рухами передніх кінцівок, причому симетричне витягнення вперед обох передніх кінцівок оцінювали в 0 балів, а виникнення будь-якого або всіх з рухів у вигляді згинання в плечовому суглобі, згинання в ліктьовому суглобі, внутрішнього скручування плеча передньої кінцівки, на боці, протилежному оперованому боку, оцінювали в 1 бал. (2) Тварину вміщували на плоску поверхню, і її плечі розтягували в протилежному напрямку для перевірки опору. Рівномірний і сильний опір з обох боків оцінювали в 0 балів, а зниження опору з протилежного боку оцінювали в 1 бал. (3) Обидві передні кінцівки щура вміщували на дротяну сітку для спостереження м'язового напруження. Рівномірний і сильний тиск з обох боків оцінювали в 0 балів, а зниження м'язового напруження з протилежної сторони оцінювали в 1 бал. (4) Щура підіймали за хвіст, і тварині, що виявляє безперервне обертання в напрямку, протилежному боку операції, давали оцінку в 1 бал. Відповідно до представлених вище критеріїв, повна бальна оцінка становить 4, і чим вище бальна оцінка, тим важчий поведінковий розлад у тварини.

1.4. Визначення розміру інфаркту мозку

Після поведінкової оцінки, тварин декапітували для видалення мозку. Видаляли нюхову цибулину, мозочок і нижній відділ стовбура мозку, а частину, що залишилася, розрізали на 5 вінцевих зрізів при температурі нижче 4°C. Зрізи негайно вміщували в розчин TTC (хлориду трифенілтетразолію) для фарбування (який містить 1,5 м 4% TTC, 0,1мл 1М K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> і воду (інша частина) на 5мл забарвлюючого розчину), з подальшою інкубацією в темряві при 37°C протягом 30хв. Потім зрізи переносили в розчин 10% формальдегіду і інкубували в темряві протягом 24 год. Після фарбування неішемічні ділянки ставали червоними, а ділянки інфаркту були білими. Білі тканини обережно збирали і зважували. Міру інфаркту мозку виражали у вигляді процентної частки (%) тканини, що зазнала інфаркту, від всієї тканини мозку, і також від ураженого боку мозку.

2. Вплив тимосапоніну BII на вміст води в тканинах мозку при тромбозі середньої мозкової артерії (MCAT) у щурів

2.1. Розділення на групи, введення і способи моделювання (див. 1 вище)

2.2. Визначення вмісту води в тканинах мозку

Щурів декапітували через 24 год. після операції, і мозок видаляли і ділили на ліву і праву півкулі. Для намокання поверхні використовували фільтрувальний папір, і відповідно визначали вологу масу кожної півкулі. Потім виконували сушіння тканин мозку при 105°C протягом 48 год. з подальшим точним зважуванням для визначення сухої маси. Вміст води в мозку розраховували відповід-

но до наступної формули:

Вміст води в мозку = (волога маса суха маса)/вологу масу x 100%

### 3. Статистичний аналіз

Експериментальні дані виражали у вигляді  $\bar{x} \pm s$ . Результати аналізували, використовуючи програмне забезпечення SPSS, і t критерій викорис-

товували для виконання порівняння груп.

### II. Результати

I. Вплив тимосапоніну BII на неврологічні симптоми і розмір інфаркту мозку при тромбозі середньої мозкової артерії у щурів

Результати показані нижче в таблиці 4-1.

Таблиця 4-1

Вплив тимосапоніну BII на неврологічні симптоми і розмір інфаркту мозку при тромбозі середньої мозкової артерії у щурів ( $\bar{x} \pm s$ )

Група	Дозування мг/кг	n	Розмір інфаркту мозку		бальна оцінка неврологічних симптомів	
			процентна частка всієї тканини мозку (%)	процентна частка тканини ураженого боку (%)	6 год.	24 год.
Несправжня операція	-	12	0±0	0±0	0,08±0,29	0,17±0,39
Модель МСАТ	-	12	4,58±1,59 <sup>ΔΔ</sup>	8,76±2,98 <sup>ΔΔ</sup>	2,73±1,01 <sup>ΔΔ</sup>	2,55±0,52 <sup>ΔΔ</sup>
Гідергін	0,6	11	1,98±0,72**	3,75±1,38**	1,91±0,83**	1,55±0,69**
Тимосапонін BII	10	12	3,27±1,74	6,35±3,39	2,08±0,67	2,08±0,79
Тимосапонін BII	20	11	2,92±1,20*	5,37±2,20*	1,82±0,75*	2,00±0,45*
Тимосапонін BII	40	10	1,99±1,20**	3,88±2,38**	1,50±0,71**	1,90±0,74*

Примітки: <sup>ΔΔ</sup>P<0,01, в порівнянні з групою несправжньої операції; \*P<0,05, \*\*P<0,01, в порівнянні з модельною групою.

Результати вказують на те, що, в порівнянні з групою несправжньої операції, тваринні групи моделі МСАТ і кожної групи введення виявили різні міри осередку інфаркту і симптомів, подібних до геміплегії. Тимосапонін BII в дозі 20мг/кг і 40мг/кг значно зменшував розмір інфаркту мозку і полегшував неврологічні симптоми у тварин з групи мо-

делі (P<0,05, P<0,01).

2. Вплив тимосапоніну BII на вміст води в тканинах мозку у щурів з тромбозом середньої мозкової артерії (МСАТ)

Результати показані нижче в таблиці 4-2.

Таблиця 4-2

Вплив тимосапоніну BII на вміст води в тканинах мозку при тромбозі середньої мозкової артерії у щурів ( $\bar{x} \pm s$ )

Група	Дозування мг/кг	n	Вміст води в неуразеній півкулі (%)	Вміст води в ураженій півкулі (%)
Несправжня операція	-	12	79,60±0,49	79,59±0,48
Модель МСАТ	-	12	79,54±0,80	81,12±0,90 <sup>ΔΔ</sup>
Нимодипін	12	12	79,44±0,41	80,37±0,73*
Тимосапонін BII	10	12	79,51±0,57	80,52±0,69
Тимосапонін BII	20	12	79,41±0,38	80,46±0,79
Тимосапонін BII	40	12	79,47±0,44	80,15±0,99*

Примітки: <sup>ΔΔ</sup>P<0,01, в порівнянні з групою несправжньої операції; \*P<0,05, в порівнянні з модельною групою.

Як показано в таблиці вище, тимосапонін BII в дозі 40мг/кг значно зменшував вміст води в ураженій півкулі і полегшував набряк мозку на моделі у щурів (P<0,05).

Модель тромбозу середньої мозкової артерії являє собою звичайну експериментальну модель осередкової церебральної ішемії, яка об'єктивно імітує клінічну обставину інфаркту мозку в басейні

середньої мозкової артерії, і має переваги легкого регулювання місцевих умов і можливості повторення, аналогії плину клінічного церебрального інсульту і фіксованої локалізації тромбу. Як показують результати, через 6 год. або 24 год. після операції спостерігалися симптоми, аналогічні геміплегії, збільшення вмісту води на боці тромбозу і виражений інфаркт мозку (за даними фарбування

ТТС). У порівнянні з групою несправжньої операції, в групі тимосапоніну ВІІ в дозі 20мг/кг і 40мг/кг значно поменшав розмір інфаркту мозку і полегшувалися неврологічні симптоми ( $P<0,05$ ,  $P<0,01$ ). Крім того, в порівнянні з модельною групою, міра набряку мозку в групі тимосапоніну ВІІ 40мг/до була значно знижена ( $P<0,05$ ). Ці результати свідчать про те, що препарат надає захисний ефект проти ішемічного пошкодження мозку.

#### Приклад 2

Вплив тимосапоніну ВІІ на гемореологію на моделі гострого застою крові у щурів

##### I. Метод

##### 1. Розділення на групи і введення

Експериментальні тварини випадковим методом були розділені на 6 груп на основі маси тіла, тобто, модельну групу, нормальну контрольну групу, групу нимодипіну (12мг/кг), групу тимосапоніну ВІІ 10мг/кг, групу тимосапоніну ВІІ 20мг/кг і групу тимосапоніну ВІІ 40мг/кг. Безперервне пероральне введення препаратів виконували протягом 5 днів щодобовим об'ємом 5мл/кг. Нормальній контрольній групі і модельній групі давали однаковий об'єм 0,5% розчину СМС.

##### 2. Спосіб моделювання

Для отримання цієї моделі модифікували спосіб МАО Teng-min. Щурам проводили підшкірну ін'єкцію 0,8мг/кг адреналіну двічі через 1 год. і 5 год. після введення на 5-ий день, і їх вміщували в крижану воду при 4°C на 5хв. через 2 год. після першої ін'єкції адреналіну.

3. Оцінка величин в'язкості цільної крові і плазми

Щурів наркотизували внутрішньочеревинною ін'єкцією 10% хлоралгідрату (0,35г/кг) через 1 год.

після останнього введення. Кров збирали з сонної артерії і обробляли 1% гепарином. 0,8мл крові після введення антикоагулянту тестували у віскозиметрі крові, і в'язкість цільної крові представляли в'язкістю крові, тестованою при високій ( $200S^{-1}$ ), середній ( $30S^{-1}$ ), низькій ( $5S^{-1}$ ), і дуже низькій ( $1S^{-1}$ ) швидкостях зсуву. Крім того, кров після введення антикоагулянту центрифугували при 3000об./хв. протягом 8хв. для отримання плазми у вигляді надосадової рідини, і 0,8мл плазми тестували для визначення в'язкості плазми при  $100S^{-1}$  у віскозиметрі крові.

4. Визначення агрегації і деформаційної здатності еритроцитів

До 40мкл гепаринізованої крові додавали 1мл деформуючого розчину і ретельно змішували. Зразок 0,8мл тестували в тестері агрегації/деформаційної здатності еритроцитів, і деформаційну здатність еритроцитів виражали у вигляді показника максимальної деформації еритроцитів і площі під кривою (SSS). Інші 0,8мл тестували в тестері агрегації/деформаційної здатності еритроцитів, і агрегацію еритроцитів виражали у вигляді показника максимальної агрегації еритроцитів (MAXD) і площі під кривою (SSS).

##### 5. Статистичний аналіз

Експериментальні дані виражали у вигляді  $\bar{x} \pm s$ . Результати аналізували, використовуючи програмне забезпечення SPSS, і t критерій використовували для виконання порівняння груп.

##### II. Результати

1. Вплив тимосапоніну ВІІ на величини в'язкості цільної крові і плазми на моделі гострого застою крові у щурів

Результати показані нижче в таблиці 10-1.

Таблиця 10-1

Вплив тимосапоніну ВІІ на величини в'язкості цільної крові і плазми на моделі гострого застою крові у щурів ( $\bar{x} \pm s$ )

Група	Дозування мг/кг	n	В'язкість цільної крові				В'язкість плазми ( $100S^{-1}$ )
			$200S^{-1}$	$30S^{-1}$	$5S^{-1}$	$1S^{-1}$	
Пустий контроль	-	13	3,81±0,42	5,42±0,60	10,34±1,41	25,74±4,64	1,33±0,11
Модель	-	14	5,05±0,74 <sup>ΔΔ</sup>	7,56±1,18 <sup>ΔΔ</sup>	15,52±3,28 <sup>ΔΔ</sup>	41,48 ±11,64 <sup>ΔΔ</sup>	1,53±0,11 <sup>ΔΔ</sup>
Німодипін	12	12	4,51±0,55*	6,47±0,92*	12,34**±2,58	30,45*±8,74	1,41±0,14*
Тимосапонін ВІІ	10	10	4,45±0,71	6,10±0,85**	11,02**±1,38	27,03**±4,64	1,40**±0,10
Тимосапонін ВІІ	20	13	4,49±0,70	6,55±0,93*	12,91±1,82*	33,13±5,70*	1,36**±0,10
Тимосапонін ВІІ	40	12	4,42±0,38*	6,45**±0,60	12,46±1,33**	31,21±4,29	1,38 ±0,12**

Примітки: <sup>ΔΔ</sup> $P<0,01$ , в порівнянні з групою пустого контролю; \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , в порівнянні з модельною групою.

Результати вказують на те, що, в порівнянні з групою нормального контролю, величини в'язкості цільної крові і плазми значно збільшилися на моделі застою крові у щурів через 24 год. після моделювання ( $P<0,01$ ). Тимосапонін ВІІ в дозі 10мг/кг, 20мг/кг і 40мг/кг значно знижував величини в'язкості цільної крові і плазми при високій, серед-

ній і низькій швидкостях зсуву у щурів групи моделі ( $P<0,05$ ,  $P<0,01$ ).

2. Вплив тимосапоніну ВІІ на агрегацію і деформаційну здатність еритроцитів на моделі гострого застою крові у щурів

Результати показані нижче в таблиці 10-2.

Таблиця 10-2

Вплив тимосапоніну BII на агрегацію і деформаційну здатність еритроцитів на моделі гострого застою крові у щурів (x±s)

Група	Дозування мг/кг	n	Агрегація еритроцитів		Деформаційна здатність еритроцитів	
			MAXD	SS	MAXDI	SSS
Пустий контроль	-	13	0,52±0,13	94,97±25,97	0,71±0,03	365,02±20,48
Модель	-	14	0,89±0,11 <sup>ΔΔ</sup>	176,52±19,74 <sup>ΔΔ</sup>	0,69±0,02 <sup>Δ</sup>	349,22±10,59 <sup>ΔΔ</sup>
Німодипін	12	12	0,80±0,09*	160,38±16,50*	0,70±0,03	353,92±15,83
Тимосапонін BII	10	10	0,94±0,14	186,67±28,85	0,72±0,05	363,88±19,58
Тимосапонін BII	20	13	0,81±0,26	163,04±50,23	0,71±0,05	363,97±27,87
Тимосапонін BII	40	12	0,76±0,14*	152,78±28,11*	0,73 <sup>**</sup> ±0,03	374,26 <sup>**</sup> ±15,82

Примітки: <sup>Δ</sup>P<0,05, <sup>ΔΔ</sup>P<0,01, в порівнянні з групою пустого контролю; \*P<0,05, \*\*P<0,01, в порівнянні з модельною групою.

Результати вказують на те, що, в порівнянні з групою пустого контролю, у щурів з групи моделі застою крові виявився збільшений показник агрегації еритроцитів і знижений показник деформаційної здатності еритроцитів (P<0,05, P<0,01) через 24 год. після моделювання. У порівнянні з щурами з групи моделі, у щурів з групи тимосапоніну BII 40мг/кг виявилось значне збільшення показника деформаційної здатності еритроцитів і зменшення показника агрегації еритроцитів (P<0,01).

### III. Обговорення і резюме

Гемореологія являє собою галузь науки, що відноситься до текучості крові, а також агрегації, здатності згущуватися і деформаційної здатності клітин крові. Гемореологічні показники, такі як питома в'язкість цільної крові, питома в'язкість плазми, показник агрегації еритроцитів і фібриноген можуть змінюватися у пацієнтів, страждаючих ішемічним цереброваскулярним захворюванням. Тому, поліпшення гемореології, включаючи зменшення в'язкості крові і агрегації еритроцитів і збільшення деформаційної здатності еритроцитів, мають вирішальне значення в профілактиці і лікуванні ішемічних цереброваскулярних захворювань. У даному дослідженні щурам підшкірно ін'єктували велику дозу адреналіну для стимуляції стану гніву і тривоги, і їх вміщували в крижану воду для імітації стану ознобу. Таким шляхом копіювалася модель гострого застою крові з ознаками в'язкої, густої, агрегованої крові, і крові, що згорнулася. Результати дослідження показали, що тимосапонін BII може значно інгібувати агрегацію еритроцитів, збільшувати деформаційну здатність еритроцитів і знижувати величини в'язкості цільної крові і плазми при високій, середній і низькій швидкості зсуву у щурів з моделлю гострого застою крові, свідчаючи про те, що препарат може значно поліпшити гемореологію.

### Приклад 3

Вплив тимосапоніну BII на запальні фактори в тканинах мозку у щурів з церебральною ішемією-реперфузією

Емболічний нитковий спосіб використовували при отриманні моделі церебральної ішемії-реперфузії у щурів, і ELISA використовували для

визначення рівнів IL-1β, TNF-α, IL-10 і TGF-β в кожній групі з тим, щоб дослідити захисний ефект тимосапоніну BII проти запальних факторів на моделі церебральної ішемії-реперфузії у щурів.

### I. Метод

#### 1. Розділення на групи і введення

Щурів випадковим методом ділили на 6 груп на основі маси тіла, тобто, групу несправжньої операції, групу моделі, групу німодипіну (12мг/кг), групу тимосапоніну BII 10мг/кг і групу тимосапоніну BII 40мг/кг. Всі препарати включали в препаративну форму з 0,5% СМС. Щурів кожної групи використовували для експериментів після дводенного спостереження і утримання. Безперервне пероральне введення препаратів виконували протягом 5 днів при добовому об'ємі 10мл/кг. Групі несправжньої операції і групі моделі давали однаковий об'єм 0,5% розчину СМС 1 раз/день. Операцію проводили через 1 год. після введення препарату вранці 5-го дня.

#### 2. Спосіб моделювання

Модель обструкції середньої мозкової артерії (MCAO) отримували відповідно до опису Koizumi і Nagasawa. Щурам внутрішньочеревинно (в/ч) ін'єктували 10% хлоралгідрат в дозі 0,35г/кг і фіксували в положенні лежачи на спині. Після місцевої стерилізації починали операцію. Препарували праву загальну сонну артерію (ССА), праву внутрішню сонну артерію (ІСА) і зовнішню сонну артерію (ЕСА) і під них підводили нитки для майбутнього використання. ЕСА і ССА перев'язували. Незабаром після перетиснення дистального кінця ІСА артеріальним затиском, виробляли розріз у розгалуження ЕСА і ІСА і вводили одну нейлонову нитку з одним кінцем, нагрітим для придання йому потовщення в формі цибулини (нитка діаметром 0,25мм, маркована в 2см від потовщеного у вигляді цибулини кінця, а передній кінець емболічної нитки обробляли парафіном для майбутнього використання). Після введення нитки в ІСА, нитку і впускний отвір ІСА злегка затягували лігатурою, і потім артеріальний затиск знімали. Нейлонову нитку вводили далі в ІСА і злегка витягували, коли з'являвся невеликий опір, доти, поки вона не досягла глибини приблизно 18,5±0,5мм, викликаючи обструкцію МСА і, отже, церебральну ішемію. На

впускний отвір знов накладали лігатуру, залишаючи зовні нейлонову нитку довжиною 1см. М'язи і шкіру зашивали, і щурам внутрішньочеревинно ін'єктували гентаміцин сульфат в дозі 0,4мл на щура. Через 3 год. кінець нитки обережно витягували назовні доти, поки не з'являвся опір, приводячи до реперфузії МСА. Таким чином, моделювання було завершено. У групи несправжньої операції була перев'язана тільки права ССА без розрізу і введення нитки. Критерії включення: були включені тварини, у яких через 3 год. після створення ішемії виявлялися ознаки обертання проти-лежною передньою кінцівкою, хода по круговому проходу або падіння в протилежному напрямі при ході. Виключалися тварини, які через 3 год. не виявляли цих ознак або ще знаходилися в несвідомому стані.

### 3. Отримання гомогенатів тканини

Тварин декапітували через 3 год. після створення ішемії і через 21 год. після реперфузії. Видаляли нюхальну цибулину, мозочок і нижній відділ стовбура мозку, а частину правої півкулі, що залишилася, гомогенізували в фізіологічному сольовому розчині при 4°C до концентрації 10%.

### 4. ELISA аналізи IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 і TGF- $\beta$

#### (1) Побудова стандартної кривої

Були встановлені 8 стандартних ямок, і в кожену додали 100мкл розчину для розбавлення зразка. У першу ямку додавали 100мкл стандарту, ретельно змішували і потім 100мкл піпеткою переносили у другу ямку. Цей процес подвійного розбавлення повторювали до 7-ої ямки. Нарешті, 100мкл набирали піпеткою з 7-ої ямки і виливали, так що об'єм в кожній ямці становив 100мкл. 8-а ямка служила як пустий контроль.

#### (2) Завантаження

150мкл зразка додавали в кожену ямку із зразком.

#### (3) Реакційний планшет ретельно змішували і

вмішували на 120хв. в термостат при 37°C

#### (4) Промивання планшетів

Реакційні планшети ретельно 4-6 разів промивали промивальним розчином і промокали фільтрувальним папером.

(5) У кожену ямку додавали 50мкл робочого антитіла першого антитіла, і планшет вмішували на 60хв. в термостат при 37°C

#### (6) Промивання планшетів: див. вище.

(7) У кожену ямку додавали 100мкл робочого розчину кон'югованого з ферментом антитіла і планшет вмішували на 60хв. в термостат при 37°C.

#### (8) Промивання планшетів: див. вище.

(9) У кожену ямку додавали 100мкл робочого розчину субстрату, і планшет вмішували на 5-10хв. в темне місце при 37°C

(10) У кожену ямку додавали 1 краплю зупиняючого розчину і ретельно змішували.

(11) Зчитували свідчення спектральної поглинальної здатності при 492нм.

### 5. Розрахунок результатів

Розрахунок проводили після віднімання контрольної величини з всіх величин OD (оптичної густини). Величини OD для стандарту при 1000, 500, 250, 125, 62, 31, 16 і 0пг/мл наносили на графік на напівлогарифмічний папір для отримання стандартної кривої. Рівень відповідного запального фактора можна визначити по стандартній кривій на основі величини OD зразка.

### 6. Статистичний аналіз

Експериментальні дані виражали у вигляді  $\bar{x} \pm s$ . Результати аналізували, використовуючи програмне забезпечення SPSS, і t критерій використовували для виконання порівняння груп.

### II. Результати

I. Вплив тимосапоніну BII на запальні фактори у щурів на моделі церебральної ішемії-реперфузії

Таблиця

Вплив тимосапоніну BII на IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 і TGF- $\beta$  у щурів на моделі ішемії-реперфузії ( $\bar{x} \pm s$ )

Група	Дозування мг/кг	n	IL- $\beta$ (пг/мл)	TNF- $\alpha$ (пг/мл)	IL-10(пг/мл)	TGF- $\beta$ (пг/мл)
Несправжня операція	-	8	9,42 $\pm$ 0,94	7,91 $\pm$ 0,36	3,55 $\pm$ 3,03	12,89 $\pm$ 4,51
Модель	-	8	10,95 $\pm$ 0,74 $\Delta\Delta$	8,74 $\pm$ 0,70 $\Delta\Delta$	16,75 $\pm$ 3,45 $\Delta\Delta$	17,69 $\pm$ 2,84 $\Delta$
Німодипін	12	8	9,01** $\pm$ 0,81	7,92 $\pm$ 0,56*	4,98* $\pm$ 3,54	12,01** $\pm$ 2,54
Тимосапонін BII	10	8	9,70** $\pm$ 0,30	8,44 $\pm$ 0,62	14,49 $\pm$ 11,78	12,70 $\pm$ 3,57*
Тимосапонін BII	40	8	7,98 $\pm$ 0,80**	7,65 $\pm$ 0,61	11,19* $\pm$ 5,16	10,30** $\pm$ 3,79

Примітки:  $\Delta P < 0,05$ ,  $\Delta\Delta P < 0,01$ , в порівнянні з групою несправжньої операції; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , в порівнянні з модельною групою.

Результати експериментів вказують на те, що, в порівнянні з групою несправжньої операції, рівні прозапальних факторів IL- $\beta$  і TNF- $\alpha$  в мозковій тканині щурів з моделлю церебральної ішемії-реперфузії значно збільшилися, а рівні захисних факторів IL-10 і TGF- $\beta$  також значно

збільшилися, і величини різниці були статистично значущими. Позитивний контроль німодипіну і тимосапоніну BII в дозі 40мг/кг значно знижували рівні цих запальних факторів і, таким чином, надавали очевидні захисні ефекти при запальних реакціях у щурів з моделлю ішемії-реперфузії.

