



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82057 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 36/9066 (2007.01)

A61P 7/00

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЦЕРЕБРАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ НА ОСНОВІ AR-D-ТУРМЕРОНУ І А-ТАВ-ТУРМЕРОНУ

1

2

(21) 20040705723

(22) 14.12.2002

(24) 11.03.2008

(86) PCT/IB02/05366, 14.12.2002

(31) 60/340,165

(32) 14.12.2001

(33) US

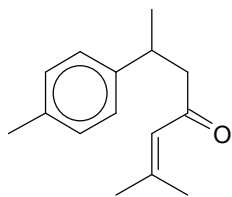
(72) РЕЙ МАДХУР, ПАЛ РАГХВЕНДРА, СІНГХ
САТІАВАН, КХАННА НАНДУ МАЛ(73) КАУНСІЛ ОФ САЙЄНТІФІК ЕНД ІНДАСТРІАЛ
РІСЕРЧ

(56) US 4 842 859 A, 27.06.1989

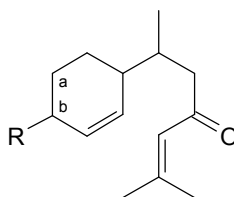
WO 01 30335 A, 03.05.2001

EP 0 440 885 A, 14.08.1991

WO 02 074295 A, 26.09.2002

AMMON ET AL: "PHARMACOLOGY OF CURCUMA
LONGA" PLANTA MEDICA, THIEME, STUTTGART,
DE, vol. 57, 1991, pages 1-7SRIVASTAVA K. C.: "EXTRACTS FROM TWO
FREQUENTLY CONSUMED SPICES - CUMIN
(CUMINUM CYMINUM) AND TURMERIC
(CURCUMA LONGA) - INHIBIT PLATELET
AGGREGATION AND ALTER EICOSANOID
BIOSYNTHESIS IN HUMAN BLOOD PLATELETS"
PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES AND
ESSENTIAL FATTY ACIDS, CHURCHILL
LIVINGSTONE MEDICAL JOURNALS., GB, vol. 37,
1989, pages 57-64(57) 1. Композиція, одержана з розчинного
ліпідного екстракту кореневищ видів Curcuma
сімейства Zingiberaceae, для лікування
нейроцереброваскулярних порушень, що містить
фракцію А, яка складається з ar-d-турмерону
формули 1

(1)

і α - та β -турмерону формули 2, в якій в α -
турмероні R=CH₃, а в β -турмероні R=CH₂,

(2),

необов'язково разом з фракцією В, що
складається з куркумену і зингіберину, і фракцією
С, що складається з гермакрону, куркумерону,
зедоарону, зедоарондіолу, ізоzedoарондіолу,
куркуменону і курлону, і/або фармацевтично
прийнятні домішки.2. Композиція за п. 1, в якій видом Curcuma є
Curcuma domestica Valet.3. Композиція за п. 1, в якій співвідношення
фракції А, фракції В і фракції С складає 1-3:1-3:1-
3.4. Композиція за п. 1, для якої домішки вибирають
з групи, що складається з мелатоніну,
антиоксидантів, антагоністів кальцієвих каналів,
тканинного активатора плазміногена (t-PA) і
агентів, що стабілізують клітинні мембрани.5. Композиція за п. 1, причому вказана композиція
інгібує надпродукцію синтази оксиду азоту (NOS),
запобігає перевантаженню нейронів кальцієм і
поглинає вільні радикали.

(13) C2

(11) 82057

(19) UA

6. Композиція за п. 1, причому для вказаної композиції цереброваскулярні порушення вибирають з групи, що складається з ішемії, удару, розладу після удару, крововиливу, реперфузійного ураження, тромбозу, звуження кровеносних судин, індукованого оксидом азоту окислювального ураження вільними радикалами, інфаркту, запалення і хвороби Альцгеймера.

7. Композиція за п. 1, в якій фракція А композиції є найбільш ефективною.

8. Композиція за п. 1, де вказані порушення лікують, використовуючи вказану композицію у формі різних систем доставки, вибраних з групи, що складається з таблеток, капсул, супозиторіїв, кульок і аерозолів.

9. Спосіб лікування нейроцереброваскулярних порушень у тварин, включаючи людину, здійснюють, використовуючи композицію за п. 1, введенням терапевтично ефективної кількості розчинного ліпідного екстракту.

10. Спосіб за п. 9, де вказаний спосіб включає інгібування надпродукції синтази оксиду азоту, запобігання накопиченню кальцію в нейронах і видалення вільних радикалів.

11. Спосіб за п. 9, в якому цереброваскулярні порушення вибирають з групи, що включає ішемію, удар, розлад після удару, крововилив, реперфузійне ушкодження, тромбоз, звуження кровеносних судин, індукване оксидом азоту окислювальне ушкодження вільними радикалами, інфаркт, запалення і хворобу Альцгеймера.

12. Спосіб за п. 9, в якому фракція А композиції є найбільш ефективною.

13. Спосіб за п. 9, в якому вказані захворювання лікують, використовуючи вказану композицію у формі різних систем доставки, вибраних з групи, що складається з таблеток, капсул, супозиторіїв, кульок і аерозолів.

14. Спосіб лікування ішемії у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п. 1, де вказаний спосіб включає стадію введення її терапевтично ефективної кількості суб'єкту.

15. Спосіб за п. 14, де вказаний спосіб сприяє лікуванню тяжкої ішемії головного мозку.

16. Спосіб за п. 14, в якому ефективна кількість складає 10-1000 мг/день за схемою розділеної загальної дози.

17. Спосіб за п. 14, в якому вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревний і пероральний.

18. Спосіб за п. 14, де вказаний спосіб запобігає перевантаженню мітохондрій іонами кальцію.

19. Спосіб за п. 14, в якому фракція А є найбільш ефективною.

20. Спосіб лікування удару у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п. 1, що включає стадію введення її терапевтично ефективної кількості суб'єкту.

21. Спосіб за п. 20, в якому удари вибирають з групи, що включає тромботичний, емболічний і осередковий удар.

22. Спосіб за п. 20, в якому ефективна кількість складає 10-1000 мг/день за схемою розділеної загальної дози.

23. Спосіб за п. 20, в якому вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревний і пероральний.

24. Спосіб за п. 20, в якому фракція А є найбільш ефективною.

25. Спосіб лікування крововиливу у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п. 1, що включає стадію введення її терапевтично ефективної кількості суб'єкту.

26. Спосіб за п. 25, в якому ефективна кількість складає 10-500 мг/день за схемою розділеної загальної дози.

27. Спосіб за п. 25, в якому вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревний і пероральний.

28. Спосіб за п. 25, в якому фракція А є найбільш ефективною.

29. Спосіб лікування тромбозу у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п. 1, що включає стадію введення її терапевтично ефективної кількості суб'єкту.

30. Спосіб за п. 29, в якому тромбоз вибирають з групи, що включає церебральний, коронарний тромбоз і тромбоз глибоких вен.

31. Спосіб за п. 29, в якому ефективна кількість складає 10-1000 мг/день за схемою розділеної загальної дози.
32. Спосіб за п. 29, в якому вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревний і пероральний.
33. Спосіб за п. 29, де вказаний спосіб зменшує тромб на одну чверть.
34. Спосіб за п. 29, в якому фракція А є найбільш ефективною.
35. Спосіб лікування артеріальної гіпертонії у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п. 1, що включає стадію введення її терапевтично ефективної кількості суб'єкту.
36. Спосіб за п. 35, в якому ефективна кількість складає 10-1000 мг/день за схемою розділеної загальної дози.
37. Спосіб за п. 35, в якому вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревний і пероральний.
38. Спосіб за п. 35, причому вказаний спосіб знижує кров'яний тиск приблизно на 40 %.
39. Спосіб за п. 35, причому вказаний спосіб підтримує кров'яний тиск нормальним.
40. Спосіб за п. 35, в якому фракція А є найбільш ефективною.
41. Спосіб лікування звуження кровоносних судин у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п. 1, що включає стадію введення її терапевтично ефективної кількості суб'єкту.
42. Спосіб за п. 41, в якому ефективна кількість складає 10-1000 мг/день за схемою розділеної загальної дози.
43. Спосіб за п. 41, в якому вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревний і пероральний.
44. Спосіб за п. 41, в якому фракція А є найбільш ефективною.

45. Спосіб лікування індукованого супероксидом і оксидом азоту окислювального ураження вільними радикалами у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п. 1, що включає стадію введення її терапевтично ефективної кількості суб'єкту.
46. Спосіб за п. 45, де вказаний спосіб підвищує рівень ферментів, що поглинають кисень, включаючи супероксиддисмутазу (SOD) і каталазу.
47. Спосіб за п. 45, де вказаний спосіб знижує рівень реакційноздатної тіобарбітурової кислоти (TBARS).
48. Спосіб за п. 45, в якому ефективна кількість складає 10-1000 мг/день за схемою розділеної загальної дози.
49. Спосіб за п. 45, в якому вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревний і пероральний.
50. Спосіб за п. 45, в якому фракція А є найбільш ефективною.
51. Спосіб лікування набряку у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п. 1, що включає стадію введення її терапевтично ефективної кількості суб'єкту.
52. Спосіб за п. 51, вказаний спосіб включає лікування різних типів набряку, вибраних з групи, що включає набряк мозку і набряк легень.
53. Спосіб за п. 51, в якому ефективна кількість складає 10-1000 мг/день за схемою розділеної загальної дози.
54. Спосіб за п. 51, в якому вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревний і пероральний.
55. Спосіб за п. 51, при якому фракція А є найбільш ефективною.

Даний винахід відноситься до способу одержання розчинного ліпідного екстракту, названого куркумова олія, з високим виходом з кореневищ і листя видів сімейства zingiberaceae

(імбирних), зокрема видів Curcuma, а також до застосування вказаної олії, її компонентів і нових похідних вказаних компонентів частин для лікування нейроцереброваскулярних порушень.

Нейроцереброваскулярні захворювання, такі як цереброваскулярний інфаркт, удар, ішемічні приступи і так далі, відбуваються внаслідок порушення кровопостачання внаслідок патологічного процесу в артерії, яка несе кров в мозок.

З трьох основних типів порушення мозкового кровообігу, внутрішньомозковий крововилив відбувається внаслідок розриву кровоносної судини з кровотечею в мозок (внутрішньомозковий крововилив) або під його покривну оболонку, тоді як тромбоз судин головного мозку є результатом закупорення кровоносної судини головного мозку при утворенні згустку крові в стінках.

Згусток може бути результатом аномального згущення крові, ушкодження стінки судини при артеріосклерозі, атеросклерозі, запаленні артерій або запаленні вен.

Коли кровопостачання припиняється повністю або знижується нижче, ніж на одну чверть його нормального рівня, відбувається розм'якшення мозку (інфаркт головного мозку), що спричиняє довготривале ураження мозку.

Емболія судин головного мозку являє собою закупорення церебральної артерії згустком крові або чужорідним тілом, що мігрував з іншого відділу кровообігу організму, таким як згусток, який утворюється на внутрішній стінці однієї з артерій на шиї, пересувається аж до мозку і блокує гілку основної артерії.

Скороминуці порушення мозкового кровообігу (TIAs) є короткими виявами симптомів, викликаних тимчасовим припиненням кровопостачання. Оборотні ішемічні неврологічні порушення (RINDs) являють собою невеликий інфаркт головного мозку. Множинний інфаркт головного мозку може приводити до довготривалої сплутаності свідомості і втрати пам'яті. Ішемічний інсульт є медичною надзвичайною обставиною. Після виникнення TIAs або інсульту, лікування може бути хірургічним або медикаментозним. У деяких випадках може виявитись необхідним хірургічне втручання для ліквідації будь-якого порушення прохідності кровоносних судин, що є в мозку.

Медикаментозне лікування може попереджати утворення згустків крові на атеросклеротичних бляшках в стінці судини. Звичайно набухання мозку супроводжує інфаркт мозку або крововилив в мозок. Не існує жодної задовільної терапії.

В наш час лікарські засоби, що використовуються при периферичних судинних і церебральних порушеннях, включають алкалоїди ріжків, аспірин, антикоагулянти і так далі. Останні використовують після інсульту, щоб, крім того, запобігти випадкам цереброваскулярного порушення, але їх застосування виявляється протипоказаним, якщо удар відбувається внаслідок крововиливу.

Застосування тиклопідину, високоефективного антитромбоцитарного засобу для лікування випадків інсульту, є обмеженим по тривалості застосування через його шкідливі побічні ефекти. Тканинний активатор плазміногену (t-PA), що використовується для обробки згустків в коронарних артеріях (гострий серцевий приступ), є природною розчинюючою згустки речовиною, що

утворюється в організмі, яка може знищувати згусток крові в мозку, що є причиною гострого ішемічного мозкового порушення, характерного для удару. У той час як t-PA може розчиняти згусток крові, який викликає закупорення кровоносної судини, існують інші ускладнення, які мають місце під час ішемічного інсульту, які потрібно усувати, коли необхідно запобігти тривалому мозковому порушенню. Надто важливо, щоб в кровотоці були присутніми "поглиначі" оксиду азоту (NO) і супероксиду, коли t-PA вводять, щоб знизити ушкоджуючу дію вільних радикалів, яка буде відбуватись, якщо кровотік обмежений і навіть більш того коли кровотік відновлений.

Оксид азоту (NO) і супероксиди викликають ушкодження важливих біомолекул і їх підвищена продукція залучена до розвитку захворювань у людини, таких як церебро-, кардіоваскулярні запалення, неврологічні дисфункції і рак і так далі. [Onoda M., Inano H., Nitric oxide: Biology and Chemistry, 4, (5), SOS-515 (2000)].

Більшість інсультів кульмінують в центральній області загибелі клітин (утворення інфаркту), а кровотік виявляється настільки значно зниженим, що клітини звичайно не можуть відновлюватись. Клітини мозку гинуть внаслідок дії: кальцій-активованих протеаз (ферменти, які деградують клітинні білки), ліпаз (ферменти, які переварюють клітинні мембрани) і вільних радикалів, які утворюються внаслідок ішемічного каскаду. За відсутності нейропротекторних засобів, нервові клітини можуть безповоротно ушкоджуватись протягом декількох хвилин. Будь-яке порушення кровотоку в мозку спричиняє масивне ураження вільними радикалами, яке індукує значну частину реперфузійного ушкодження клітин мозку, типові інсульти. Коли переривають кровотік і згодом відновлюють (реперфузують), тканини вивільняють залізо, яке діє як каталізатор для утворення вільних радикалів, які часто надовго ушкоджують клітини мозку. Тому захист клітин мозку від ушкодження, викликаного порушенням кровотоку, має важливе значення. Коли відбувається ішемічний інсульт, то пропонують застосування великих кількостей антиоксидантів, таких як мелатонін, вітаміни і рослини, такі як Ginkgo biloba, щоб забезпечити певний успіх. Магній в пероральній дозі 1500мг являє собою безпечну харчову домішку для зниження артеріального спазму, який являє собою загальну проблему при тромботичних ударах.

Древня індійська медична система - Аюрведа (Ayurveda) націлена на попередження, діагностику і лікування захворювання. Слово "захворювання", правильний переклад нездоров'я, розглядають як порушення функції цілого організму і відносять до циркуляції і трансформації тканинних рідин, поширених по всьому організму.

Більшість з лікарських аюрведичних засобів є добре відомими продуктами, які надають дію при ряді порушень функцій в організмі, включаючи різні органи, і призначаються для попередження проблем або відновлення нормального стану і є спробою вилікувати пацієнта повністю. Розроблені протягом тривалого періоду часу і

експериментування, вказані засоби є результатом особливої комбінації певних фундаментальних елементів, які визначають їх властивості, які, в свою чергу, є відповідальними за хімічні, біологічні і терапевтичні ефекти таких речовин. Не існує жодних речовин, якщо правильно приготовані, які не можна було б застосовувати як лікарський засіб.

Аюрведа описує ряд сприятливих ефектів кореневищ і листя різних видів, що належать до сімейства імбирних, особливо видів *Curcuma longa* L. syn. *Curcuma domestica* Valetton, кореневищ і листя, відомих в народі як куркума або Haladi. З числа вказаних видів відомі види володіють антибактеріальною, протигрибковою, такою, що загоює рани, і протизапальною дією, що дає можливість використати куркумні пасти як домашній засіб для лікування ран і запалення.

В останні роки було встановлено, що її компоненти куркумін та інші куркуміноїди, крім згаданої активності, виявляють холеретичну, жовчогінну, антиоксидантну, протиракову дію, здійснюють інгібування біосинтезу лейкотриєну, 5-ліпоксигенази, циклооксигенази, перокислення ліпідів і поглинають супероксид і оксид азоту (NO).

Turmeric, рослина в індійській системі медицини Аюрведа, що користується хорошою репутацією, являє собою кореневище *Curcuma longa* L. Syn. *Curcuma domestica* Valetton (сімейство Zingiberaceae), яке росте у великій кількості в Індії. Її давно використовують як пряність і забарвлюючий засіб в харчовій промисловості, а також як лікарський засіб.

Основний компонент - Куркумін, був виявлений як протизапальний засіб [Srimal R.C., Khanna N.M., Dhawan B.N., Ind J. Pharmacol., 3, 10 (1971)]. Інші терапевтичні властивості куркуміну, різних куркуміноїдів і деяких інших компонентів виду *Curcuma* включають антибактеріальну, протигрибкову дію [Schraufstatter F., Brent H., Nature, 164, 456 (1949), Arch. Dermatol. u. Syphilis, 188, 250 (1949); Lutomski. J., Kedzia B., Debska W., Planta Med, 26, 9 (1974); Rao B.G.N., Joseph P., Reichst., Aromen Koerperflegem, 21, 405-406 (1971); Swada T., Yamahara J., Shimazu S., Ohta T., Shoyakugaku Zasshi, 2, 11-16 (191), Prasad C.R., Sirsi M., J. Sci. Ind. Res., C.15, 239-41 (1957); Schraufstatter E., Deutsch. S.Z. Naturforsch. 4, 276, (1949); Chopra R.N., Gupta J.C., Chopra G.S., Ind. J. Med. Res., 29, 769-72 (1941)], антиоксидантну дію [Ramaswamy T.S., Banerjee B.N., Ann. Biochem. Exp. Med., 8, 55, (1948); Chipault J. R., Mizuno G.R., Lundberg W.O., Food Res., 10, 209 (1956)]; інгібування перокислення ліпідів [Sharma S.C., Mukhtar H., Sharma S.K., Krishnamurty C.R., Biochem. Biopharmacol., 21, 1210-14 (1972); Zu S., Tang X. Lin Y., Zhongguoyev., 22, 264-5 (1991); Sharma O.P., Biochem. Biopharmacol. 25, 1811 (1976)]; поглинання видів активного кисню і попередження підвищеного утворення вільних радикалів куркуміном в організмі [Tennesen H.N., Inter. J. Pharmacol., 50, 67-69 (1989), Kunchandy E., Rao M.N. A., Inter. J. Pharmacol., 58, 237, (1990)]; інгібіторну активність відносно індукції iNOS ліпополісахаридом в молочній залозі і активність куркуміну, що усуває NO-радикали, [Onoda M.,

Inano H., Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 4, 505-515 (2000)], протизапальну дію [Arora R.B., Basu N., Kapoor V., Jain A., Proc. Second Indo Soviet Symposium on Natural Products, New Delhi, 1970, p.170., Ind. J. Med. Res., 59, 10 (1971); Mukhopadhyaya A, Basu N., Ghatak N., Singh K.P., Gujral P.D., Proc. Int. Union of Physiol. Sci., 11, 241, (1974); Ghatak N.N., Basu N., Ind. J. Exp. Biol, 10, 235 (1972), Chandra D., Gupta S.S., Ind. J. Med. Res., 60, 138-142 (1972)]; протиракова дія [Soudamini K.K., Kuttan R., J. Ethnopharmacol. 27, 227 (1989); Kuttan R. Bhanumatty P., Nirmala K., George M.C., Cancer Lett., 29, 197 (1985)]; антиоксидантну і протипухлинну стимуляцію, яка індукує апоптоз у лейкозних клітинах людини [Rao M.L., Huang T.S., Lin J.K., Biochem. Biophysic. Acta, 1817, 98-100 (1996)], інгібування клітинного зростання в культурі клітин яєчників китайського хом'яка і цитотоксичність відносно лімфоцитів і клітин лімфоми Дальтона (Dalton), [Cancer Lett. (Ireland), 29, 197 (1985) через Chem. Abstr. 104, 61654^d (1986)], пухлино-захищаючу активність при шкірному онкогенезі у миші, індуквану 7,12-диметилбенз(а)антраценом [Kyoto-Furiton Doigaku Zasshi, 96, 725 (1987) через Chem. Abstr. 107, 211555^a (1987)], інгібування HIV-(BIL)-протеази [Suz Luz, Craik C.S., Oritz T., Montanello P.R., Proc. 205, ACS National Meeting, Denver, Colorado, 28 March-2 april Amer. Chem. Soc. Med. Chem. Div. (1993), Take Y., Inoyya H., Nakamura S., Alauddin H.S., Kuba A., J. Antibiot, 42, 107-118 (1989)], інгібування ліпоксигенази, циклогенази [Tennesen H.N., Int. J. Pharmacol., 50, 67 (1989), інгібування агрегації тромбоцитів, індукваної АДФ-епінефрином і колагеном [Srivastava R., Puri V., Srimal R.C., Dhawn B.N.; Arznei Forsch., 36, 715-717 (1986)]; захист проти тромботичної проблеми [Srivastava R., Dixit M., Srimal R.C., Dhawan B.N., Thromb. Res., 40, 413-17 (1985)]; зниження співвідношення загальний холестерин/фосфоліпіди у гіперліпемічних щурів і підвищення співвідношення HDL-холестерин і загальний холестерин [Ind. J. Physiol. Pharmacol., 32, 299 (1988)]; антикоагулянтну активність [Chem. Pharm. Bull., 33, 1499 (1985)]; інгібування агрегації тромбоцитів, метаболічних порушень і гіперліпемії [Lin Y., патент США 4842849; Chem. Abstr., III, 160200 (1984); Khanna N.M., Sarin J.P.S., Singh S., Pal R., Seth R.K., Nitya Nand S., патент Індії 162441 (1984)]; що робить його корисним для попередження кардіоваскулярних порушень, таких як ішемічні серцеві приступи, інфаркт міокарда і так далі. В Індокитайському регіоні екстракти *Curcuma* застосовують при родах через їх антикоагулянтну дію. Етил-п-метоксицинамат, виділений з ефірної олії кореневищ *Curcuma*, виявляє протигрибкову активність [Herba Hung., 28, 95 (1989) через Chem. Abstr. III, 191496J (1989)], тоді як фураногерменон і (4S,5S)(+)-гермакрон-4,5-епоксид, також виділений з ефірної олії кореневищ *Curcuma*, виявляє протизапальну дію і надає профілактичну дію проти стресового покриття виразками [Yakugaku Zasshi, 106, 1137 (1986), Chem Abstr. 106, 95935c (1987); Zhongyao Tungbto, 10, 134 (1983), Chem. Abstr. 103, 115886d (1985)]. Інша відома рослина з

сімейства Zingiberaceae, Zingiber officinale Rosch, надає дію, що запобігає серцевому приступу або удару [Srivastava K.C., Prostaglandins Leukotrienes and Medicines, 13, 227-235 (1964)].

Аспекти даного винаходу

Головним аспектом даного винаходу є застосування розчинного в ліпідах екстракту з кореневищ і листя виду *Curcuma*, який належить до сімейства zingiberaceae, для лікування нейроцереброваскулярного порушення.

Інший аспект даного винаходу полягає в розробці способу для одержання розчинного ліпідного екстракту з високим виходом з кореневищ і листя виду *Curcuma*, який належить до сімейства zingiberaceae.

Наступним об'єктом даного винаходу є виділення індивідуальних компонентів з куркумової олії.

Ще одним аспектом даного винаходу є створення аналогів вказаних компонентів куркумової олії.

Іншим аспектом даного винаходу є визначення нейроцереброваскулярних порушень за допомогою вказаних аналогів.

Наступний аспект даного винаходу полягає в ідентифікації активних компонентів у вигляді *Curcuma* для лікування нейроцереброваскулярних порушень.

Інший аспект даного винаходу полягає у застосуванні активних компонентів виду *Curcuma* для лікування ішемії.

Ще одним аспектом даного винаходу є застосування активних компонентів виду *Curcuma* для лікування інсульту.

Наступний аспект даного винаходу полягає в застосуванні активних компонентів виду *Curcuma* для лікування крововиливів.

Іншим аспектом даного винаходу є застосування активних компонентів виду *Curcuma* для лікування тромбозів.

Даний винахід стосується способу одержання розчинного ліпідного екстракту, названого куркумова олія, з високим виходом. Джерелом вказаної олії є кореневища і листя видів сімейства zingiberaceae. Особливим видом вказаного сімейства, що використовується для одержання вказаної олії, є вид *Curcuma*. Вказану олію застосовують для лікування нейроцереброваскулярних порушень. Розроблені нові аналоги компонентів вказаної олії, а також виявлено, що аналоги можна застосовувати для лікування нейроцереброваскулярного порушення.

Таким чином, даний винахід стосується поліпшеного способу одержання високого виходу розчинного ліпідного екстракту, названого куркумова олія, і його компонентів з кореневищ і листя видів сімейства Zingiberaceae, зокрема виду *Curcuma*.

Композицію, одержану з розчинного ліпідного екстракту кореневищ і листя виду *Curcuma* сімейства Zingiberaceae, використовують для лікування нейроцереброваскулярних порушень, вказана композиція містить фракцію А, що складається з аг-турмерону формули 1, і турмерону формули 2, і/або разом з фракцією В, що складається з куркумену і зингіберину, і/або

фракцію С, що складається з гермакрону, куркумерону, зедарону, седарондіолу, ізозедарондіолу, куркумену і курлону, і/або фармацевтично прийнятні домішки.

У наступному аспекті даного винаходу видом *Curcuma* є *Curcuma domestica* Valet.

У наступному аспекті даного винаходу співвідношення фракції А, фракції В і фракції С складає 1-3:1-3:1-3.

У ще одному аспекті даного винаходу домішки вибирають з групи, що складається з мелатоніну, антиоксидантів, антагоністів кальцієвих каналів, тканинного активатора плазміногену (t-PA) і засобів, що стабілізують клітинні мембрани.

В іншому аспекті даного винаходу вказана композиція інгібує надпродукцію синтази оксиду азоту (NOS), запобігає переважанню нейронів кальцієм і поглинає вільні радикали.

У наступному аспекті даного винаходу цереброваскулярні порушення для лікування вказаною композицією вибирають з групи, що складається з ішемії, удару, розладу після удару, крововиливу, реперфузійного ушкодження, тромбозу, звуження кровоносних судин, індукованого оксидом азоту окислювального ураження вільними радикалами, інфаркту, запалення і хвороби Альцгеймера.

У ще одному аспекті даного винаходу фракція А композиції є найбільш ефективною.

В іншому аспекті даного винаходу вказані порушення лікують, використовуючи вказану композицію, яка є формою різних систем доставки, вибраною з групи, що складається з таблеток, капсул, супозиторіїв, гранул і аерозолів.

Наступний аспект даного винаходу стосується поліпшеного способу одержання високого виходу розчинного ліпідного екстракту і його складових фракцій, що включає фракцію А, яка складається з аг-турмерону формули 1 і турмерону формули 2, фракцію В, що складається з куркумену і зингіберину, і фракцію С, що складається з гермакрону, куркумерону, зедарону, седарондіолу, ізозедарондіолу, куркумену і курлону, з кореневищ і листя виду *Curcuma* сімейства Zingiberaceae, вказаний спосіб включає стадії:

приготування порошку кореневищ і листя виду *Curcuma* у вигляді дрібних частинок,

екстрагування вказаного порошку полярним органічним розчинником при постійному перемішуванні або обробці ультразвуком протягом 24 годин при кімнатній температурі,

повторення стадії (b) від двох до п'яти разів, видалення розчинника перегонкою при зниженому тиску і при температурі приблизно нижче 45°C, щоб одержати залишковий концентрат,

розтирання в порошок залишкового концентрату з неполярними розчинниками,

видалення розчинника перегонкою при зниженому тиску і температурі нижче 45°C,

одержання вказаного розчинного ліпідного екстракту,

фракціонування вказаного екстракту методом колонкової хроматографії,

одержання фракції А, фракції В і фракції С, і

подальшого фракціонування кожної з фракцій А, В і С з використанням ВЕРХ або ГРХ, щоб одержати вказані компоненти.

У наступному аспекті даного винаходу фракціонування екстракту проводять на колонці з силікагелем.

В іншому аспекті даного винаходу полярний розчинник вибирають з групи, що складається з спирту і ацетону.

У ще одному аспекті даного винаходу неполярний розчинник вибирають з групи, що складається з петролейного ефіру і толуолу.

В одному аспекті даного винаходу фракціонування екстракту проводять, послідовно використовуючи н-гексан, суміш н-гексан:етилацетат у співвідношенні 95:5 і етилацетат.

В іншому аспекті даного винаходу фракція А складає приблизно 75% вказаних екстрактів.

У ще одному аспекті даного винаходу агтурмерон складає 95% фракції А.

У наступному аспекті даного винаходу тиск коливається між 7 і 11 мм Нг.

В іншому аспекті даного винаходу концентрація екстракту складає приблизно 6%.

У ще одному аспекті даного винаходу спосіб лікування нейроцереброваскулярних порушень у тварин, включаючи людину, із застосуванням композиції за п. 1 включає введення терапевтично ефективної кількості розчинного ліпідного екстракту.

У наступному аспекті даного винаходу вказаний спосіб викликає інгібування надпродукції синтази оксиду азоту (NOS), запобігання перевантаженню кальцієм нейронів і видалення вільних радикалів.

У ще одному аспекті даного винаходу цереброваскулярні порушення вибирають з групи, що складається з ішемії, удару, розладу після удару, крововиливу, реперфузійного ушкодження, тромбозу, звуження кровоносних судин, індукованого оксидом азоту окислювального ураження вільними радикалами, інфаркту, запалення і хвороби Альцгеймера.

В іншому аспекті даного винаходу фракція А композиції є найбільш ефективною.

В одному аспекті даного винаходу вказані захворювання лікують; використовуючи вказану композицію, яка є формою різних систем доставки, вибраною з групи, що складається з таблеток, капсул, супозиторіїв, гранул і аерозолів.

У наступному аспекті даного винаходу пропонують дві нових сполуки формули 3 і 4.

У ще одному аспекті даного винаходу пропонують спосіб лікування ішемії у тварин, включаючи людину, із застосуванням композицій за п.1, вказаний спосіб включає стадію введення терапевтично ефективної кількості суб'єкту.

В іншому аспекті даного винаходу вказаний спосіб сприяє лікуванню важкої ішемії мозку.

У наступному аспекті даного винаходу ефективна кількість коливається в діапазоні 10-1000мг/день за схемою застосування розділеної загальної дози засобу.

В іншому аспекті даного винаходу вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревинний і пероральний.

У ще одному аспекті даного винаходу вказаний спосіб запобігає перевантаженню мітохондрій іонами кальцію.

В іншому аспекті даного винаходу фракція А є найбільш ефективною.

В одному аспекті даного винаходу пропонують спосіб лікування інсульту у тварин, включаючи людину, з використанням композиції за п.1, вказаний спосіб включає стадію введення терапевтично ефективної кількості суб'єкту.

У ще одному аспекті даного винаходу інсульти, які лікують, вибирають з групи, що складається з тромботичного, емболічного і осередкового інсульту.

У ще одному аспекті даного винаходу ефективна кількість коливається в діапазоні між 10 і 1000мг/день за схемою застосування розділеної загальної дози засобу.

В іншому аспекті даного винаходу вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревинний і пероральний.

У наступному аспекті даного винаходу фракція А є найбільш ефективною.

В одному аспекті даного винаходу пропонують спосіб лікування крововиливу у тварин, включаючи людину, із застосуванням композиції за п.1, вказаний спосіб - включає стадію введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості.

У ще одному аспекті даного винаходу ефективна кількість коливається в діапазоні 10-500мг/день за схемою застосування розділеної загальної дози.

У наступному аспекті даного винаходу вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревинний і пероральний.

У ще одному аспекті даного винаходу фракція А є найбільш ефективною.

В іншому аспекті даного винаходу пропонують спосіб лікування тромбозу у тварин, включаючи людину, із застосуванням композиції за п.1, вказаний спосіб включає стадію введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості.

В одному аспекті даного винаходу тромбоз вибирають з групи, що складається з церебрального, коронарного тромбозу і тромбозу глибоких вен.

У наступному аспекті даного винаходу ефективна кількість коливається в діапазоні 10-1000мг/день за схемою застосування розділеної загальної дози.

У ще одному аспекті даного винаходу вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревинний і пероральний.

В іншому аспекті даного винаходу вказаний спосіб зменшує тромб на одну чверть.

У ще одному аспекті даного винаходу фракція А є найбільш ефективною.

В одному аспекті даного винаходу пропонують спосіб лікування артеріальної гіпертонії у тварин, включаючи людину, із застосуванням композиції за п.1, вказаний спосіб включає стадію введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості.

У наступному аспекті даного винаходу ефективна кількість коливається в діапазоні 10-1000мг/день за схемою застосування розділеної загальної дози.

У ще одному аспекті даного винаходу вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревинний і пероральний.

У ще одному аспекті даного винаходу за допомогою вказаного способу знижують кров'яний тиск приблизно на 40%.

У наступному аспекті даного винаходу вказаний спосіб підтримує кров'яний тиск нормальним.

У ще одному аспекті даного винаходу фракція А є найбільш ефективною.

В іншому аспекті даного винаходу пропонують спосіб лікування звуження кровоносних судин у тварин, включаючи людину, із застосуванням композиції за п.1, вказаний спосіб включає стадію введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості.

У наступному аспекті даного винаходу ефективна кількість коливається в діапазоні 10-1000мг/день за схемою застосування розділеної загальної дози.

В одному аспекті даного винаходу вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревинний і пероральний.

У ще одному аспекті даного винаходу фракція А є найбільш ефективною.

У наступному аспекті даного винаходу пропонують спосіб лікування індукованого оксидом азоту окислювального ураження вільними радикалами у тварин, включаючи людину, із застосуванням композиції за п.1, вказаний спосіб включає стадію введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості.

В іншому аспекті даного винаходу вказаний спосіб збільшує рівень поглинаючих кисень ферментів, включаючи супероксиддисмутазу (SOD) і каталазу.

В одному аспекті даного винаходу вказаний спосіб знижує рівень реакційноздатної тіобарбітурової кислоти (TBARS).

У ще одному аспекті даного винаходу ефективна кількість коливається в діапазоні 10-1000мг/день за схемою застосування розділеної загальної дози засобу.

В одному аспекті даного винаходу вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревинний і пероральний.

В іншому аспекті даного винаходу фракція А є найбільш ефективною.

У наступному аспекті даного винаходу пропонують спосіб лікування набряку у тварин, включаючи людину, із застосуванням композиції за п.1, вказаний спосіб включає стадію введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості.

У ще одному аспекті даного винаходу вказаний спосіб включає лікування різних типів набряку, вибраного з групи, що складається з набряку мозку і набряку легень.

У ще одному аспекті даного винаходу ефективна кількість коливається в діапазоні 10-1000мг/день за схемою застосування розділеної загальної дози.

В одному аспекті даного винаходу вказану композицію вводять різними способами, включаючи внутрішньочеревинний і пероральний.

В іншому аспекті даного винаходу фракція А є найбільш ефективною.

В аспекті даного винаходу одержують порошок сухих кореневищ і листя у вигляді дрібних частинок.

В одному аспекті даного винаходу проводять перколяцію вказаного порошку органічним розчинником при кімнатній температурі.

У ще одному аспекті даного винаходу у час перколяції безперервно проводять перемішування вмісту.

В іншому аспекті даного винаходу проводять видалення вказаного органічного розчинника перегонкою при зниженому тиску і при температурі нижче 45°C.

У наступному аспекті даного винаходу повторюють згадані вище стадії перколяції, принаймні, 4-8 разів.

В одному аспекті даного винаходу одержують куркумову олію у вигляді оранжево-жовтої запавної рідини з виходом 5-8%.

У ще одному аспекті даного винаходу розділяють вказану олію на її компоненти, використовуючи такі способи, як хроматографія і перегонка у високому вакуумі.

У ще одному аспекті даного винаходу вигляд *Curcuma* вибирають з групи, що складається з *Curcuma longa* L.Syn. *Curcuma domestica* Valetton і *Curcuma aromatica* Salisb.

В іншому аспекті даного винаходу органічний розчинник являє собою неполярний органічний розчинник, вибраний з групи, що складається з петролейного ефіру і толуолу.

У наступному аспекті даного винаходу органічний розчинник являє собою полярний органічний розчинник, вибраний з групи, що складається з етанолу і пропанолу.

У ще одному аспекті даного винаходу неполярні органічні розчинники дають більш високий вихід у порівнянні з полярними органічними розчинниками.

У ще одному аспекті даного винаходу залишковий концентрат з екстракту, одержаного з полярним органічним розчинником, екстрагують неполярним органічним розчинником.

В одному аспекті даного винаходу куркумову олію розділяють на її індивідуальні компоненти, що містять α -d-турмерон (формула 1), турмерони α і β (формула 2), зингіберин, куркумен, гермакрон, куркуменон і курлон.

У наступному аспекті даного винаходу вигляд хроматографії вибирають з групи, що включає колонкову хроматографію, переважно високоефективну рідинну хроматографію і газорідинну хроматографію.

У ще одному аспекті даного винаходу адсорбент для хроматографії вибирають з групи, що включає оксид алюмінію і силікагель.

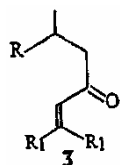
У ще одному аспекті даного винаходу елюювання вказаних компонентів проводять органічним розчинником, вибраним з групи, що складається з н-гексану, етилацетату і суміші н-

гексану і етилацетату у варіюючих співвідношеннях.

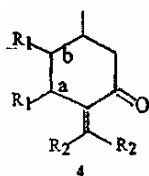
В іншому аспекті даного винаходу, молекулярна маса індивідуальних компонентів куркумової олії, розділених методом хроматографії, складає для турмеронів (α -, β -) - мол. мас. 218, для α -d-турмерону - мол. мас. 216, зингіберину - мол. мас. 204 і куркумену - мол. мас. 202.

У ще одному аспекті даного винаходу час утримання індивідуальних компонентів куркумової олії, розділених методом хроматографії, складає для турмеронів (α -, β -) час утримання 9'-04", α -d-турмерону - час утримання 8'-08", зингіберину - час утримання 5'-04" і куркумену - час утримання 4'-24".

Нова сполука формули 3, аналог сполук, що містять α -d-турмерон, турмерон і гермакрон, в якій R являє собою групу алкілу, алкенілу, циклоалкану, фенілу, циклоалкену або циклоалкадієну із замісниками, такими як алкіл або алкоксигалоген, у фенільному, циклоалкеновому і циклоалкадієновому кільцях або гетероарил, подібний піридилу, азотвмісний гетероциклічний амін і заміщені аміни, а R¹ являє собою групу алкілу або ариалкілу.



Нова сполука формули 4, аналог сполук, що включають прокуркуменол, зедоарондіол і куркуменон.



CHR₁-CHR₁ = феніл, заміщений феніл або

= a b Δ, H,

R₂ = H, або cdΔ,

R₃ = нижчий алкіл C₁₋₃

Фармацевтична композиція придатна для лікування

нейроцереброваскулярних порушень, вказана композиція містить ефективну кількість розчинного ліпідного екстракту, названого куркумова олія, з кореневищ і листя видів рослин сімейства Zingiberaceae, зокрема виду *Curcuma*, або як такого, або його індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним, або споріднені сполуки, що включають мелатонін і тканинний активатор плазміногену (t-PA), можливо асоційовані з фармацевтично прийнятними домішками.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування, ослаблення, контролю і попередження захворювань і станів, пов'язаних зі збільшенням

продукуванням оксиду азоту (NO), ушкодження внаслідок запалення, підвищеного надходження кальцію і окислювального ураження вільними радикалами важливих біомолекул.

У ще одному аспекті даного винаходу домішку вибирають з групи, що складається з харчових домішок, що містять білки, вуглеводнів, цукру, тальку, стеарату магнію, целюлози, карбонату кальцію, пасти крохмаль-желатин і/або фармацевтично прийняттого носія, наповнювача, розріджувача або розчинника.

У наступному аспекті даного винаходу композицію вводять перорально, роблять інгаляцію або імплантують.

В іншому аспекті даного винаходу, фізичною формою вказаної композиції для перорального способу є капсула, таблетка, сироп, концентрат, порошок, гранула, аерозоль або кульки.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію вводять в дозі, яка коливається від 5 до 5000 мг/день.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію використовують для лікування тварин або людини.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування артеріальної гіпертонії.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування набряку мозку і набряку легені, які супроводжують інфаркт головного мозку та інфаркт міокарда.

В іншому аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування реперфузійного ушкодження.

В одному аспекті даного винаходу композицію використовують для лікування цереброваскулярних захворювань, включаючи інсульти і скороминуші ішемічні порушення мозкового кровообігу.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування всіх типів інсультів, включаючи тромботичний, емболічний, осередковий і рецидивуючий інсульт.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування субарахноїдального і внутрішньомозкового крововиливу.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування неврологічних дисфункцій.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування тромбозу, включаючи церебральний, коронарний тромбоз і тромбоз глибоких вен.

В іншому аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування раку.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування хвороби Альцгеймера і ран.

В іншому аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування синдрому придбаного імунodefіциту.

В одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування мігрені.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію також вводять у разі рецидивуючих станів.

Спосіб лікування у суб'єкта станів нейроцереброваскулярних порушень, вказаний спосіб, включає введення суб'єкту ефективної кількості розчинного ліпідного екстракту, названого куркумова олія, з кореневищ і листя рослин видів сімейства Zingiberaceae, зокрема виду *Curcuma*, або як такого або його індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним, або споріднених сполук, що включає мелатонін, і ткінинного активатора плазміногену (t-PA), можливо асоційованих з фармацевтично прийнятними домішками.

У ще одному аспекті даного винаходу спосіб застосовують для лікування тварин або людини.

В одному аспекті даного винаходу домішки вибирають з групи, що складається з харчових домішок, які містять білки, вуглеводнів, цукру, тальку, стеарату магнію, целюлози, карбонату кальцію, крохмаль-желатинової пасти і/або фармацевтично прийнятного носія, наповнювача, розріджувача або розчинника.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію вводять перорально, роблять інгаляцію або імплантують.

У ще одному аспекті даного винаходу фізичною формою вказаної композиції для перорального способу є капсула, таблетка, сироп, концентрат, порошок, гранула, аерозоль або кульки.

В іншому аспекті даного винаходу композицію вводять в дозах в діапазоні від 5 до 5000мг/день.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування артеріальної гіпертонії.

У наступному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування набряку мозку і набряку легені, які супроводжують інфаркт головного мозку та інфаркт міокарда.

В одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування розладу після удару.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування реперфузійного ушкодження.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування цереброваскулярних захворювань, що включають удари і скороминущі ішемічні порушення мозкового кровообігу.

В іншому аспекті даного винаходу композицію використовують для лікування всіх типів ударів, включаючи тромботичний, емболічний, осередковий і рецидивуючий.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування субарахноїдального і внутрішньомозкового крововиливу.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування неврологічних дисфункцій.

У наступному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування тромбозу, включаючи церебральний, коронарний тромбоз і тромбоз глибоких вен.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування рака.

В іншому аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування хвороби Альцгеймера і ран.

У ще одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування синдрому придбаного імунodefіциту.

В одному аспекті даного винаходу композицію застосовують для лікування мігрені.

В іншому аспекті даного винаходу композицію, крім того, вводять у випадку рецидивуючих станів.

В аспекті даного винаходу одержують/приготовляють терапевтично ефективні лікарські засоби з екстрактів кореневищ і листя виду *Curcuma*, який належить до сімейства Zingiberaceae.

В іншому аспекті даного винаходу одержують розчинний ліпідний екстракт/фракцію з *Curcuma longa* L. syn *Curcuma domestica* Valetton, широко відомі як куркума довга або Haldi.

В іншому аспекті даного винаходу фармацевтично прийнятні препарати/системи доставки, такі як таблетки, капсули, супозиторії, кульки, аерозолі і так далі, застосовують для лікування і попередження захворювань людини, в які залучені підвищена продукція оксиду азоту (NO) і окислювальне ураження вільними радикалами.

У наступному аспекті даного винаходу такими захворюваннями є нейроцереброваскулярні порушення, такі як скороминущі порушення мозкового кровообігу (ішемічні, емболічні, осередкові, рецидивуючі і так далі), тромбоз (церебральний, коронарний, глибоких вен), інфаркт, інсульт (тромботичний, емболічний, осередковий), хвороба Альцгеймера, запалення, неврологічні дисфункції, рани, канцерогенез, прогресія пухлин і так далі.

В іншому аспекті даного винаходу супероксид-і оксид азот-(NO)-видаляюча властивість розчинного ліпідного екстракту/фракції кореневищ виду *Curcuma* (сімейство: Zingiberaceae), особливо *Curcuma longa* L. Syn. *Curcuma domestica* Valetton, надалі названого куркумова олія, як такого або його різних компонентів окремо або в комбінації один з одним робить його терапевтично ефективним при контролі за різними дегенеративними захворюваннями, точніше лікарський засіб, який є "поглиначем" оксиду азоту (NO) і супероксиду, з протизапальною активністю для боротьби з набряком мозку і легені/набухання, який супроводжує інфаркт мозку та інфаркт міокарда.

В іншому аспекті даного винаходу, маючи на увазі описані біологічні показники і слідує цілісному уявленню Аюрведи відносно захворювань людини, було виявлено, що розчинний ліпідний екстракт/речовина кореневищ і листя виду *Curcuma* (сімейство Zingiberaceae), в подальшому названий куркумова олія і одержаний з кореневищ і листя *Curcuma longa* L. Syn. *Curcuma domestica* Valetton, як такий або його основні активні компоненти, α -d-турмерон (формула 1), турмерони (α -, β -, формула 2) або окремо або в комбінації один з одним і з іншими

мінорними складовими частинами є істотно корисним і володіє сильнодіючою активністю, таким, що поглинає оксид азоту (NO) і вільні радикали/супероксид.

В іншому аспекті даного винаходу, вказаний розчинний ліпідний екстракт виявляє/володіє сильною поглинаючою вільні радикали/антиоксидантною активністю, яка дає можливість йому запобігти мітохондріальному ушкодженню, захищаючи мішень, і вони інгібують надпродукцію синтази оксиду азоту (NOS), уникаючи ушкодження, обумовленого запаленням, і знижує надходження кальцію так, що в результаті не відбувається перевантаження нейронів кальцієм.

У наступному аспекті даного винаходу, відмічена інша важлива перевага, яка полягає в тому, що якщо є будь-яке порушення прохідності, то на згадані вище три параметри, які є головною причиною реперфузійного ушкодження, впливають за допомогою вказаних лікарських засобів і додаткових засобів від "Circle of Willis", які сприяють кровотоку і, тим самим, дають можливість лікарському засобу досягнути ділянки ушкодження.

У наступному аспекті даного винаходу, випадки, коли має місце важка ішемія мозку, введення куркумової олії або як такої або її індивідуальних компонентів, таких як ar-d-турмерон, турмерони і так далі, окремо або в комбінації один з одним з і без інших споріднених сполук типу формули 3 або 4 і/або інших терапевтично ефективних засобів, таких як мелатонін, інші антиоксиданти, антагоністи кальцієвих каналів, тканинний активатор плазміногену (t-PA) і засоби, що стабілізують клітинну мембрану, може забезпечити ефективний захист проти церебрального і навіть коронарного ураження.

В іншому аспекті даного винаходу, оскільки удар є однією з головних причин смертності серед пацієнтів з артеріальною гіпертонією, також підкреслюють важливість куркумової олії або як такої або її індивідуальних компонентів або окремо або в комбінації один з одним як ефективного гіпотензивного лікарського засобу з антиоксидантною і нейропротективною активністю.

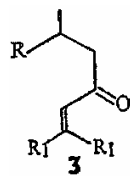
У наступному аспекті даного винаходу, розчинний ліпідний екстракт кореневищ і листя видів *Curcuma* сімейства *zingiberaceae*, особливо *Curcuma longa* L. syn. *Curcuma domestica* Valeton, в подальшому названий куркумова олія, яка є блідо-жовтою - оранжево-жовтою запашною маслянистою рідиною, головними компонентами якої є: ar-d-турмерон (формула 1), турмерони (α -, β -, формула 2) [Tap Chi Hoa Hic: 25, 18 (1987); Chem. Abstr. 108, 137682^s (1988)] крім інших компонентів в мікрокількостях, таких як зингіберин, куркумен, курлон, куркулон, курзенон, α -, β -куркуменоліди, куркуменон, курдіон, гермакрон, ліналоол, камфор, борнеол, зингіберол і так далі [Essenze Deriv. Agrum, 54, 117 (1984); Chem. Abstr., 103, 128791^w (1985)] інгібує підвищену продукцію оксиду азоту (NO) і є «поглиначем»/антиоксидантом, який може проникати через гематоенцефалічний бар'єр і

забезпечує ефективний терапевтичний захист внаслідок впливу на індуковане оксидом азоту (NO) і супероксид/вільними радикалами нейрональне ушкодження/ураження при захворюваннях людини, таких як нейроцереброваскулярні дисфункції, всі типи ударів, тромбоз (церебральний, коронарний, глибоких вен), інфаркт, запалення і неврологічні порушення, деякі типи рака, рани, хвороба Альцгеймера та інша індукована оксидом азоту нейротоксичність, гіпербаричний кисневий вплив і так далі.

В іншому аспекті даного винаходу описане одержання з високим виходом розчинного ліпідного екстракту з кореневищ і листя виду *Curcuma* (сімейство: *Zingiberaceae*), зокрема *Curcuma longa* L. syn. *Curcuma domestica* Valeton, в подальшому названого куркумова олія, і виділення його різних компонентів.

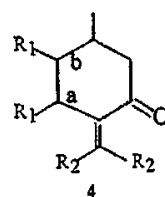
У наступному аспекті даного винаходу, даний винахід стосується активності, поглинання оксид азоту (NO) і супероксиду, і попередження будь-яких змін в динаміці церебрального кровотоку за допомогою куркумової олії самої або її компонентів окремо або в комбінації один з одним, що дає можливим їх застосування як лікарських засобів для лікування і попередження нейроцереброваскулярних порушень і споріднених і неспоріднених дисфункцій, таких як ішемічні приступи, всі типи ударів, тромбоз, інфаркт, мігрень, хвороба Альцгеймера, запалення і неврологічні дисфункції, канцерогенез, пухлинна прогресія, рани і навіть HIV/AIDS (ВІЛ/СНІД).

Нова сполука формули 3, аналог сполук, що містять ar-d-турмерон, турмерон і гермакрон, в яких R являє собою групу алкілу, алкенілу, циклоалкану, фенілу, циклоалкену або циклоалкадієну із замісниками, такими як алкіл або алкоксигалоген, у фенільному, циклоалкеновому, циклоалкадієновому кільцях, або гетероарил, подібний піридилу, азотовмісний, гетероциклічний амін і заміщені аміни,



а R1 являє собою групу алкілу або арилалкілу.

Нова сполука формули 4, аналог сполук, що включають прокуркуменол, зедоарондіол і куркуменон.



CHR₁-CHR₁ = феніл, заміщений феніл або = a b Δ, H,

$R_2 = H$, або $cd \Delta$,

$R_3 =$ нижчий алкіл C_{1-3}

На Фіг.1 продемонстроване запобігання інфаркту у щурів з фокальною ішемією після застосування куркумової олії;

на Фіг.2 показане повне запобігання пост-оклюзійного інфаркту в передньому мозку після застосування фракції А;

на Фіг.3 показане повне запобігання пост-оклюзійного інфаркту в передньому мозку після застосування фракції В;

на Фіг.4 показане надходження кальцію в мітохондрії (співвідношення 340/380);

на Фіг.5 показана зміна в рівнях SOD в мітохондріях після застосування фракції А і фракції В;

на Фіг.6 представлені рівні каталази в мітохондріях після застосування фракції А і фракції В;

на Фіг.7 представлені рівні малонового діальдегіду в мітохондріях після застосування фракції А;

на Фіг.8 показана зміна в процентах релаксації до NE-індукованого скорочення; і

на Фіг.9 показана зміна рівнів SNP в мітохондріях після застосування фракції А.

Один аспект даного винаходу забезпечує спосіб одержання розчинного ліпідного екстракту/фракції кореневищ і листя різних видів, що належить до сімейства Zingiberaceae, особливо куркумової олії з виду *Curcuma* з хорошим виходом за допомогою екстракції порошкоподібних кореневищ/листя *Curcuma longa* L. Syn. *Curcuma domestica* Valetton або *Curcuma aromatica* Salisb або *Curcuma zedoaria* Roxb. і так далі органічним розчинником, таким як спирт, ацетон, етилацетат і так далі, але переважно використання неполярного розчинника, такого як петролейний ефір або толуол, при постійному перемішуванні і видаленні розчинника з таких екстрактів перегонкою при зниженому тиску і температурі нижче 45°C.

В іншому аспекті даного винаходу демонструють, що у випадку екстракції полярним органічним розчинником, таким як етанол, залишковий спиртовий концентрат після видалення розчинника вичерпно екстрагують неполярним органічним розчинником, таким як петролейний ефір, толуол і так далі.

У наступному аспекті даного винаходу показано, що видалення перегонкою розчинника з таких екстрактів при зниженому тиску і температурі нижче 45°C дає блідо-жовту - оранжево-жовту запашну рідину з виходом від 5 до 6 процентів.

У ще одному аспекті даного винаходу показано, що фракціонування вказаної олії методом колонкової хроматографії на відповідному адсорбенті і елюювання відповідним органічним розчинником або за допомогою ВЕРХ або ГРХ або перегонкою у вакуумі дає індивідуальні компоненти, такі як α -d-турмерон (формула 1), турмерони (α -, β -, формула 2) у вигляді головних компонентів (близько 70 процентів, як визначено ГХ-МС), крім інших міnorних компонентів, таких як зингіберин,

куркумен, зедеорон, гермакрон, курлон, курдіон і так далі, всі були ідентифіковані за допомогою ГХ-МС і так далі.

У ще одному аспекті даного винаходу показано, що поліпшений спосіб одержання розчинного ліпідного екстракту/речовини кореневищ і листя різних видів сімейства Zingiberaceae, особливо видів *Curcuma*, таких як *Curcuma longa* L. Syn. *Curcuma domestica* Valetton або *Curcuma aromatica* Salisb і так далі з високим виходом за допомогою вичерпної екстракції тонкоподрібнених кореневищ і листя відповідним органічним розчинником при постійному поступовому перемішуванні або обробці ультразвуком при звичайній кімнатній температурі з подальшим видаленням розчинника з екстракту перегонкою при зниженому тиску і температурі нижче 45°C.

У ще одному аспекті даного винаходу органічний розчинник є неполярним органічним розчинником, таким як петролейний ефір, толуол і так далі.

У ще одному аспекті даного винаходу органічний розчинник являє собою полярний органічний розчинник, такий як етанол, пропанол і так далі.

В іншому аспекті даного винаходу залишковий концентрат після видалення розчинника з екстракту, одержаного з полярним органічним розчинником, вичерпно екстрагують неполярним органічним розчинником, таким як петролейний ефір, толуол і так далі.

У ще одному аспекті даного винаходу органічний розчинник видаляють з екстрактів перегонкою при зниженому тиску і температурі нижче 45°C.

У наступному аспекті даного винаходу постійне перемішування здійснюють ручним способом або за допомогою механічної мішалки або електричного мотора.

У ще одному аспекті даного винаходу розчинний ліпідний екстракт/речовину кореневищ або листя вказаних видів, який являє собою блідо-жовту - оранжево-жовту запашну маслянисту рідину, розділяють на його індивідуальні компоненти, такі як α -d-турмерон (формула 1), турмерони (α -, β -, формула 2), зингіберин, куркумен, гермакрон, куркуменон, курлон і так далі, методом хроматографії (колонка, ВЕРХ, ГРХ і так далі) або перегонкою у високому вакуумі.

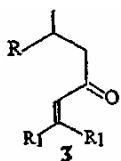
У наступному аспекті даного винаходу індивідуальні компоненти куркумової олії одержують методом колонкової хроматографії на відповідному адсорбенті, такому як оксид алюмінію, силікагель і так далі, і елююванням відповідними розчинниками, такими як *n*-гексан, суміш *n*-гексан: етилацетат (при варіюючих співвідношеннях), етилацетат і так далі.

В іншому аспекті даного винаходу індивідуальні компоненти куркумової олії одержують за допомогою ВЕРХ або ГРХ, наприклад турмерони (α -, β -) з мол. мас. 218, часом утримання 9'-04", α -d-турмерон (мол. мас. 216) з часом утримання 8'-08", зингіберин (мол. мас. 204) з часом утримання 5'-04", куркумен (мол. мас. 202) з часом утримання 4'-24".

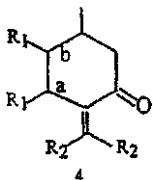
У ще одному аспекті даного винаходу індивідуальні компоненти куркумової олії, такі як α -d-турмерон (формула 1), турмерони (формула 2), зингіберин, куркумен, куркуменон, гермакрон і так далі, одержують при перегонці куркумової олії у вакуумі, наприклад α -d-турмерон, точка кипіння 155-160°C/9мм Hg через α -d-турмерон-збагачену фракцію, точка кипіння 140-160°C/10мм Hg, який складає близько 70% всієї куркумової олії.

У ще одному аспекті даного винаходу описують властивість поглинати оксид азоту (NO) або супероксид (властивість антиоксиданту) вказаного розчинного ліпідного екстракту як такого або його індивідуальних компонентів, таких як α -d-турмерон (Fig.1), турмерони (Fig.2), гермакрон, куркуменон, зингіберин, куркумен і так далі.

В іншому аспекті даного винаходу представляють сполуки формули 3, аналоги α -d-турмерону або турмерону, гермакрону і так далі, в яких R являє собою алкіл, алкеніл, циклоалкан, феніл, циклоалкен або циклоалкадієн із замісниками, такими як алкіл, алкоксигалоген і так далі у фенільному або циклоалкеновому або циклоалкадієновому кільцях, гетероарил, такий як піридил, азот, гетероциклічний амін або заміщений амін і так далі, а R1 = алкілу, арилалкілу і так далі, які поглинають оксид азоту (NO)/супероксид/вільні радикали, щоб боротися з/запобігати окислювальному ушкодженню оксидом азоту (NO)/супероксидом/вільними радикалами важливих біомолекул.



В одному аспекті даного винаходу описують сполуки типу формули 4 як аналоги прокуркуменуолу, зедоарондіолу, куркуменуолу і так далі - інших мікроелементів розчинного ліпідного екстракту виду Cursита, які включені в його молекулярну структуру, а видатні властивості молекул α -d-турмерону і турмерону (α -, β -) в жорсткій структурі роблять їх терапевтично ефективними лікарськими засобами для лікування і попередження всіх типів ударів, тромбозу, інфаркту, неврологічних дисфункцій і так далі.



CHR₁-CHR₁ = феніл, заміщений феніл або
= a b Δ , H,
R₂ = H, або cd Δ ,
R₃ = нижчий алкіл C₁₋₃

У ще одному аспекті винаходи зазначають, що терапевтично сприятливі ефекти куркумової олії як такої або її індивідуальних компонентів самостійно

або в комбінації один з одним або спорідненими сполуками ослабляють, коректують або попереджають захворювання у людини, при яких підвищена продукція оксиду азоту (NO) і окислювальне ушкодження вільними радикалами важливих біомолекул, залучена, наприклад, у всі типи удару (тромботичний, емболічний, осередковий, ішемічний), тромбоз (церебральний, коронарний, глибоких вен), інфаркт, неврологічні дисфункції і так далі.

В іншому аспекті даного винаходу описують спосіб лікування постінсультного розладу у ссавців, який включає введення суб'єкту за необхідності ефективної кількості куркумової олії або як такої або її індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним або спорідненими сполуками.

В одному аспекті даного винаходу представляють спосіб лікування пацієнтів з субарахноїдальним і внутрішньомозковим геморагічним ударом після 5-7 годин удару введенням суб'єкту терапевтично ефективної кількості куркумової олії або як такої (суцільна) або її індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним або спорідненими сполуками, за необхідності такого лікування.

В іншому аспекті даного винаходу представляють спосіб лікування репер фузійного ушкодження у ссавців, який включає введення суб'єкту, за необхідності, ефективної кількості куркумової олії (ціла - як така) або її індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним або спорідненими сполуками.

У ще одному аспекті даного винаходу представляють спосіб лікування цереброваскулярних захворювань, таких як всі типи інсульту (тромботичний, емболічний, осередковий, рецидивуючий), скороминуще порушення мозкового кровообігу і так далі, який включає введення суб'єкту, за необхідності, ефективної кількості куркумової олії (ціла - як така) або її індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним або спорідненими сполуками.

У ще одному аспекті даного винаходу представляють спосіб лікування ішемічних захворювань і попередження беззаставного утворення згустку крові, який включає введення суб'єкту, за необхідності, ефективної кількості куркумової олії (суцільна) або її індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним або спорідненими сполуками.

У ще одному аспекті даного винаходу представляють спосіб лікування артеріальної гіпертонії у ссавців, який включає введення суб'єкту/пацієнту, за необхідності, ефективної кількості куркумової олії (суцільна) або її індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним або спорідненими сполуками.

В іншому аспекті даного винаходу представляють спосіб боротьби з набряком мозку і набряком легені, які супроводжують інфаркт мозку і міокарда, введенням суб'єкту, за необхідності, лікарських засобів, таких як куркумова олія

(суцільна) або їх індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним або спорідненими сполуками, які є поглиначами оксиду азоту (NO) і супероксиду/вільних радикалів і виявляють протизапальну активність.

У ще одному аспекті даного винаходу описують терапевтично сприятливі ефекти розчинних ліпідних екстрактів SAID, або як таких або їх індивідуальних компонентів, таких як ar-d-турмерон, турмерони, гермакрон, зингіберин, куркумен, курлон і так далі, окремо або в комбінації один з одним у присутності або без терапевтично корисних засобів, таких як мелатонін, тканинний активатор плазміногену (t-PA), що вводяться перорально, парентерально (індивідуальні чисті компоненти) в будь-якій відповідній фармацевтично прийнятній системі доставки, такий як таблетки, капсули, кульки, супозиторії, аерозолі, імпланти і так далі в ефективній кількості (при ударі 10-500мг/день в розділених загальних дозах і при іншому нездужанні 10-1000мг/день в розділених загальних дозах), щоб забезпечити високоефективне лікування/вплив на захворювання людини, в розвиток яких залучена окислювальне ураження оксидом азоту (NO) і вільними радикалами, такими як всі типи інсультів, тромбоз, інфаркт і неврологічні дисфункції, і які також можуть мати терапевтичне застосування при певному типі рака, такому як лейкоз, при хворобі Альцгеймера, ранах і навіть ВІЛ/СНІДі.

Приклади

Наступні приклади широко ілюструють винахід, не обмежуючи жодним чином суть і сферу винаходу.

Приклад 1

У даному прикладі описують спосіб одержання куркумової олії і її компонентів з високим виходом і приготування її лікарських препаратів. Поліпшений спосіб екстракції куркумової олії і її компонентів з кореневищ *Curcuma longa* L. syn. *Curcuma domestica* Valetton або інших видів *Curcuma*.

У звичайному способі екстракції проводили три або чотири перколяції сухих порошкоподібних кореневищ *Curcuma* органічним розчинником, таким як петролейний ефір, толуол, спирт і так далі і здійснювали перегонку розчинника з перколятів. У випадку спиртових екстрактів, після видалення розчинника залишковий концентрат розтирали з неполярним органічним розчинником, таким як петролейний ефір, з подальшим видаленням розчинника перегонкою, щоб одержати куркумову олію з виходом 1-1,5 проценти.

Гаряча екстракція (Soxhlet) приводила до втрати ефірних летких компонентів. Коли вказані процедури замінювали на екстракцію сухих порошкоподібних кореневищ *Curcuma* відповідними органічними розчинниками, такими як петролейний ефір, ацетон, спирт і так далі, при постійному перемішуванні за допомогою механічної мішалки, що приводиться електричним мотором або в ручну, або перемішуванні на ультразвуковій установці з подальшим видаленням розчинника з екстрактів перегонкою при зниженому тиску і температурі нижче 45°C,

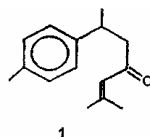
вихід і якість куркумової олії помітно підвищувались.

У звичайному способі, сухі дрібноподрібнені кореневища *Curcuma longa* L. (1кг) послідовно перколювали н-гексаном (3 літри) в перколяторі/посудині з неіржавіючої сталі або скла, забезпеченому відгалуженням поряд з дном, щоб спускати перколят, і зміст перемішували при повільному постійному перемішуванні середовища протягом 24 годин кожний раз за допомогою механічної мішалки, що приводиться електричним мотором. Стівав оранжево-жовтий перколят, а процедуру повторювали від чотирьох до п'яти разів. Розчинник відганяли з перколятів при зниженому тиску і температурі нижче 45°C, щоб одержати оранжево-жовту запашну рідину (51грам=виходу 5,1%).

Аналогічно, первинна екстракція дрібноподрібнених порошкоподібних кореневищ *Curcuma longa* L (1кг) ацетоном або спиртом (5х3 літри) при постійному перемішуванні протягом 24 годин кожний раз з подальшим видаленням розчинника з перколятів перегонкою при зниженому тиску і температурі нижче 45°C і вичерпне розтирання в порошок залишкового концентрату з н-гексаном або толуолом (6х500мл) з подальшим видаленням розчинника перегонкою при зниженому тиску і температурі нижче 45°C давали оранжево-жовту, запашну рідину (60г=виходу 6%).

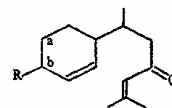
Колонкова хроматографія одержаної оранжево-жовтої, запашної рідини (20,0г) на колонці з силікагелем при використанні послідовно гексану, суміші н-гексан: етилацетат (у співвідношеннях, що змінюються) і етилацетату давала ar-d-турмерон (формула 1, 55%) і турмерони (α -, β -, формула 2, 20%) у вигляді головних компонентів (фракція А), за якими слідували куркумен (10%) і зингіберин (фракція В) та інші міnorні компоненти - гермакрон, куркумерон, зедоарон, зедоарондіол, ізодедоарондіол, куркуменон, курлон і так далі (фракція С), активність яких була нижчою.

Перегонка куркумової олії (20,0г) при зниженому тиску (140-160°C/9мм Hg) давала основну фракцію I (формула 1, 15,0г), збагачену ar-d-турмероном, разом з іншими турмеронами (α -, β -, формула 2) та іншими міnorними компонентами (4,2г, фракція II). Фракція I мала



1

ar-d-турмерон



2

α -турмерон, β i R=Me
 β -Турмерон, R=CH₂

індекс заломлення (n_D^{30}) 1,4990, питоме оптичне обернення (L)²⁵+19,6. Куркумову олію саму або її індивідуальні компоненти, одержані методом хроматографії або перегонкою у високому вакуумі, використовували окремо або в

комбінації один з одним і з іншими терапевтично ефективними сполуками і без них, щоб приготувати відповідні клінічно ефективні препарати.

Тверду лікарську форму можна одержувати мацерацією куркумової олії як такої або її індивідуальних компонентів окремо або в комбінації один з одним, зокрема α -, β -турмеронів з крохмалем і мікрокристалічною целюлозою у відповідних пропорціях в змішувачі доти, доки суміш не стане порошком з вільною текучістю, яким можна наповнювати капсули або перетворювати в таблетки згідно з терапевтично необхідними вимогами.

У звичайному прикладі, куркумову олію (10,0г) розчиняли в етанолі (100мл). Крохмаль (5,0г) і мікрокристалічну целюлозу (85,0г) додавали до одержаного розчину. Вміст енергійно перемішували, а розчинник видаляли висушуванням при температурі нижче 45°C. Одержаний продукт пропускали через сито 40-меш, щоб одержати вільно текучі гранули. Одержані гранули потім пресували в таблетки з відповідним вимогам дозуванням, наприклад, кожна таблетка, що важить 500мг, містила 50мг куркумової олії.

Приклад 2

Осередкова ішемія головного мозку

Самців щурів Sprague Dawley вагою 270-375г з Будинку тварин CDRI використали для даного дослідження. Щурів вміщували при світловому циклі 12 годин світло/темрява і давали воду за бажанням. Тварин не годували протягом ночі і анестезували пентобарбітоном натрію, 30мг/кг. Контролювали ректальну температуру. Скороминущу ішемію/реперфузію виконували, використовуючи внутрішньосудинне волокно, щоб перекрити середню мозкову артерію з одного боку [Longa Z.E., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R.; Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats: Stroke, 20, 84-91 (1989)] протягом 2 годин з подальшою реперфузією протягом подальших 36 годин. Тварин безвибірково формували в наступні групи, n=5 щурів (1) Контроль: Помилковооперовані, (2) Ішемічні/з поновленням протікання - жодного лікування. (3) Ішемічні/з поновленням протікання - лікована група: (i) куркумова олія (маса/мл, 0,86г), 683,65мг/кг, вводили внутрішньочеревинно і перорально. (ii) Фракція А (маса/мл, 0,88г), 569,56мг/кг, вводили внутрішньочеревинно і перорально. (iii) Фракція В (маса/мл, 0,91г), 938,86мг/кг, вводили внутрішньочеревинно і перорально. Тварин умертвлювали і мозок видаляли і швидко заморожували. З кожного мозку з ділянки вінцевого шва вирізали вісім зрізів товщиною 2мм і забарвлювали хлоридом 2,3,5-трифенілтетразолію при 37°C протягом 30 хвилин і потім фіксували формаліном. Кожний зріз мозку фотографували. Ділянку інфаркту в кожному зрізі оцінювали подвійним сліпим способом. Мозок щурів з груп (1, 2 і 3), n=3, видаляли і обробляли для визначення мітохондріального Ca^{2+} .

Експериментальний протокол

Виділення мітохондрій переднього мозку

Мітохондрії виділяли з переднього мозку щурів за способом Lai і Clark [Lai J.C.K., Clark J.P., Preparation of synaptic and non-synaptic mitochondria from mammalian brain: Method Enzymol., 55, 51-60 (1979)] з невеликими модифікаціями. Передній мозок щурів видаляли відразу після декапітації і завантажили в охолоджене льодом середовище для виділення або забуферений фосфатом фізіологічний розчин. Мозок подрібнювали і промивали, щоб видалити всі сліди крові. Тканину гомогенізували (10% мас/об.) у відповідному середовищі, використовуючи забезпечений мотором тefлоновий гомогенізатор і відразу центрифугували при 1800g протягом 10 хвилин. Супернатант зливали, а осад повторно гомогенізували і центрифугували при 1800g протягом 10 хвилин. Супернатанти після першого і другого центрифугування зливали разом і центрифугували при 17000g протягом 20 хвилин. Одержаний осад повторно суспендували в спеціальних середовищах і центрифугували при 17000g протягом 5 хвилин.

Визначення мітохондріального вмісту

Вміст кальцію в мітохондріях, виділених з переднього мозку, визначали за методом Zaidan E. і Sims N.R. [The calcium content of mitochondria from brain sub region following short term fore brain ischaemia and recirculation in the rat; J. Neurochem., 63, 1812-1819 (1994)] з невеликими модифікаціями. Стисло, мітохондрії (0,3мг білки) в сукцинатному середовищі насичували Fura-2AM (0-5мкМ) та інкубували протягом 30 хвилин при 37°C при постійному струшуванні. Потім мітохондрії двічі промивали в сукцинатному середовищі і повторно суспендували в тому ж самому середовищі.

Визначали співвідношення флуоресценції Fura-2 при довжині збудження 340 і 380нм з емісією при 510нм, використовуючи спектрофлуориметр Shimadzu RF 5000. Мітохондріальний кальцій ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) представляли у вигляді кривих співвідношення флуоресценції 340/380 [Macleod K.T. and Harding S.E.; Effect of phorbol ester in contraction, intracellular pH and intracellular Ca^{2+} in isolation mammalian ventricular myocytes. J. Physiol. (London), 444, 481-498 (1991)].

Результат: Як видно з Фіг.1 і 2 інфаркт у осередкового ішемічного щура з групи задалегідь лікованих тварин був повністю попереджений. У групі, в якій тваринам давали тестовану сполуку/засіб після закупорки середньої мозкової артерії, в шести з семи зрізів мозку спостерігали повне запобігання (Фіг.3), тоді як в одному зрізі близько 20% ділянки виділялось як інфарктне. У мітохондріях, виділених з переднього мозку тварин з помилковооперованої, ішемічної і лікованої тестованою сполукою групи (i) спостерігали рівні внутрішньоклітинного кальцію, близькі до норми (Фіг.4).

Приклад 3

Індукований колагеназою внутрішньомозковий крововилив

Дорослих самців щурів (250-350г) з Будинку тварин CDRI використали в наступних експериментах. Щурів анестезували

пентобарбітоном натрію (30мг/кг, внутрішньочеревинно) і вмішували в стереотаксичну рамку (для щурів, Narashige, Japan). Слідували способу Rosenberg et al's [Rosenberg G.A. Mun-Bryce S., Mary B.S. and Kornfeld M., Collagenase-Induced intracerebral hemorrhage in rats: *Stroke*, 21, 801-807 (1990)]. Проводили розріз на голові і голку 23-карибра імплантували в хвостате ядро і путамен (з координатами A5,8; L3,0; H1). (Стереотаксичний атлас мозку щура. Eds R. M. Elliot, Gardener Lindzey and Kenneth, MacCorquodale. Meredith Publishing Company, 1967). Щурам (n=10) вводили колагеназу (0,01ME в 2мкл фізіологічного розчину), а для симуляції 2мкл нормального фізіологічного розчину. Після інфузії, голку видаляли, а рану зшивали. Тварин залишали для відновлення після анестезії, утримували в теплому приміщенні і залишали доступ до їжі і води. Через вісімнадцять годин у тварин оцінювали неврологічне порушення за аномальним положенням тіла і геміплегії за Yamamoto et al., [Yamamoto A. Tamura, Kirino T., Shimizu M. and Sano K. Behavioral changes after focal cerebral ischaemia by left middle cerebral artery occlusion in rats. *Brai Research*, 452, 323-328, (1988)]. Пізніше щурів повторно анестезували пентобарбітоном натрію, 30мг/кг внутрішньочеревинно і видаляли мозок. Щурів формували безвибірково в три групи. Група 1 одержувала фізіологічний розчин. Оброблені колагеназою (0,01ME в 2мкл фізіологічного розчину) групи 2 і 3 одержували фракцію А (683,65мг/кг) через 5 і 7 годин після обробки колагеназою пероральним способом.

Антиоксидантне визначення

Мітохондрії виділяли, як описано у прикладі 2. Для антиоксидантних досліджень мітохондрії промивали і суспендували у фосфатному буфері. Для інших досліджень мітохондрії повторно суспендували в середовищі, що містить сахарозу 250мМ, KH_2PO_4 6мМ і суццинат 6мМ, рН 7,2. Процедуру виділення проводили при 4°C.

Антиоксиданти

Визначали ферменти, що поглинають кисень, супероксиддисмутазу (SOD), каталазу (CAT) і реакційноздатну тіобарбітурову кислоту, в мітохондріях, виділених з переднього мозку експериментальних тварин.

SOD: Активність SOD визначали за інгібуванням NADH, PMS, NBT і оптичної щільності, що реєструється при 560нм. Активність ферментів виражали в Од/хв/мг білка. [Nishikini M., Rao N.A., Yagi K., The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced PMS and molecular oxygen. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 46, 849-854 (1972)].

CAT: Активність CAT аналізували, реєструючи зміну поглинання в УФ H_2O_2 при 240нм за методом Aebi [Aebi H., In *Methods of Enzymatic Analysis* (Third edition) ed. H.U. Bergmeyer Academic Press, New York and London, Vol.2, pp.673-684, (1974)].

Реакційноздатна тіобарбітурова кислота (TBARS)

Рівні мітохондріальних TBARS вимірювали як показник малонового діальдегіду і отже, перокислення ліпідів за методом Okhawa et al.,

[Okhawa H., Ohishi N., Yagi K., Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction: *Anal. Biochem.*, 95, 351 (1979)] при 532нм. Функціональне порушення визначали за Bederson [Bederson J.B., Pitts, L.H. Tsiji M., Nishimura M.C., Davis R.L., Barkowisk H., Rat MCAO: Evaluation of model and development of a neurologic examination, *Stroke*, 17, 472 (1986)] і визначали вміст води. Показано, що обидва параметри значно знижувались у порівнянні з необробленою групою.

Визначення білка

Мітохондріальний білок визначали за методом Lowry et al., [Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr A.L., Randall K.J.; Protein measurement with folin phenol reagent: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)], використовуючи бичачий сироватковий альбумін (BSA) як стандарт.

Результати: Тестована сполука (фракція А), введена через 5 годин після обробки колагеназою, значно знижувала набряк. Неврологічне порушення при 5- і 7-годинній обробці реєстрували як міру 4 у необробленої групи і міру 0-2 у лікованої групи. Смертність в необробленій групі становила 3 з 5, а в лікованій групі - 1 з 5.

SOD: Величина SOD через 5 годин була майже нормальною, тоді як у випадку тестованої сполуки (фракція А), введеної через 7 годин після обробки колагеназою, рівні SOD збільшувались (Фіг.5).

Каталаза: Показано, що даний фермент присутній у мікрокількості в мозку (Фіг.6).

TEARS: Через 5 годин після колагеназної обробки, значення були близькі до значень у оброблених колагеназою тварин, тоді як через 7 годин значення значно знижувались у порівнянні з нормальною групою, вказуючи на антиоксидантну активність тестованої сполуки - фракції А (Фіг.7).

Мітохондрії виділяли як описано у прикладі 2.

Приклад 4

Дорослих самців щурів (250-350г) з Будинку тварин C.D.R.I. анестезували 30мг/кг пентобарбітоном натрію. Яремні вени щурів оголяли. По п'ять крапель 10% формаліну в 65% метанолі краплями наносили на вену. Щурів залишали на шість годин для утворення тромбів, які потім сортували в залежності від їх присутності або відсутності. [Blake O.K., Ashwin J.G., Jaques L.B., An assay for the antithrombotic activity of anticoagulants: *J. Clin. Pathol.*, 12, 118 (1959)]. Фракцію А (ar-d-турмерон і турмерони) вводили 200мкл внутрішньочеревинно/300г щура в групі, яку лікували, тоді як нелікована група (контроль) одержувала еквівалентну кількість фізіологічного розчину (внутрішньочеревинно).

Результат: Тромб у нелікованої групи тварин становив 2,8мг, а в лікованій тромб був 0,75мг, що вказує на збільшення на 373,33% в нелікованій групі у порівнянні з лікованою групою.

Приклад 5

У щурів викликали артеріальну гіпертензію за Goldblatt et al., [Goldblatt H., Lynch J., Hanezal R.F., Serville W.W.: Studies on experimental hypertension: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischaemia. *J. Exp. Med.*, 59, 347-379 (1934)]. Через вісім тижнів гіпертензивні щури мали середній кров'яний тиск

200мм/Нг. Після того як вводили внутрішньоперитонеально куркумову олію, 683,65мг/кг, кров'яний тиск знижувався до 115мм/Нг за 15хв. і залишався на такому рівні протягом більше 60хв.

Щури	Доза (в/п) (683,65мг/кг)	Кров'яний тиск (мм/Нг) (через 15хв)	Після введення куркумової олії (мм/Нг) (через 15хв)
Гіпертензивні		38,71	10,9
Нормотензивні		Не знижувався	10,9

Результати: Сполука значно знижує кров'яний тиск у гіпертензивних щурів і не знижує у нормотензивних щурів. Вона знижує кров'яний тиск без брадикардії внаслідок антагонізму до β -адренергічних рецепторів або рефлекторної тахікардії, властивої вазодилаторам [Nichols A.J., Gallai M., Ruffolo R.P., Jr. Studies on the mechanism of arterial vasodilation produced by the novel antihypertensive agent. Carvedilol. Fundam. Clin. Pharmacol., 5:25-38 (1991)].

Приклад 6

Черевну аорту готували до дослідження за Wolfgang et al., [Wolfgang Auch-Schwelk, Zvonimir S. Katusic and Paul M. Vanhoutte: contractions to oxygen derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rats., Hypertention, 13, 859-864 (1989)]. Спричиняли скорочення кілець аорти норепінефрином від 10^{-8} до 10^{-5} М. Стислі судини розслабляли ацетилхоліном або куркумовою олією, доданими ступінчастим способом. Ацетилхолін додавали в концентрації від 10^{-7} до 10^{-5} М. Куркумова олія спричиняла остаточне скорочення при 0,861мг в 8мл розчину (Фіг.8). Активатор протеїнкінази С, форбол-12-міристат-13-ацетат (PMA) (10^{-7} М) індукував скорочення інтактного і оголеного препарату аортальної смужки. Попередня обробка куркумовою олією, 0,881мг, повністю інгібувала індуковане PMA скорочення. Олія інгібує протеїнкіназу С [Kaczmarck L.K., The role of Protein Kinase C in regulation of ion channels and neurotransmitter release: Trends in Neurosciences, 10, 30-34 (1987); Jin-Moo Lee, Grabb M.C., Zipfel G.J., Choi D.W., J. Clin Invest., 106, (6), 723-731 (2000)].

Результат: Куркумова олія і ацетилхолін викликали повну релаксацію індукованого норепінефрином скорочення, демонструючи значний судинорозширювальний ефект.

Приклад 7

Оксид азоту вперше був охарактеризований в центральній нервовій системі при медіюванні внутрішньоклітинними месенджерами збільшення рівнів цГМФ, що супроводжує активацію глутаматних рецепторів (Garthwaite J, Charles S.L. and Chess-Williams R. Endothelium derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggest a role as intracellular messenger in the brain. Nature 336, 385-388 (1988). Одночасне утворення NO і супероксидних радикалів сприяє продукції продукту токсичної реакції пероксинітритного аніону (Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshal PA and Freeman BA). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitriye: implication for endothelial

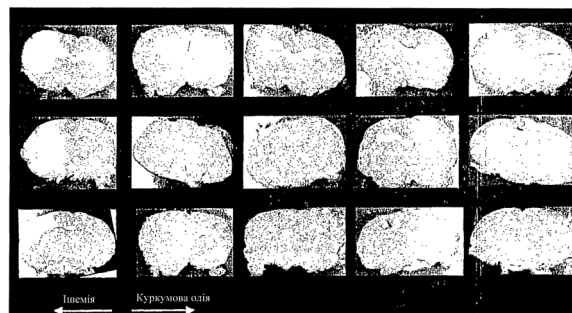
injury for nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1620 (1990). Тільки близько або всередині клітини пероксинітрит може ушкоджувати або виснажувати ряд життєво важливих компонентів, ДНК внаслідок розщеплення ланцюгів, ліпіді аконітатгідратазою перокислення ліпідів і доступність антиоксидантів (Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP and Salvemini D.

і injury for nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1620 (1990). Тільки близько або всередині клітини пероксинітрит може ушкоджувати або виснажувати ряд життєво важливих компонентів, ДНК внаслідок розщеплення ланцюгів, ліпіді аконітатгідратазою перокислення ліпідів і доступність антиоксидантів (Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP and Salvemini D.

Видалення оксиду азоту (NO) за допомогою тестованих сполук/агентів

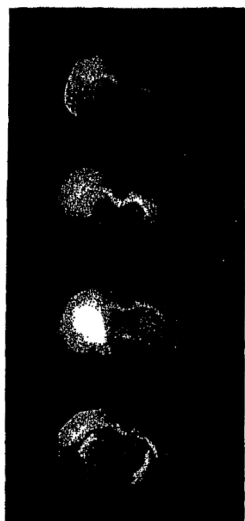
Нітропрусид натрію (SNP) утворює оксид азоту (NO) [Sreejayan and Rao M.N.A.: Nitric oxide scavenging by curcuminoids, J. Pharm. Pharmacol., 49, 105-107 (1997)]. Фракцію А, 86,14мг, змішували в забуференому фосфатому фізіологічному розчині з різними концентраціями SNP (5-40мМ). Реагент Грісса (Griess) змішували з тестованою сполукою (фракція-А) у співвідношенні 1:1. Оптичну щільність згаданого вище хромофорного буфера, утвореного SNP, тестованою сполукою (фракція-А) і реагентом Грісса, вимірювали при 546нм і порівнювали з оптичною щільністю стандартного розчину нітриту калію, обробленого таким же чином реагентом Грісса (Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Analysis of nitrate, nitrite and ^{15}N in biological fluids; Anal. Biochem. 126, 131, (1982). Marcocci L., Maguire J.J., Droy-Lefaix M.T., Packer L.: The nitric oxide scavenging property of Ginkgo biloba extract Egb 761, Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 748 (1994).

Результат: SNP утворює оксид азоту, а тестована сполука (фракція А) видаляє утворений таким чином оксид азоту. Результат показав, що тестована сполука (фракція А) при осередковій ішемії є "поглиначем" оксиду азоту (Фіг.9).



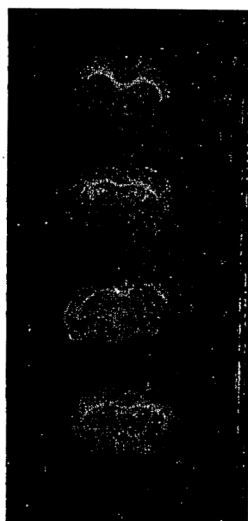
Фіг. 1

35



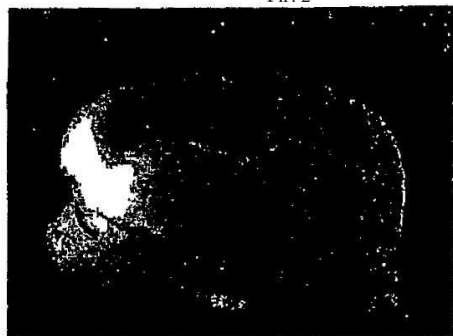
Ішемія

82057



Фракція А

Фіг. 2



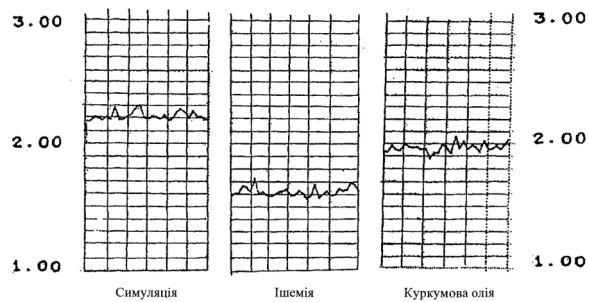
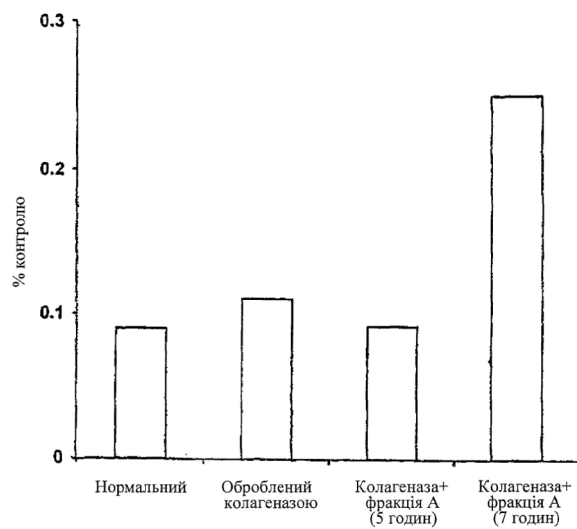
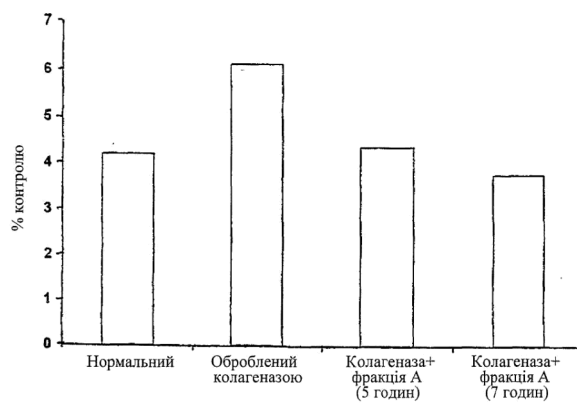
Ішемія



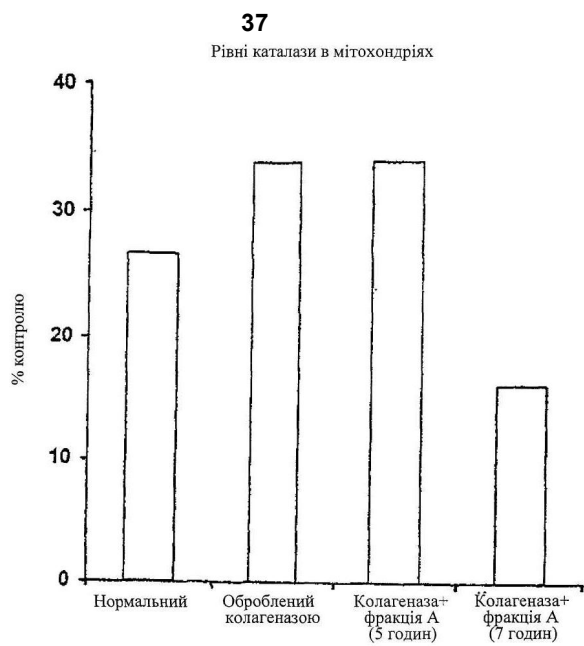
Фракція В

Фіг. 3

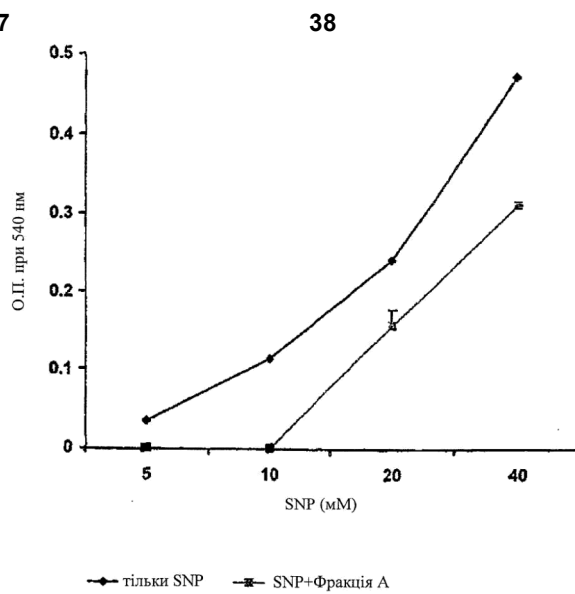
36

Фіг. 4
Рівні SOD в мітохондріяхФіг. 5
Рівні каталази в мітохондріях

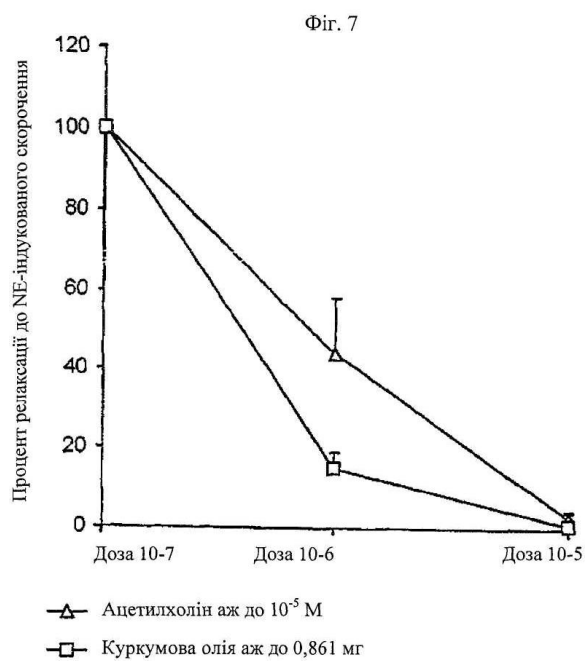
Фіг. 6



82057



Фиг. 9



Фиг. 8