



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102874** (13) **C2**  
(51) МПК

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61K 31/352** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2011 08565**  
(22) Дата подання заявки: **10.12.2009**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.08.2013**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **200810185559.0**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **11.12.2008**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **CN**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.08.2011, Бюл.№ 15**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.08.2013, Бюл.№ 16**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/CN2009/075456, 10.12.2009**

(72) Винахідник(и):  
**Ду Ганьхуа (CN),  
Ван Цзіньсюй (CN),  
У Сун (CN),  
Ши Ін (CN),  
Гао Мей (CN),  
Лі Інгуї (CN),  
Ці Янь (CN),  
Шень Дунмін (CN),  
Гуан Хунмей (CN),  
Лю Хайлі (CN),  
Лю Жуй (CN),  
Фен Сяолун (CN)**  
(73) Власник(и):  
**ЦСПЦ ЧЖУНЦІ ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
ТЕКНОЛОДЖІ (ШИЦЗЯЧЖУАН) КО., ЛТД.,  
No. 226 Huanghe Street, Shijiazhuang, Hebei  
050035, China (CN),  
ІНСТІТУТ ОФ МАТЕРІА МЕДІКА, ЧАЙНІЗ  
АКЕДЕМІ ОФ МЕДІКАЛ САЙЄНСІЗ,  
No. 1, Xian Nong Tan Street, Xuanwu District,  
Beijing 100050, China (CN)**  
(74) Представник:  
**Михайлюк Валентин Іванович, реєстр.  
№1**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
**CN 1695608 A 16.11.2005  
GAO MEI ET AL.: 'Acute neurovascular unit  
protective action of pinocembrin against  
permanent cerebral ischemia in rats.' J ASIAN  
NAT PROD RES. vol. 10, no. 5-6, May 2008**

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ РАЦЕМАТУ ПІНОЦЕМБРИНУ У ПРИГОТУВАННІ ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ УДАРУ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується застосування рацемату піноцембрину, рацемату солі піноцембрину, рацемату попередника піноцембрину або рацемату гідрату піноцембрину у виробництві лікарського препарату для профілактики та лікування удару, зокрема, гострого ішемічного удару.

**UA 102874 C2**



Дана заявка заявляє пріоритет китайської патентної заявки № 200810185559.0, поданої 11 грудня 2008 р., та яка має назву "Застосування піноцембрину у приготуванні лікарського препарату для лікування удару", розкриття якої включене в даний документ посиланням.

Галузь техніки

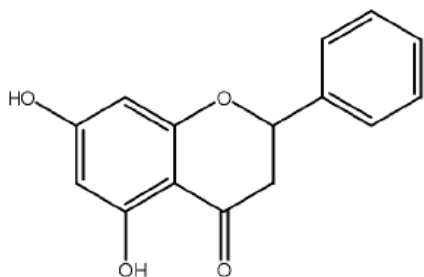
Даний винахід стосується застосування рацемату піноцембрину у приготуванні лікарського препарату для лікування та профілактики удару.

Передумови винаходу

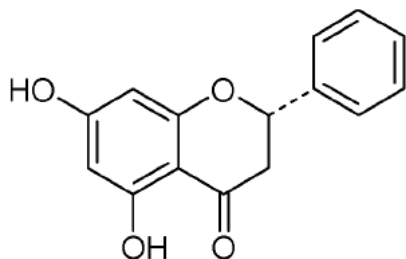
(S)-піноцембрин формули II, хімічна назва якого (S)-2,3-дигідро-5,7-дигідрокси-2-беніл-4H-1-бензопіран-4-кетон, представляє собою вид нерозчинного у воді флавонону та природну сполуку, екстраговану з прополісу. До того ж, ця сполука також знайдена в екстракті ряду рослин, таких як швейцарська п'ятихвойна сосна, листя евкаліпту та аравійська камедь.

З 1980-х років досліді в усьому світі виявили кілька фармакологічних активностей (S)-піноцембрину, включаючи антибіотичний, противірусний, антиоксидантний та протизапальний ефекти. Китайська академія медичних наук перша розкрила, що (S)-піноцембрин має функцію інгібування вазоконстрикції, викликані різними факторами, та захисту багатьох видів нервових клітин від ушкоджень. Деталі можна знайти в документі CN200410037860.9, який розкриває застосування (S)-піноцембрину у лікуванні ішемії головного мозку, наслідків ішемії головного мозку та хвороб, пов'язаних з ураженнями та функціональними змінами нервових клітин, та його механізм захисту ішемічної тканини мозку та нервових клітин головним чином інгібуванням кальпаїну, NO та CRP (C-реактивний білок) та активацією експресії білку теплового шоку у мозку. Загалом (S)-піноцембрин може лікувати церебральний інфаркт. До того ж, Rui Liu та ін. з Китайської академії медичних наук розкрили, що (S)-піноцембрин має функцію захисту нерву, ушкодженого внаслідок ішемічної реперфузії головного мозку або подібних ситуацій, шляхом випробування на ішемію, гіпоксію та апоптоз тканини мозку, викликаних моделлю ішемічної реперфузії мозку (Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both in vivo and in vitro. Brain Res. 2008 Jun 24;1216:104-15.).

Yonghao Cheng та ін. розкрили синтез рацемату піноцембрину (формула I) (Yonghao Cheng, Yabo Duan, Yan Qi etc., Synthesis of 5,7-dihydroxy-flavanone, Chemical Reagents. 2006, 28(7):437).



I



II

Відомо з рівня техніки, що рацемат не має безпосереднього або безперечного зв'язку з ефективністю. Загалом, їх зв'язок можна звести до наступних кількох ситуацій: рацемат має кращий ефект у порівнянні з енантіомерами; енантіомери мають еквівалентні або близькі активності; енантіомери мають активності різної сили; енантіомери мають протилежні активності; енантіомери мають активності різних типів. Далі ці пункти розкриваються наступними прикладами.

1. Енантіомери взаємно синергічні, тому рацемат має кращий ефект у порівнянні з енантіомерами.

Як агоніст  $\alpha$ -рецептора лівообертаючий ізомер добутаміну діє на  $\beta$ -рецептор слабо. Аналогічно, як агоніст  $\beta$ -рецептора правообертаючий ізомер добутаміну діє на  $\alpha$ -рецептор слабо. Введення рацемату буде мати ефект підвищення скоротності міокарду, але не прискорення частоти серцевих скорочень або підвищення тиску крові.

Оскільки це антигістамін, ефективність рацемату ізотипенділу при пероральному введенні в 1,4 рази вища ніж у (-)-ізомеру та в 2,5 рази вища ніж у (+)-ізомеру при пероральному введенні. Причиною вищої ефективності рацемату можливо є те, що один ізомер змінює абсорбцію іншого таким чином, що біологічна доступність останнього зростає, або те, що один ізомер пригнічує рівень метаболізму іншого так, що час дії останнього подовжується.

2. Енантіомери мають еквівалентні активності.

Прометазин як антигістамін має одну хіральну молекулу. Хоча його рецептори не мають селективності до енантіомерів лікарського препарату, два його енантіомери мають схожі фармакологічні дії та показують схожі сили фармакологічних активностей.

3. Енантіомери мають активності різної сили.

Пропранолол як антагоніст  $\beta$ -рецептора головним чином обумовлюється його лівообертальним ізомером, що проявляє антагоністичну активність, через те, що його лівообертальний ізомер має таку саму конфігурацію агоніста  $\beta$ -рецептора та може селективно зв'язуватись з  $\beta$ -рецептором, в той час коли його правообертальний ізомер не може.

В іншому критичному прикладі L-метилдопа в якості протигіпертонічного лікарського засобу має фармакологічні активності, в той час як D-метилдопа не має активності.

4. Енантіомери мають протилежні активності.

Стосовно Bay k8644, структурного аналога ніфедипіну, його правообертальний енантіомер є кальцієвим антагоністом, в той час коли його лівообертальний енантіомер є кальцієвим агоністом. Два енантіомери мають зовсім протилежні активності.

5. Енантіомери мають фармакологічні активності різних типів.

D-енантіомер пропоксифену має сильну анальгетичну активність, яка у 6 разів вище активності L-енантіомеру, але не має протикашльового ефекту. Напроти, L-енантіомер пропоксифену має сильний протикашльовий ефект (Medicinal Chemistry, edited by Wensheng Ji, Anliang Li, Higher Education Press: 25-26).

Крім того, з вищевказаних прикладів відомо, що відповідно до відомої фармакологічної активності (S)-піноцембрину, її неможливо визначити без випробувань, який з рацемату піноцембрину або (R)-піноцембрину має аналогічні (S)-піноцембрину фармакологічну активність та ефект. Наступні документи знаходяться в рівні техніки.

Xiaoming Zhu та ін. розкрили, що піноцембрин може розширювати судину грудної аорти ендотелій-залежним механізмом та ендотелій-незалежним механізмом (Zhu XM, Fang LH, Li YJ, Du GH. Endothelium-dependent та Endothelium-independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. *Vascul Pharmacol.* 2007; 46(3): 160).

Mei Gao та ін. розкрили, що піноцембрин може знижувати індуковане глутаматом ушкодження клітин та апоптоз, а також зменшувати можливість апоптозу, який забезпечує прояв нейрозахисної активності піноцембрину на його ефект проти ішемії головного мозку (Mei Gao, Wen-cui Zhang, Qing-shan Liu, Juan-juan Hu, Geng-tao Liu, Guan-hua Du. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-S Y5Y neuronal cells via bax/bcl-2 ratio decrease. *Eur J Pharmacol.* 2008, 591(1-3):73-9).

Mei Gao та ін. розкрили, що піноцембрин може захищати судини та нерви головного мозку від необоротної ішемії головного мозку у щурів (Acute neurovascular unit protective action of pinocembrin against permanent cerebral ischemia in rats. *J Asian Nat Prod Res.* 2008 May-Jun; 10(5-6): 551-8). Уперше була доказана захисна дія піноцембрину проти необоротної фокальної ішемії головного мозку. Цей механізм досі у стані дослідження.

Hongmei Guang та ін. отримали модель недостатнього кровопостачання мозку білатеральним перев'язуванням сонної артерії та визначенням когнітивної функції тестом водного лабіринту Моріса. Було розкрито, що піноцембрин міг призводити до зменшення когнітивної дисфункції у щурів, викликаній недостатнім кровопостачанням мозку, та його механізм полягав у тому, що піноцембрин може захищати структуру та функцію мітохондрії (Protections of pinocembrin on brain mitochondria contribute to cognitive improvement in chronic cerebral hypoperfused rats. *Eur J Pharmacol.* 2006 Aug 7; 542 (1-3): 77-83).

Вищезгадані документи розкривають в деякому обсязі фармакологічні активності піноцембрину, але обмежені дією розширення судин та нейроваскулярним захистом.

Відомо з рівня техніки, що гострий ішемічний удар головного мозку (ішемічна апоплексія головного мозку) має високу захворюваність, високу смертність та високий ступінь інвалідності. Зараз найбільш ефективним лікуванням є тромболізис. Чим раніше виконують тромболізис, тим кращий ефект лікування. Клінічний досвід багатьох минулих років показав, що лікування пацієнтів з ударом потребує швидкого реагування. Після того, як мозкову артерію блокують, клітини головного мозку в ішемічній зоні будуть швидко запускати каскадну електрохімічну ланцюгову реакцію та будуть продукувати надлишок вільних радикалів, активувати приток іонів кальцію, переважувати внутрішньоклітинними іонами кальцію та остаточно призводити до незворотного ушкодження у тканині мозку. Отже, час від приступу удару до початку лікування потрібно мінімізувати, наскільки це можливо.

В клінічній практиці ішемічний удар головного мозку можна поділити за наступними типами: надпочаткова стадія, в межах 6 годин від початку; початкова стадія, протягом 6-72 годин від початку; гостра більш пізня стадія, протягом 72 годин - 1 тижня після початку; стадія відновлення, 1 тиждень після початку. Під час надпочаткової стадії ішемічного удару інфаркт головного мозку ще не виникає. Якщо нормальне кровопостачання можна швидко відновити та шкідливі метаболіти в ішемічних тканинах можна видалити, пацієнти будуть мати гарну можливість відновитись повністю. Тому лікування на надпочатковій стадії буде найкращою можливістю та буде давати гарний результат. Аж до ранньої стадії ішемічного удару, стійка ішемія, гіпоксія та особливо ушкодження гематоенцефалічного бар'єру призводять до того, що, як правило, утворюються зони центрального інфаркту. Лікування на цій стадії втрачає частину терапевтичного значення у порівнянні з надпочатковою стадією лікування.

У 1996 р. рекомбінантний тканинний активатор плазміногену (tPA) пройшов клінічну валідацію FDA (Федеральне управління лікарськими засобами) та був схвалений для застосування в межах 3 годин після початку гострого ішемічного удару. Це єдиний лікарський препарат, який довів ефективність при лікуванні ішемічного удару. Обмежені терапевтичного інтервалом часу 95 % пацієнтів з гострим ударом за кордоном не можуть отримати своєчасного лікування тромболізисом, а в Китаї кількість пацієнтів, які отримують терапію тромболізисом, складає менш ніж 1 %.

Протягом останнього десятиріччя наукові пошуки нейропротекторних засобів стали критичною точкою в лікуванні удару. Але в 114 дослідках удару (передбачені до 49 нейропротекторних засобів) у світі кілька дослідів були доказані успішними. Це означає, що досі жоден нейропротекторний засіб не є безпечним та ефективним при лікуванні гострого ішемічного удару.

З вищевказаних аналізів можна побачити, що окрім tPA лікарські засоби для ефективного лікування удару досі потребують клінічної практики, та навіть tPA обмежений терапевтичним інтервалом часу лише 3 години.

Вміст даного винаходу

Експериментально даний винахід розкриває, що рацемат піноцембрину може бути використаний для лікування удару. Порівняно з (S)-піноцембрином рацемат піноцембрину має довший терапевтичний інтервал часу (приблизно 6 годин) та протягом довшого періоду часу після початку удару все ще буде мати терапевтичний ефект. Подовження терапевтичного інтервалу часу дає більше можливостей пацієнтам з ішемічним ударом. Експерименти на тваринах показують, що рацемат піноцембрину має значні терапевтичні ефекти.

Однією ціллю даного винаходу є забезпечення застосування рацемату піноцембрину, рацемату солі піноцембрину, рацемату попередника піноцембрину або рацемату гідрату піноцембрину у виробництві лікарського препарату для лікування удару.

Термінологія "рацемат" передбачає еквімолярну суміш хіральної молекули з оптичною активністю та її енантіомера, яку формують змішуванням еквівалентних кількостей двох молекул з протилежними обертаннями та еквівалентними обертальними силами так, що їх обертання нейтралізуються внаслідок їх внутрішньомолекулярної дії.

Сіль піноцембрину представляє собою фармацевтично прийнятну сіль піноцембрину, таку як гідрохлорид, сульфат, цитрат та інше.

Попередник піноцембрину представляє собою проліки піноцембрину, тобто сполуку, яка може здійснювати фармакологічні активності тільки після перетворення на піноцембрин шляхом перетворення *in vivo*.

Переважно, удар представляє собою гострий ішемічний удар.

Експериментально виявлено, що:

1) рацемат піноцембрину можна використовувати для лікування удару;

2) рацемат піноцембрину може покращувати зміни поведінки, викликані гострим ішемічним ударом;

3) рацемат піноцембрину може зменшувати зниження кровотоку мозку, викликане гострим ішемічним ударом;

4) рацемат піноцембрину може зменшувати об'єм інфаркту головного мозку, викликаного гострим ішемічним ударом;

5) рацемат піноцембрину може зменшувати набряк мозку, викликаний гострим ішемічним ударом;

6) рацемат піноцембрину може покращувати енергетичний метаболізм, викликаний гострим ішемічним ударом;

7) рацемат піноцембрину може зменшувати гостре запалення, викликане гострим ішемічним ударом;

8) рацемат піноцембрину може захищати нервові клітини від ушкодження, викликаного гострим ішемічним ударом.

Отже, даний винахід також стосується фармацевтичної композиції рацемату піноцембрину, яка містить рацемат піноцембрину, рацемат солі піноцембрину, рацемат попередника піноцембрину або рацемат гідрату піноцембрину та фармацевтично прийнятний наповнювач.

Композиція даного винаходу може бути придатною для перорального, крізьшкірного, м'язового, внутрішньовенного введення або введення в слизову.

Композиція даного винаходу може бути твердим або рідким препаратом, який можна приготувати загальноприйнятим способом.

Композиція даного винаходу може бути рідким препаратом, переважно ін'єкцією. Ін'єкцію готують інкапсуляцією рацемату піноцембрину з циклодекстрином або його похідними, а потім додають придатний наповнювач.

Даний винахід також забезпечує застосування (R)-піноцембрину, його солей, його попередників або його гідратів у виробництві лікарського препарату для лікування та профілактики удару, у якому удар представляє собою ішемічний удар або геморагічний удар.

Рацемат піноцембрину, який використовують в даному винаході, має перевагу низької токсичності та може бути застосованим для лікування гострого ішемічного удару.

Короткий опис графічних матеріалів

Фігура 1 показує ефекти рацемату піноцембрину на об'єм інфаркту.

Фігура 2 показує ефекти рацемату піноцембрину на експресію TNF- $\alpha$  (фактор некрозу пухлин), IL-1 $\beta$  (інтерлейкін-1 $\beta$ ), ICAM-1 (молекула міжклітинної адгезії 1), VCAM-1 (молекула адгезії судинного ендотелію 1 типу), iNOS (ген індукційної оксидсинтетики) та AQP-4 (аквапорин) в ішемічних тканинах головного мозку після MCAO (закупорювання середньої артерії головного мозку) протягом 24 годин; на якій

А показує ефекти DL0108 на експресію TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1, iNOS та AQP-4;

В представляє собою статистичну діаграму, яка кількісно визначає експресію TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1, iNOS та AQP-4  $\beta$ -актином в якості внутрішнього стандарту.

Фігура 3 представляє собою фігуру забарвлення Нісля (200 $\times$ ) області CA1 у корі головного мозку та гіпокампа, на якій

А: група імітації операції;

В: модельна група;

С: група німодипіну 3 мг/кг;

Д: група DL0108 (рацемат піноцембрину) 1 мг/кг;

Е: група DL0108 (рацемат піноцембрину) 3 мг/кг;

45 Ф: група DL0108 (рацемат піноцембрину) 10 мг/кг.

Конкретні шляхи виконання даного винаходу

Даний винахід ілюструють зокрема наступними прикладами.

Приклад 1: Ефекти профілактики та лікування удару спонтанно гіпертензивних щурів, схильних до удару (SHRSP)

1. Тестові лікарські засоби: рацемат піноцембрину для ін'єкцій, (R)-піноцембрин для ін'єкцій та (S)-піноцембрин для ін'єкцій, які забезпечені Дослідницькою лабораторією нових лікарських засобів Науково-дослідного інституту лікарських засобів Китайської академії медичних наук (номер партії: 20050601, вміст: 2,36 %) та приготовані способом, розкритим в CN200810084682.3, тобто формуванням комплексу включення рацемату піноцембрину або енантіомерів піноцембрину з циклодекстрином або його похідними та розчиненням комплексу в фізіологічному розчині при застосуванні. Німодипін в якості лікарського засобу позитивного контролю був закуплений у Bayer Company (Німеччина).

2. Експериментальні тварини та групування

Експериментальні тварини: 110 SHRSP щурів та 10 нормальних щурів Вістар віком 6 тижнів.

Експериментальне групування: Щури Вістар були нормальною групою; SHRSP щури були згруповані як модельна група, група німодипіну (3 мг/кг), групи низької, середньої та високої дози рацемату піноцембрину (3, 10 та 30 мг/кг/день, відповідно), групи низької, середньої та високої дози (R)-піноцембрину (дози якого були ідентичні таким в групах рацемату піноцембрину, відповідно) та групи низької, середньої та високої дози (S)-піноцембрину (дози якого були ідентичні таким в групах рацемату піноцембрину, відповідно).

### 3. Експериментальний спосіб

Окрім щурів з нормальної групи всі SHRSP щурі випивали 1 % розчин хлориду натрію щоденно. Лікарські засоби вводили у прописаних дозах відповідно для щурів групи німодипіну (3 мг/кг), груп низької, середньої та високої дози рацемату піноцембрину (3, 10 та 30 мг/кг/день, відповідно), груп низької, середньої та високої дози (R)-піноцембрину (дози якого були ідентичні таким в групах рацемату піноцембрину, відповідно) та груп низької, середньої та високої дози (S)-піноцембрину (дози якого були ідентичні таким в групах рацемату піноцембрину, відповідно). Фізіологічний розчин такого самого об'єму вводили модельній групі. Введення продовжували протягом 14 днів після приступу удару.

### 4. Стандарт початку удару

① Виникнення конвульсії однієї кінцівки, пари передніх кінцівок або всього тіла; ② виникнення геміплегії або загального паралічу, припадання живота до землі та нездатність встати; ③ до більш серйозних, виникнення систематичного дрібного тремтіння, повзання, периферичного паралічу, навіть смерті. Крім симптомів, перерахованих вище, у деяких тварин можна спостерігати збудження (стрибання або підскакування). Як тільки спостерігали будь-який з вищевказаних симптомів, встановлювали початок удару та записували час початку для кожної тварини.

### 5. Набір зразків

1) Після останньої дози щурам не давали їсти протягом 6 годин та зразки крові зібрали забором крові в очному дні. Після декапітації цілий мозок щурів відділяли у льодоформах для застосування.

2) 3 мл крові швидко по краплях налили в кювету з 1 мл 0,074 % гепарину та перемішали. Загальну в'язкість крові, в'язкість плазми, індекс агрегації червоних кров'яних клітин (RBC) та індекс деформації RBC визначали детектором гемореології згідно його технічних вимог.

3) 2 мл крові швидко по краплях налили в кювету з 0,2 мл 0,13 моль/л цитрату натрію та перемішали. Суміш центрифугували протягом 10 хвилин при 1000 обертів на хвилину та коефіцієнт агрегації тромбоцитів визначали вимірювачем агрегації тромбоцитів згідно його технічних вимог.

4) 1 мл крові швидко по краплях налили в кювету з 0,1 мл 0,109 моль/л цитрату натрію та перемішали. Суміш центрифугували протягом 15 хвилин при 3000 обертів на хвилину та фібриноген плазми у рідкому супернатанті визначали ферментним імуносорбентним аналізом (ELISA).

5) 2 мл крові швидко по краплях налили в кювету з 30 мкл 7,5 % ЕДТУ-2Na і 40 мкл апротиніну та перемішали. Після центрифугування протягом 5 хвилин при 3000 обертів на хвилину ET-1 (ендотелін-1) плазми у рідкому супернатанті визначали ізотопним радіоімуноаналізом.

6) Цілі тканини мозку зважили одну за одною, висушили у вакуумній печі при  $110 \pm 5$  °C протягом 48 годин, та потім знову зважили.

### 6. Індокси, що спостерігаються

1) Спостерігають стан організму тварин кожної групи після моделювання: включаючи зовнішній вид організму, психічний стан, чутливість, положення тіла при переміщенні, спонтанну активність, кількість води та їжі, вагу організму та ін.

Оцінки неврологічних симптомів після початку удару

Оцінка	СИМПТОМИ
0	нормальні
1	менше переміщення або помірне збудження
2	конвульсія однієї передньої кінцівки або голови, є неактивним в куті клітки або роздратоване збудження (поява стрибання або підскакування)
3	параліч як передньої кінцівки, так і задньої кінцівки з однієї сторони або однієї передньої кінцівки, нахил тіла, труднощі при ходьбі
4	припадання животом до землі та неможливість встати, тетраплегія та дрібне тремтіння усього тіла

Після початку удару оцінки протягом 14 днів записували для кожної тварини, а оцінки в групах лікування порівнювали з оцінками у контрольної групи.

2) Гемореологія: включаючи загальну в'язкість крові, в'язкість плазми, індекс агрегації RBC, індекс деформації RBC та коефіцієнт агрегації тромбоцитів.

5 3) Фібриноген плазми.

4) ET-1 плазми.

5) Вміст води у мозку: залежно від ваги цілої тканини мозку перед та після розміщення у вакуумну піч, дані застосовували у наступній формулі та підраховували:

Вміст води у мозку = (сира вага – суха вага) / сира вага × 100 %.

10 6. Статистичні способи: результати показали в форматі  $\bar{x} \pm SD$  (стандартне відхилення), та порівняння даних аналізували однофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA).

7. Результати експерименту

1) Смерть щурів

15 Загалом 24 щури вмерли під час експерименту. Після аналізу патологічної аутопсії виявили, що 4 з них вмерли через геморагічний удар, а інші 20 щурів вмерли через ішемічний удар. Деталі можна побачити в таблиці 1.

Таблиця 1

Смерть щурів та таблиця аналізу

Група	Доза (мг/кг)	Час початку удару (d)	Кількість щурів		Причини смерті
			Перед експериментом	Після експерименту	
Нормальні	--	--	10	10	--
Модельні	--	33,7±5,1	10	4	геморагічний: 1 ішемічний удар: 5
Німодипін	3	41,6±12,8	10	10	--
Рацемат піноцембрину	30	43,9±6,4	10	9	ішемічний удар: 1
	10	42,7±7,2	10	10	--
	3	40,1±8,7	10	10	--
(R)-піноцембрин	30	41,8±6,9	10	7	ішемічний удар: 3
	10	39,8±7,8	10	7	геморагічний удар: 1 ішемічний удар: 2
	3	37,7±8,4	10	9	ішемічний удар: 1
(S)-піноцембрин	30	41,5±5,8	10	7	ішемічний удар: 3
	10	37,6±7,3	10	6	геморагічний удар: 2 ішемічний удар: 2
	3	34,3±6,9	10	7	ішемічний удар: 3

При порівнянні з модельною групою \*P<0,05, \*\*P<0,01.

2) Психічний стан щурів

20 Щури в нормальній групі були нормальними за станом тіла, споживанням їжі та пересуванням.

3 початку четвертого тижня, окрім груп високої, середньої дози рацемату піноцембрину та групи німодипіну, в інших групах постійно було кілька щурів, уражених ударом, які показували симптоми збудження, пароксизмальних конвульсій, паралічу, тяжкої голови, зменшення з'їденого, нетримання сечі, випадіння шерсті та схуднення. Відповідно до вищевказаного стандарту оцінок неврологічних симптомів після початку удару, починаючи з дня початку удару, оцінки для груп високої та середньої доз рацемату піноцембрину помітно зменшувались. Протягом 2-14 днів після початку їх оцінки були стабільно нижче 1,6 та 2,3, відповідно. Це вказувало, що висока та середня дози рацемату піноцембрину мали значні ефекти покращення неврологічної функції. Оцінки групи низької дози рацемату піноцембрину та групи високої дози (R)-піноцембрину були не тільки відносно високими протягом кількох початкових днів, але також тримались на рівні 2,5 або вище протягом 14 днів. Це вказувало на те, що низька доза рацемату піноцембрину та висока доза (R)-піноцембрину не мали ефекту покращення. Після початку удару оцінки групи німодипіну були відносно низькими та були незмінно нижче 2,2 через 6 днів.



## 3) Аналіз гемореології

Таблиця 2:

Зміни гемореологічних індексів ( $\bar{X} \pm s$ )

Група	Доза (мг/кг)	Загальна в'язкість крові		Питома в'язкість плазми	Індекс агрегації RBC	Індекс деформації RBC
		20 (л/с)	5 (л/с)			
нормальні	--	2,99±0,48	10,08±1,99	1,82±0,28	7,43±0,63	0,23±0,023
модельні	--	5,90±0,67 <sup>##</sup>	15,49±3,06 <sup>##</sup>	2,75±0,42 <sup>##</sup>	14,67±1,13 <sup>##</sup>	0,104±0,019 <sup>##</sup>
німодипін	3	4,64±0,92 <sup>*</sup>	11,84±2,44 <sup>*</sup>	1,98±0,29 <sup>**</sup>	8,69±1,01 <sup>**</sup>	0,213±0,03 <sup>**</sup>
рацемат піноцембрину	30	3,89±0,28 <sup>**</sup>	10,95±1,30 <sup>*</sup>	1,99±0,28	7,84±0,63	0,222±0,028 <sup>**</sup>
	10	4,12±0,57 <sup>*</sup>	12,01±2,46 <sup>*</sup>	2,01±0,49	8,36±1,39 <sup>**</sup>	0,219±0,031 <sup>**</sup>
	3	4,66±0,34 <sup>*</sup>	14,81±2,13 <sup>*</sup>	2,17±0,28	8,84±0,63	0,183±0,028 <sup>**</sup>
(R)-піноцембрин	30	4,28±0,66 <sup>*</sup>	12,24±3,16 <sup>*</sup>	2,09±0,51	8,12±0,88 <sup>**</sup>	0,219±0,104 <sup>**</sup>
	10	4,45±0,71 <sup>*</sup>	14,39±1,84 <sup>*</sup>	2,30±0,63	8,25±2,41 <sup>*</sup>	0,184±0,100 <sup>*</sup>
	3	5,06±1,45 <sup>*</sup>	15,20±1,82 <sup>*</sup>	2,60±0,94	8,50±2,11 <sup>*</sup>	0,144±0,405 <sup>*</sup>
(S)-піноцембрин	30	4,96±1,26 <sup>*</sup>	14,90±3,32 <sup>*</sup>	2,47±0,15	12,50±2,11 <sup>*</sup>	0,120±0,405 <sup>*</sup>
	10	5,49±0,43 <sup>*</sup>	15,13±3,06 <sup>*</sup>	2,65±0,42	13,07±1,13 <sup>*</sup>	0,109±0,082 <sup>*</sup>
	3	5,78±0,06 <sup>*</sup>	15,39±1,20 <sup>*</sup>	2,79±0,42	14,45±1,13 <sup>*</sup>	0,101±0,030 <sup>*</sup>

При порівнянні з нормальною групою <sup>#</sup>P<0,05, <sup>##</sup>P<0,01; при порівнянні з модельною групою <sup>\*</sup>P<0,05, <sup>\*\*</sup>P<0,01.

Результати показують, що модельна група проявляла значні відмінності (P<0,01) в індексах гемореології крові в порівнянні з нормальною групою, яку ілюструють стан високої в'язкості та високої агрегації крові модельної групи. В порівнянні з модельною групою групи високої, середньої та низької дози рацемату піноцембрину та група високої дози (R)-піноцембрину показали зменшення агрегації крові різного ступеню (P<0,01, P<0,05), особливо показують зниження загальної в'язкості крові та індексу агрегації RBC (P<0,01). Проте, (S)-піноцембрин зовсім не показав ніякої активності. Німодипін мав ефект зниження в'язкості крові. Результати показані в таблиці 3.

Рекомендація: рацемат піноцембрину може знизити в'язкість крові залежним від дози чином, та (R)-піноцембрин при високій дозі має схожий ефект.

## 4) Агрегація тромбоцитів

Результати стійкості до агрегації тромбоцитів в таблиці 3 вказують на те, що коефіцієнт агрегації тромбоцитів модельної групи був вище, ніж такий нормальної групи (P<0,01). В порівнянні з модельною групою групи високої та середньої дози рацемату піноцембрину та група високої дози (R)-піноцембрину показали значне зменшення коефіцієнту агрегації тромбоцитів (P<0,01, P<0,05), в той час як (S)-піноцембрин не показав активності.

Рекомендація: рацемат піноцембрину може протидіяти агрегації тромбоцитів залежним від дози чином, та (R)-піноцембрин у високій дозі також має ефект.

## 5) Аналіз фібриногену плазми

Вміст фібриногену плазми у модельної групі був значно вищим, ніж такий у нормальної групи (P<0,01). В порівнянні з модельною групою групи високої, середньої та низької дози рацемату піноцембрину та група високої дози (R)-піноцембрину показали значне зменшення вмісту фібриногену плазми (P<0,01), таким чином змінюючи стан гіперкоагуляції, в той час як (S)-піноцембрин не мав активності. Конкретні результати показані в таблиці 3.

Таблиця 3

Зміни агрегації тромбоцитів, вміст фібриногену плазми, вміст ET-1 та вміст води у мозку

Група	Доза (мг/кг)	Зміна в агрегації тромбоцитів	Фібриноген плазми	Вміст ET-1	Вміст води у мозку
нормальна	--	19,4±2,6	2,55±0,12	163,6±21,6	78,34±0,62
модельна	--	26,8±3,1 <sup>##</sup>	3,05±0,26 <sup>##</sup>	243±21,2 <sup>##</sup>	79,85±0,70 <sup>#</sup>
німодипін	3	20,1±2,8 <sup>**</sup>	2,67±0,13 <sup>**</sup>	174,8±20,8 <sup>**</sup>	78,82±0,58 <sup>*</sup>
рацемат піноцембрину	30	22,3±3,5 <sup>**</sup>	2,56±0,42 <sup>**</sup>	182,4±24,2 <sup>**</sup>	78,67±0,60 <sup>*</sup>
	10	23,8±2,9 <sup>**</sup>	2,62±0,15 <sup>**</sup>	209,2±16,7 <sup>**</sup>	79,08±0,67 <sup>*</sup>
	3	25,1±3,0 <sup>**</sup>	2,79±0,13 <sup>**</sup>	221,4±20,4 <sup>**</sup>	79,51±0,42 <sup>*</sup>
(R)-піноцембрин	30	23,9±6,1 <sup>*</sup>	2,74±0,47 <sup>*</sup>	198,1±35,4 <sup>*</sup>	79,00±0,14 <sup>*</sup>
	10	25,4±4,3 <sup>*</sup>	2,83±0,18 <sup>*</sup>	228,4±16,9 <sup>*</sup>	79,54±0,53 <sup>*</sup>
	3	25,9±1,7 <sup>*</sup>	2,99±0,13 <sup>*</sup>	235,4±35,2 <sup>*</sup>	79,55±0,55 <sup>*</sup>
(S)-піноцембрин	30	25,7±5,4 <sup>*</sup>	2,81±0,57 <sup>*</sup>	240,8±24,3 <sup>*</sup>	79,67±0,73 <sup>*</sup>
	10	26,5±4,1 <sup>*</sup>	2,99±0,61 <sup>*</sup>	240±16,8 <sup>*</sup>	79,75±0,81 <sup>*</sup>
	3	26,7±1,3 <sup>*</sup>	3,00±0,32 <sup>*</sup>	243±19,5 <sup>*</sup>	79,95±0,68 <sup>*</sup>

При порівнянні з нормальною групою <sup>#</sup>P<0,05, <sup>##</sup>P<0,01; при порівнянні з модельною групою <sup>\*</sup>P<0,05, <sup>\*\*</sup>P<0,01.

## 6) ET-1 плазми

5 Як показано в Таблиці 3, ET-1 плазми модельної групи швидко збільшився та має значиму різницю в порівнянні з нормальною групою (P<0,01). В порівнянні з модельною групою вміст ET-1 плазми в групі високої дози рацемату піноцембрину та групи високої дози (R)-піноцембрину значно зменшився (P<0,01, P<0,05). Групи інших доз рацемату піноцембрину та (R)-піноцембрину та групи (S)-піноцембрину не мали активності.

## 7) Визначення вмісту води в набряклому мозку

10 Як показано в Таблиці 3, вміст води у мозку в модельній групі збільшувався помітно та мав значну різницю в порівнянні з нормальною групою (P<0,05). В порівнянні з модельною групою вміст води у мозку у групі високої дози рацемату піноцембрину значно зменшився (P<0,05). Інші групи не мали помітної активності.

## 8) Висновок

15 В порівнянні з модельною групою рацемат піноцембрину може затримувати час початку удару залежним від дози чином (P<0,01). Рацемат піноцембрину в низькій дозі та (R)-піноцембрин у високій дозі можуть також затримувати час початку удару (P<0,05). Німодипін може затримувати час початку удару (P<0,01). Це ілюструє, що піноцембрин має профілактичні ефекти на удар, рацемат піноцембрину кращий ніж (R)-піноцембрин, та (S)-піноцембрин в високій, середній та низькій дозах не мав активності. Конкретні результати можна побачити в Таблиці 1.

Рацемат піноцембрину може дозозалежно збільшувати співвідношення виживання після удару, яке означає, що рацемат піноцембрину має активність в лікуванні удару у SHRSP щурів.

25 (R)-піноцембрин має цю активність, лише коли вводиться у високій дозі, та активність є подібною до такої німодипіну, що означає, що рацемат піноцембрину має кращу активність ніж (R)-піноцембрин, в той час як (S)-піноцембрин не має значної активності. Рекомендації: 1) рацемат піноцембрину має ефекти профілактики та лікування удару; 2) (R)-піноцембрин також має ефекти профілактики та лікування удару, хоча ефекти дещо менші; 3) ефекти лікування рацемату піноцембрину кращі ніж такі (R)-піноцембрину, головним чином, через те, що (S)-піноцембрин без ефектів забезпечує ефекти (R)-піноцембрину.

30 Приклад 2: Ефекти на гострий ішемічний удар, викликаний закупорюванням середньої артерії головного мозку (MCAO)

35 Тестові лікарські засоби: піноцембрин для ін'єкції, забезпечений Дослідницькою лабораторією нових лікарських засобів Науково-дослідного інституту лікарських засобів Китайської Академії медичних наук (номер партії: 20050601, вміст: 2,36 %), та приготовлений способом, розкритим в CN200810084682.3, тобто формуванням комплексу включення рацемату піноцембрину з циклодекстрином або його похідними та розчиненням комплексу в

фізіологічному розчині при застосуванні. Німодипін в якості лікарського засобу позитивного контролю закупили у Bayer Company (Німеччина).

Експериментальні тварини: 100 самців SD щурів з вагою тіла 250-280 г закупили в Інституті експериментальних тварин Китайської академії медичних наук. Щурів групували довільно як

5 групу імітації операції, модельну групу, групи піноцембрину та групу німодипіну (3 мг/кг). Експериментальна модель: модель гострого ішемічного удару отримали закупорюванням середньої артерії головного мозку (MCAO).

Спосіб мотузкового закупорювання середньої артерії головного мозку, як встановлено Zea Longa, був прийнятий з відповідними удосконаленнями. 400 мг/кг 10 % хлоралгідрату

10 внутрішньочеревно вводили щурам. Зовнішню сонну артерію (ECA) відділяли та перев'язували у місці, де артерія виділяється на приблизно 0,8 см. Кінець ECA ближчий до серця затискали артеріальним затискачем. 2 мм розріз V-форми зробили від перев'язки ECA до біфуркації ECA. Нейлонову нитку вставляли обережно в CCA та потім у внутрішню сонну артерію (ICA) через біфуркацію ECA та ICA після послаблення артеріального затискача. Нейлонову нитку

15 проштовхували у мозок через ICA та вставляли на глибину  $18,5 \pm 0,5$  мм, коли стійкість падала повільно. Нейлонова нитка повинна була досягти меншої передньої артерії головного мозку через початок середньої артерії головного мозку (MCA), а ICA мала бути перев'язана та зшита. Кінець нейлонової нитки треба було залишити на 1 см зовні шкіри.

Щурів в групі імітації операції оперували лише з передопераційною анестезією та розрізом судини без перев'язування та імпортування лінії.

Статистичний спосіб: результати показані в форматі  $\bar{x} \pm SD$ , та порівняння груп виконували однофакторним дисперсійним аналізом (ANOVA).

Індекси, що спостерігалися, та результати

1. Нейроповедінковий огляд (оцінка Бедерсона)

25 Перед умертвінням тварин виконали нейроповедінковий огляд. Щурів підняли над землею на приблизно 1 chi (1 chi=1/3 метра) для дослідження стану двох передніх кінцівок. Щурів помістили на землю та штовхали за їх плечі для дослідження різниць їх стійкості. Щурів помістили на землю та досліджували шлях їх ходьби. Прийняли чотирьохстадійний спосіб оцінювання (оцінки 0-5). Чим більшою була оцінка, тим більш серйозне ушкодження існувало у

30 їх нейроповедінці.

Стандарт оцінювання Бедерсона

(1) Якщо щури поводитись повністю нормально, записували оцінку 0.

(2) Коли щурів підіймали над землею, якщо щури повертали або втягували передню кінцівку на стороні, протилежній операції, всередину, записували оцінку 1.

35 (3) Коли щурів поміщали на землю та тискали рукою для огляду стійкості обох сторін, якщо стійкість на стороні, протилежній операції, знижувалася, записували оцінку 2.

(4) Коли щурів помістили на землю для дослідження шляху ходьби, якщо щури крутилися навколо сторони, протилежній операції, записували оцінку 3.

40 (5) Якщо щури були ушкоджені дуже серйозно, щоб рухатися самостійно, записували оцінку 4.

Результати показані в Таблиці 4: оцінка нейроповедінки щурів у групі імітації операції була 0. Середня оцінка нейроповедінки щурів в модельній групі операції була  $3,4 \pm 0,6$ , у якій більшість тварин показали внутрішню ротацію або втягування їх передніх кінцівок на стороні, протилежній операції, зниження зусилля м'язового скорочення на протилежній стороні, переміщення по колу

45 або несистематичне переміщення по колу, та були оцінені 3; менша частина тварин показала лише внутрішню ротацію їх передніх кінцівок та зниження стійкості, та були оцінені 2; кілька тварин показали тяжкі симптоми та переміщувались самостійно, та були оцінені 4.

В групах рацемату піноцембрину (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг) симптоми ураження нерву, викликані ішемією, у тварин були значно покращенні ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ), показуючи зв'язок доза-ефект.

50

Таблиця 4

Ефекти рацемату піноцембрину на  
оцінки неврологічних симптомів (оцінки Бедерсона) та об'єми інфаркту ( $\bar{X} \pm s$ , n=10)

Група	Доза (мг/кг)	Оцінка Бедерсона	Відсоток об'єму інфаркту (%)
імітація операції	--	0,4±0,1	0
модельні	--	3,4±0,6 <sup>##</sup>	33,6±4,3 <sup>##</sup>
Рацемат піноцембрину	3	2,4±0,7 <sup>*</sup>	23,1±3,4 <sup>*</sup>
Рацемат піноцембрину	10	1,8±0,6 <sup>**</sup>	21,4±2,1 <sup>**</sup>
Рацемат піноцембрину	30	1,5±0,3 <sup>**</sup>	14,6±1,1 <sup>**</sup>
Німодипін	3	2,5±0,7 <sup>*</sup>	16,7±1,3 <sup>**</sup>

При порівнянні з групою імітації операції <sup>##</sup>P<0,01; при порівнянні з модельною групою \*P<0,05; \*\*P<0,01.

## 2. Визначення об'єму інфаркту головного мозку

Після оцінювання нейроповедінки щурів умертвили декапітацією, їх тканини мозку швидко перенесли та помістили в холодильник при -20 °С. Через 10 хвилин мозкову тканину перенесли на середовище з кімнатною температурою. Після того як нюхову цибулину, церебелярний та нижній стовбур мозку відсікли, тканину мозку порізали на п'ять безперервних коронарних зрізів з інтервалом 2 мм, розрізи зробили: перший - на середній точці з'єднання переднього полюсу мозку та зоровому перехресті, другий - на зоровому перехресті, третій - на стеблі воронки, а четвертий - на середній точці стебла воронки та товстих шарах хвостатого ядра. Потім зрізи мозку швидко поміщали в 5 мл розчину, який містить 4 % ТТС (хлористий 2,3,5-трифенілтетразол) та 0,1 мл 1 моль·л<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, та інкубували при постійній температурі 37 °С та в умові темряви протягом 30 хвилин. Протягом періоду часу зрізи мозку нахилили кожні 5 хвилин. Після забарвлення ТТС нормальна тканина мала колір червоної рози, в той час як інфарктна тканина не забарвлювалась та мала білий колір. Кожну групу зрізів мозку розмістили один за одним та сфотографували. Фотографії аналізували системою аналізу зображень та обрахували зону інфаркту кожного зрізу. Об'єм інфаркту кожного зрізу обчислювали множенням зони інфаркту на товщину зрізу (2 мм), та об'єм інфаркту був сумою об'ємів інфаркту усіх зрізів. Об'єм інфаркту показаний у відсотках півкулі головного мозку так, щоби виключити ефекти набряку мозку.

Об'єм інфаркту (%) = (об'єм півкулі, протилежній операції, - об'єм інфаркту півкулі зі сторони операції) / об'єм півкулі, протилежній операції, × 100 %.

Результати показали, що: після ушкодження ішемією головного мозку в групі імітації операції не виявлено випадків інфаркту головного мозку, в той час як об'єм інфаркту в модельній групі складав (33,6±4,3)% (P<0,01). В порівнянні з модельною групою об'єми інфаркту в групах рацемату піноцембрину (3, 10, 30 мг/кг) значно знизились (P<0,01), та об'єми інфаркту складали відповідно (23,1±3,4)%, (21,4±2,1)% та (14,6±1,1)%. Об'єм інфаркту в групі німодипіну складав (16,7±1,3)% та значно відрізнявся від такої модельної групи (P<0,01). Результати показані в таблиці 4 та на фігурі 1.

Результати показали, що рацемат піноцембрину міг би знижувати об'єм інфаркту головного мозку, викликаного ішемічним ударом головного мозку.

## 3. Визначення регіонарного мозкового кровотоку

Щурів зафіксували на животі на стереотаксичному апараті та піддали краніотомії. Після очистки для операційного поля спостереження брегму використовували в якості джерела, та ділянку, розташовану на 2 мм позаду та на 3 мм правіше від брегми, вибрали в якості точки вимірювання. Область 2-3 см навколо ділянки стоншили стоматологічним бором. В спосіб підтримували цілісність твердої мозкової оболонки та уникали великих судин. Встановили та зафіксували тримач зонду.

Щурів зафіксували на спині на операційному столі для виконання МСАО операції. Коли нейлонову нитку вставляли в ІСА, її не вставляли у внутрішньочеревну частину до тих пір, поки значення LDF не ставало постійним, значення кровотоку за 10 хвилин записували та їх середнє значення використовували в якості базового значення кровотоку головного мозку. Після завершення операції МСАО нейлонову нитку вставляли у внутрішньочеревну частину. Коли

значення кровотоку різко знизилось до 20-30 % від базового значення, констатували, що кровоток в МСА блокувався. Значення кровотоку перед МСАО в кожній групі використовували в якості базового значення (100 %) групи. Значення кровотоку після операції показували у відсотках базового значення. Значення LDF визначали на тій же ділянці перед тим як тварин умиртвляли.

Через 30 хвилин після ішемії головного мозку у щурів, значення rCBF у модельної групи було  $(31,09 \pm 5,35)\%$  від базового значення. Значення rCBF у групах рацемату піноцембрину (3, 10, 30 мг/кг) та групі німодипіну (3 мг/кг) були відповідно  $(40,76 \pm 6,58)\%$ ,  $(50,09 \pm 7,09)\%$ ,  $(53,28 \pm 8,03)\%$  та  $(55,58 \pm 6,09)\%$  від їх базових значень. Видно, що мозкові кровотоки в усіх групах введення швидко відновлювались зі значним підвищенням в порівнянні з такими модельної групи, де групи рацемату піноцембрину (10, 30 мг/кг) та групи німодипіну (3 мг/кг) показали значну відмінність в порівнянні з модельною групою ( $P < 0,05$ ). Через компенсацію колатерального кровообігу величина регіонарного мозкового кровотоку зменшувалась поступово після виникнення ішемії, але все ще трималась на рівні, вищому, ніж такий в модельній групі.

Таблиця 5

Ефекти рацемату піноцембрину на регіонарний мозковий кровоток (rCBF) ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ , n=10)

Момент часу (хвилини)	Група імітації операції	Модельна група	Німодипін	Рацемат піноцембрину 3 мг/кг	Рацемат піноцембрину 10 мг/кг	Рацемат піноцембрину 30 мг/кг
10	99,91±7,27	99,91±7,27	99,91±7,27	99,91±7,27	99,91±7,27	99,91±7,27
20	98,89±6,92	31,61±6,58 <sup>##</sup>	32,98±8,09	32,03±6,09	31,45±5,6	37,98±6,87
30	97,76±7,51	31,09±5,35 <sup>##</sup>	55,58±6,09	40,76±6,58	50,09±7,09	53,28±8,03
40	98,59±6,09	32,91±5,25 <sup>##</sup>	67,96±7,81	41,59±6,35	47,72±6,67	54,92±8,58
50	98,81±6,35	33,28±7,09 <sup>##</sup>	66,59±9,08	42,81±5,25	49,98±7,1	55,01±6,25
60	97,8±6,25	34,92±6,67 <sup>##</sup>	64,09±8,03	40,8±7,09	48,99±8,14	57,95±6,09
70	97,69±6,09	35,01±7,1 <sup>##</sup>	65,72±8,58	41,69±8,67	47,01±8,09	53,75±7,09
80	98,75±5,67	37,95±8,14 <sup>##</sup>	64,98±6,25	40,75±7,1	46,07±9,08	54,99±6,67
90	98,99±6,1	36,82±8,09 <sup>##</sup>	63,99±6,09	40,99±8,14	51,85±8,03	55,16±7,1
100	97,16±7,14	39,05±6,09 <sup>##</sup>	67,01±5,67	41,16±6,25	47,12±8,58	56,59±8,14
110	98,59±8,09	43,56±7,81 <sup>##</sup>	63,07±6,1	46,59±7,09	46,89±6,25	57,8±7,27
120	97,8±6,81	45,07±9,08 <sup>##</sup>	61,85±7,14	45,8±5,67	51,8±6,09	64,09±6,09
130	99,9±8,08	46,11±8,03 <sup>##</sup>	67,12±8,09	46,99±6,1	56,59±9,08	61,72±6,58
140	99,86±9,03	45,99±8,58 <sup>##</sup>	65,89±6,81	48,01±7,14	57,8±8,03	64,98±6,35
150	99,7±7,58	46,78±7,89 <sup>##</sup>	61,8±8,08	44,07±7,09	56,99±8,58	63,99±5,25
160	99,69±6,89	47,08±8,19 <sup>##</sup>	63,47±9,03	47,85±6,81	58,01±7,89	57,01±7,09
170	98,13±7,19	48,29±6,98 <sup>##</sup>	65,9±7,58	49,12±6,08	54,07±6,81	65,58±8,67
180	96,98±5,98	48,6±7,16 <sup>##</sup>	66,08±6,89	49,89±7,58	55,9±6,08	62,96±6,81

При порівнянні з групою імітації операції <sup>##</sup> $P < 0,01$ ; при порівнянні з модельною групою  $*P < 0,05$ .

#### 4. Набряк головного мозку та визначення синього Еванса (ЕВ) та флуоресцину натрію (NF)

Після операції розчин суміші ЕВ/NF (0,5 %, розчинений в фізіологічному розчині) кількістю 0,25 мл миттєво (миттєво після введення групам введення) вводили тваринам через хвостову вену. Через 24 години фізіологічний розчин заливали в серця щурів, щоб позбутись незв'язаного барвника. Щурів декапітували, тканини мозку швидко виймали та розділяли на ішемічну півкулю та неішемічну півкулю. Дві півкулі зважили, відповідно, та гомогенізували з 7,5 % (вага/об'єм) трихлороцтовою кислотою (ТСА). Гомогенат розділяли на дві частини, де 1 мл гомогенату коректували 52 мкл NaOH (5 н) для досягнення нейтрального значення рН, та 200 мкл з них взяли для визначення інтенсивності флуоресценції (збудження 485 нм, емісія 535 нм), їх NF визначали, використовуючи стандартну криву, отриману з розчинами NF серії концентрацій. Іншу частину гомогенату центрифугували протягом 20 хвилин при 12000 g та 4°C. 200 мкл супернатанту помістили на мікропластинку, його поглинання визначали при 620 нм, а

його ЕВ визначали із застосуванням стандартної кривої, отриманої з розчинами ЕВ серії концентрацій. Результати виражали в мкг ЕВ (або NF)/г сирової ваги мозку. Відсоток набряку мозку виражали як: (вага мозку в ішемічній півкулі - вага мозку в неішемічній півкулі)/ вага мозку в неішемічній півкулі×100 %.

- 5 Як показує Таблиця 6, відсоток набряку мозку в модельній групі складав (8,3±1,9)%, в той час як відсотки набряку мозку в групах рацемату піноцембрину (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг, внутрішньовенно) становили, відповідно, (5,5±1,7)%, (4,1±1,5)%, (3,2±2,1)%, які показують значну різницю в порівнянні з модельною групою (p<0,05, p<0,01). Рацемат піноцембрину (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг, внутрішньовенно) також значно знижував витік ЕВ/NF в тканині. Ці результати показали, що піноцембрин може пом'якшувати набряк тканини, викликаний ішемією головного мозку.

Таблиця 6

Ефекти рацемату піноцембрину на набряк мозку та витік ЕВ/NF у щурів МСАО ( $\bar{x} \pm sd$ , n=6)

Група	n	Відсоток об'єму набряку мозку (%)	Витік ЕВ (мкг/г тканини)	Витік NF (мкг/г тканини)
модельна	6	8,3±1,9	8,6±2,0	2,33±0,30
рацемат піноцембрину 3 мг/кг	6	5,5±1,7 <sup>*</sup>	6,16±0,4	1,48±0,08 <sup>*</sup>
рацемат піноцембрину 10 мг/кг	6	4,1±1,5 <sup>*</sup>	5,03±0,8	1,39±0,20 <sup>*</sup>
рацемат піноцембрину 30 мг/кг	6	3,2±2,1 <sup>**</sup>	4,39±0,4 <sup>**</sup>	1,30±0,15 <sup>**</sup>

При порівнянні з модельною групою \*P<0,05, \*\*P<0,01.

- 15 5. Визначення індексів енергетичного метаболізму в ішемічній тканині головного мозку щурів. Результати показані в таблиці 7. Через 24 години ішемії головного мозку енергетичний індекс в модельній групі зменшився і став 42,6 % такого перед операцією (P<0,05). В порівнянні з модельною групою індекс енергії в групах рацемату піноцембрину (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг) значно збільшився та збільшився, відповідно, на 34,6 % та 45,8 % (P<0,05) відносно модельної групи, показуючи залежність від дози.
- 20 Результати тесту на відновлення та тесту на повторюваність показали, що введення об'ємів АТФ, АДФ та АМФ має гарний лінійний зв'язок з площами піків. Отримані значення r були відповідно  $r_{ATP}=0,9897$ ,  $r_{ADP}=0,9896$ ,  $r_{AMP}=0,9893$ ,  $r_{CrP}=0,9981$ . Швидкості відновлення 4 видів стандартних матеріалів відповідно складали (86,6±5,6)%, (94,45±7,5)%, (83,4±6,1)%, (78,69±7,3)%.

25

Таблиця 7

Ефекти рацемату піноцембрину на індекси енергетичного метаболізму в ішемічній тканині головного мозку у щурів з МСАО ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

Група		Імітація операції	Модель	Рацемат піноцембрину		
				3 мг/кг	10 мг/кг	30 мг/кг
Параметр (мкмоль/г)	АТФ	2,55±0,45	1,01±0,12 <sup>#</sup>	1,18±0,18	1,62±0,21	1,97±0,58
	АДФ	0,42±0,07	0,28±0,03	0,31±0,04	0,35±0,06	0,38±0,05
	АМФ	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
	CrP	7,18±1,46	3,16±1,23 <sup>#</sup>	3,98±1,23	4,12±1,25	4,43±1,34
Енергетичне навантаження		1,54±0,33	0,66±0,23 <sup>#</sup>	0,73±0,23	0,88±0,23	0,96±0,29

При порівнянні з групою імітації операції <sup>#</sup>P<0,05; при порівнянні з модельною групою \*P<0,05.

6. Ефекти рацемату піноцембрину на запалення гострої стадії ішемії головного мозку (24 години після ішемії)

6.1 Вмісти NO та TNF-α у сироватці

В Таблиці 8 показано, що вміст NO та TNF- $\alpha$  в сироватці в модельній групі значно зросли, та в групах рацемату піноцембрину (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг), вміст NO та TNF- $\alpha$  у сироватках щурів через 24 години після ішемії значно зменшились ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ).

Таблиця 8

Ефекти рацемату піноцембрину на вміст NO та TNF- $\alpha$  у сироватці щурів з МСАО ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ ,  $n=8$ )

Група	n	NO (мкмоль/л)	TNF- $\alpha$ (пг/мл)
Нормальна	8	11,45 $\pm$ 2,42	89,58 $\pm$ 34,31
Модельна	8	127,30 $\pm$ 12,35 <sup>##</sup>	1442,45 $\pm$ 52,72 <sup>##</sup>
рацемат піноцембрину, 3 мг/кг	8	109,80 $\pm$ 9,38 <sup>*</sup>	1163,09 $\pm$ 51,12 <sup>*</sup>
рацемат піноцембрину, 10 мг/кг	8	107,11 $\pm$ 9,13 <sup>*</sup>	1104,83 $\pm$ 48,43 <sup>**</sup>
рацемат піноцембрину, 30 мг/кг	8	104,75 $\pm$ 5,03 <sup>*</sup>	1057,48 $\pm$ 48,48 <sup>**</sup>

При порівнянні з нормальною групою <sup>#</sup> $P < 0,05$ , <sup>##</sup> $P < 0,01$ ; при порівнянні з модельною групою <sup>\*</sup> $P < 0,05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0,01$ .

5

6.2 Ефекти рацемату піноцембрину на експресію цитокінів, таких як TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , в ішемічній тканині головного мозку

На Фігурі 2 можна побачити, що експресія цитокінів TNF- $\alpha$  та IL-1 $\beta$  в тканині значно збільшується за 24 години після ішемії, та введення рацемату піноцембрину (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг) на ранній стадії ішемії інгібує експресію TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  деякою мірою.

10

6.3 Ефекти рацемату піноцембрину на експресію адгезійних молекул, таких як ICAM-1, VCAM-1, в ішемічній тканині головного мозку

На Фігурі 2 можна побачити, що експресія адгезійних молекул ICAM-1 та VCAM-1 в тканині значно збільшується за 24 години після ішемії, та введення рацемату піноцембрину (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг) на ранній стадії ішемії інгібує експресію TNF- $\alpha$  та IL-1 $\beta$  деякою мірою.

15

6.4 Ефекти рацемату піноцембрину на експресію iNOS та білок AQP-4

На Фігурі 2 можна побачити, що експресія iNOS та білка AQP-4 в тканині значно збільшується за 24 години після ішемії, та введення рацемату піноцембрину (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг) на ранній стадії ішемії інгібує експресію iNOS та білку AQP-4 деякою мірою.

20

3  $\beta$ -актином в якості внутрішнього стандарту підраховували експресії TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1, iNOS, AQP-4, та ефекти інгібування рацемату піноцембрину на вищевказані білки побачили інтуїтивно. Рацемат піноцембрину в дозах 10 мг/кг та 30 мг/кг показали кращі результати.

Вищевказані результати показали, що рацемат піноцембрину може зменшувати гостре запалення, викликане гострим ішемічним ударом.

25

7. Спостереження морфології нейронів ішемічної тканині головного мозку у щурів

Після ішемії головного мозку протягом 24 годин щурів анестезували внутрішньочеревною ін'єкцією 10 % хлоралгідрату. Після вливання через серце гепаринізованого фізіологічного розчину протягом 10 хвилин та 4 % параформальдегіду протягом 30 хвилин тканину мозку взяли та перенесли у 4 % параформальдегід для фіксації, потім порізали на коронарні зрізи (6 $\Sigma$ м) машиною для замороженого зрізу, та один зріз вибирали з кожних 20 зрізів для забарвлення. Забарвлені зрізи розтягнули на предметному склі, обробленому полілізином, а потім зберігали в холодильнику при -40 °C.

30

Забарвлення Нізля: (1) заморожений зріз брали з холодильника та висушували при кімнатній температурі; (2) поміщали в ацетон для фіксації протягом 30 хвилин та відмивали PBS (фосфатно-буферний сольовий розчин) 3 рази, 3 хвилини кожен раз; (3) погрузали протягом 20-30 хвилин в толуїдиновий синій барвник, а потім відмивали водою протягом 15 хвилин; (4) дегідрували етанолом градієнтним чином та стеклували кишеном та закріплювали нейтральною смолою; (5) спостерігали під світловим мікроскопом та фотографували для аналізу; (6) брали 4 заморожені зрізи в приблизно однаковому положенні для кожного щура та досліджували 5 полів зору в гіпокампі для кожного зрізу під 200x світловим мікроскопом (всього 20 спостережень на щура). Підраховували клітини в полях зору. Середні співвідношень кількостей в групах введення до кількості в модельній групі підраховували для статистичного аналізу.

35

40

Результати показані на Фігурі 3. Гіпокамп представляє собою ділянку, чутливу до ішемії головного мозку. Результати забарвлення Нізля показали, що після того, як тканина головного мозку була ішемічно уражена, спостерігали серйозне ушкодження гіпокампальних нейронів, чітку відсутність клітин та нещільне розташування нервових клітин. Показано кількісними результатами, що нервові клітини зменшилися до  $79,5 \pm 9,7\%$  у порівнянні з групою імітації операції, та різниця була значною ( $P < 0,01$ ). Піноцембрин (3 мг/кг, 10 мг/кг, 30 мг/кг) може покращувати форму ішемічних нервових клітин та зменшувати втрату нервових клітин, при якому нервові клітини збільшилися на  $11,5 \pm 8,9\%$ ,  $36,8 \pm 4,9\%$  та  $51,7 \pm 6,6\%$  в порівнянні з модельною групою, показуючи значні різниці ( $P < 0,05$ ) в порівнянні з модельною групою та залежність від дози, що висвітлює нейрозахисні активності після гострої ішемії головного мозку.

#### Висновки

1) Рацемат піноцембрину може полегшувати зміни поведінки, викликані ішемічним ударом.

2) Рацемат піноцембрину може зменшувати зниження кровотоку головного мозку, викликаного ішемічним ударом.

3) Рацемат піноцембрину може знижувати об'єм інфаркту головного мозку, викликаного ішемічним ударом.

4) Рацемат піноцембрину може зменшувати набряк мозку, викликаний ішемічним ударом.

5) Рацемат піноцембрину може полегшувати розлади енергетичного метаболізму, викликані ішемічним ударом.

6) Рацемат піноцембрину може полегшувати гостре запалення, викликане ішемічним ударом.

7) Рацемат піноцембрину може зменшує ушкодження нервових клітин, викликане ішемічним ударом.

#### Приклад 3: Вивчення та оцінювання гострої токсичності

Експериментальні результати показали, що при однократній внутрішньовенній ін'єкції у SD щурів значення LD50 рацемату піноцембрину становило 490,9 (367,6~746,7) мг/кг, значення LD50 (S)-піноцембрину становило 375,3 (271,2~538,5) мг/кг, та значення LD50 (R)-піноцембрину становило 347,8 (257,4~466,3) мг/кг. Вищевказані результати показали, що рацемат піноцембрину мав більший безпечний діапазон застосування. Всі ці лікарські засоби не мали ефект на вагу тварини, та їх головні проявами с точки хору токсичності були квадриплегія та помірний кров'яний стаз у печінці та легені.

Приклад 4: Дослідження інтервалу терапевтичного часу піноцембрину у щурів, уражених фокальною ішемією головного мозку та реперфузією

1. В тесті приймали модель транзиторного закупорювання середньої артерії головного мозку (tMCAO) щурів. Реперфузію проводили після фокальної ішемії головного мозку протягом 2 годин так, щоб вивчити терапевтичний інтервал часу піноцембрину після фокальної ішемії головного мозку. Щурам вводили рацемат піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг, внутрішньовенна ін'єкція) після 1 години, 4 годин та 6 годин реперфузії (тобто, ішемія 3 години, 6 годин та 8 годин). (R)-піноцембрин та (S)-піноцембрин (1 мг/кг, 5 мг/кг, внутрішньовенна ін'єкція) вводили після 1 години та 4 годин реперфузії (тобто, ішемія 3 години та 6 годин). Інтервали терапевтичного часу цих лікарських засобів при фокальній ішемії головного мозку оцінювали вивченням їх ефектів на оцінки неврологічних симптомів, розмір інфаркту та вміст води у мозку протягом 24 годин після tMCAO.

#### 2. Матеріали та способи

##### 2.1 Експериментальні тварини

100 самців SD щурів, 240-280 г, були закуплені у Beijing Weitong Lihua Experimental Animal Technology Co., Ltd. Сертифікат відповідності: SCXK(JING)2007-0001. Тварин вирощували звичайним чином перед та після операції при 23-25 °C з вільним отриманням їжі та води.

##### 2.2 Лікарські засоби та реагенти

Рацемат піноцембрину для ін'єкцій, (R)-піноцембрин для ін'єкцій та (S)-піноцембрин для ін'єкцій були забезпечені Дослідницькою лабораторією нових лікарських засобів Науково-дослідного інституту лікарських засобів Китайської Академії медичних наук (номер партії: 20050601, вміст: 2,36 %), та приготовані способом, розкритим в CN200810084682.3, тобто формуванням комплексів включення рацемату піноцембрину або енантіомерів піноцембрину з циклодекстрином або його похідними, та розчиненням комплексів в фізіологічному розчині при застосуванні. Німодипін в якості лікарського засобу позитивного контролю закупили у Bayer Company (Німеччина). Гідроксипропіл  $\beta$ -циклодекстрин забезпечений Дослідницькою лабораторією нових лікарських засобів Науково-дослідного інституту лікарських засобів Китайської Академії медичних наук. TTC закупили у Sigma Company. Інші реагенти були комерційно доступними реагентами аналітичної якості.



### 2.3 Приготування моделі tMCAO

Анестезія щурів: 400 мг/кг 10 % хлоралгідрату внутрішньочеревно вводили щурам, а потім зникав випрямний рефлекс.

Щурів фіксували на спині на операційному столі, розрізали шию спереду та відділяли зрізанням шари структури для оголення правої загальної сонної артерії (ССА). ССА відділяли до сегменту після біфуркації внутрішньої сонної артерії (ICA) та зовнішньої сонної артерії (ЕСА). Запобігли пошкодження блукаючого нерву та трахеї. Нитки розташували під ССА та ЕСА для очікуваного застосування.

ССА та ICA затиснули артеріальним затискачем. Дві операційних нитки № 0 зав'язали на дальньому кінці ЕСА з 2~3 мм проміжками, а потім розрізали судину між цими двома операційними нитками. Дальній кінець ЕСА тягнули доки він не сформував пряму лінію з ICA. Зробили розріз на ЕСА та нейлонову нитку вставили через ЕСА в ICA. Після послаблення артеріального затискача нейлонову нитку впхнули у мозок через ICA та вставили на глибину  $18,5 \pm 0,5$  мм, коли опір відчувався незначно. Нейлонова нитка досягала меншої передньої артерії головного мозку через початок МСА, та потім було встановлена закупорка кровотоку в правій МСА. Тварин тримали під анестезією під час закупорки. Через 2 години після закупорки нейлонову нитку обережно витягли в залишок ЕСА для формування реперфузії. У процесі операції тварин опромінювали настільною лампою 100 В для підтримання температури тіла. Кімнатну температуру підтримували в діапазоні 23-25 °С.

Щурів в групі імітації операції піддавали лише передопераційній анестезії та розрізу судини без перев'язування та введення нитки.

### 2.4 Експериментальне групування та введення

група імітації операції (внутрішньовенна ін'єкція фізіологічного розчину після 3 годин ішемії);  
 модельна група (внутрішньовенна ін'єкція 50 мг/кг гідроксипропіл  $\beta$ -циклодекстрину після 3 годин ішемії);

група німодипіну (1 мг/кг, введений після 3 годин ішемії);  
 група рацемату піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг, введений після 3, 6 та 8 годин ішемії);  
 група (R)-піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг, введений після 3 та 6 годин ішемії);  
 група (S)-піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг, введений після 3 та 6 годин ішемії).

Перше введення виконували внутрішньовенною ін'єкцією, а внутрішньочеревну ін'єкцію виконували один раз через 12 годин з дозою, в 1,5 рази більшою за таку для внутрішньовенної ін'єкції.

### 2.5 Нейроповедінковий огляд

Нейроповедінковий огляд виконували, відповідно, коли тварини просинались після операції, та перед тим як тварин умертвляли. Прийняли оцінку Бедерсона (дивись деталі в Прикладі 2, 1. Нейроповедінковий огляд).

### 2.6 Визначення об'єму інфаркту

Після оцінювання нейроповедінки щурів умертвляли декапітацією та їх тканини мозку швидко взяли та помістили в холодильник при -20 °С. Через 10 хвилин тканини мозку перемістили до середовища кімнатної температури. Після того як нюхову цибулину, церебелярний та нижній стовбур мозку відсікли, тканину мозку порізали на шість безперервних коронарних зрізів з інтервалом 2 мм. Потім зрізи мозку швидко поміщали в 5 мл розчину, який містить 2 % TTC, та інкубували при постійній температурі 37 °С та в умові темряви протягом 30 хвилин. Протягом часу зрізи мозку нахиляли кожні 5 хвилин. Після забарвлення TTC нормальна тканина мала колір червоної рози, в той час як інфарктна тканина не забарвлювалась та мала білий колір. Кожну групу зрізів мозку помістили один за одним та фотографували. Фотографії аналізували системою аналізу зображень та підраховували зони інфаркту у кожному зрізі. Об'єм інфаркту кожного зрізу обчислили помноженням зони інфаркту на товщину зрізу (2 мм), та об'єм інфаркту був сумою об'ємів інфаркту усіх зрізів. Відсоток об'єму інфаркту виражали як: об'єм інфаркту з хворої сторони / загальний об'єм мозку з хворої сторони.

### 2.7 Визначення вмісту води в мозку

Сиру вагу мозку кожної тварини зважували перед нарізкою. Після забарвлення зрізи мозку висушили при 105 °С протягом 24 годин та зважили суху вагу мозку кожної тварини. Порівняли вміст води у мозку тварин різних груп. Вміст води у мозку = (сира вага мозку – суха вага мозку) / сира вага мозку  $\times 100$  %.

### 2.8 Обробка даних

Дані кількісних вимірів виражали як середнє  $\pm$  SD для t тесту. Розраховані значення виражали як % для  $\chi^2$  тесту.

### 3. Експериментальні результати

3.1 Ефекти піноцембрину на значення оцінки Бедерсона щурів з tMCAO

Оцінка нейроповедінки в групі імітації операції становила 0. Середня оцінка щурів в групі контролю розчинника становила  $3,4 \pm 0,6$ , в якій більшість тварин показала внутрішню ротацію або втягування їх передніх кінцівок на стороні, протилежній операції, зменшення сили м'язового скорочення або крутіння, та були оцінені 3; менша кількість тварин лише показала внутрішню ротацію їх передніх кінцівок та зменшення стійкості, та були оцінені 2; та кілька тварин показали тяжкі симптоми та самостійно не рухалися, були оцінені 4.

В групах рацемату піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг) симптоми ураження нерва після 3 годин та 6 годин ішемії у тварин значно покращувались ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ), в той час як покращення симптомів після 8 годин ішемії не були значними, показуючи залежність від дози деякою мірою. В групах (R)-піноцембрину та групах (S)-піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг) симптоми ураження нерва після 3 годин ішемії значно покращувались ( $P < 0,05$ ), в той час як покращення симптомів через 6 годин ішемії не були значними. Крім того, німодипін (1 мг/кг) не показував покращення симптомів після 3 годин ішемії.

### 3.2 Ефекти піноцембрину на об'єм інфаркту у щурів з tMCAO

Через 24 після tMCAO у щурів послідовні коронарні зрізи мозку забарвили TTC. Існували області інфаркту (білі), які не забарвлювались, у певного відсотка тварин в кожній групі, показуючи, що тварини автоматично відновлювались більше або менше протягом 24 годин реперфузії. В статистичному способі зразки, чий об'єм інфаркту був менший ніж 5 %, видаляли з кожної групи. Рацемат піноцембрину (1 мг/кг) знижував об'єм інфаркту, якщо спочатку вводили через 3 години ішемії головного мозку, та його активність не була значною, коли спочатку вводили через 6 годин ішемії головного мозку. Рацемат піноцембрину (5 мг/кг) знижував об'єм інфаркту, коли спочатку вводили після 3 годин та 6 годин ішемії головного мозку ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ), та його активність не була значною, коли спочатку вводили через 8 годин ішемії головного мозку. Ці ефекти показують залежність від дози деякою мірою. (R)-піноцембрин та (S)-піноцембрин (1 мг/кг, 5 мг/кг) знижують об'єм інфаркту через 3 години ішемії головного мозку ( $P < 0,05$ ), та їх активності не були значними, коли спочатку вводили після 6 годин ішемії головного мозку. Крім того, німодипін (1 мг/кг) не показував покращення, коли спочатку вводили після 3 годин ішемії головного мозку.

### 3.3 Ефекти піноцембрину на набряк мозку у щурів з tMCAO

В модельній групі вміст води у мозку щурів значно збільшився. Рацемат піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг) значно знижував вміст води у мозку після 3 годин та 6 годин ішемії головного мозку ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ) та його активності не були значними, коли спочатку вводили після 8 годин ішемії головного мозку. Ці активності були залежними від дози деякою мірою. (R)-піноцембрин та (S)-піноцембрин (1 мг/кг, 5 мг/кг) знижували вміст води у мозку через 3 години ішемії головного мозку ( $P < 0,05$ ), та їх активності не були значними коли спочатку вводились після 6 годин ішемії головного мозку. Крім того, німодипін (1 мг/кг) не показує покращення, якщо спочатку вводиться через 3 години ішемії головного мозку. Результати показані в Таблиці 9.

Таблиця 9

Ефекти піноцембрину на оцінку нейроповедінки, об'єм інфаркту та вміст води у мозку щурів після 2 годин ішемії та 24 годин реперфузії ( $\bar{x} \pm s$ )

Група		n	Значення нейроповедінки	Відсоток інфаркту (%)	Вміст води у мозку (%)
Імітація операції		6	0	0	80,86±0,83
Модель		11	2,36±0,81 <sup>##</sup>	30,62±17,06 <sup>##</sup>	83,86±1,18 <sup>##</sup>
Німодипін, 1 мг/кг, 3 години		11	2,09±0,63	31,30±10,31	83,33±1,01
Рацемат піноцембрину	1 мг/кг, 3 години	9	1,44±0,72*	16,59±7,98*	82,20±1,00*
	1 мг/кг, 6 годин	11	1,68±0,46*	23,01±11,00	82,44±1,28*
	1 мг/кг, 8 годин	12	1,88±0,61	27,16±13,69	83,26±1,05
	5 мг/кг, 3 години	9	1,44±0,52**	13,64±6,32*	82,23±1,42*
	5 мг/кг, 6 годин	12	1,66±0,77*	15,03±4,07*	81,12±1,42**
	5 мг/кг, 8 годин	12	1,91±0,66	28,32±18,65	83,29±1,79
(R)-піноцембрин	1 мг/кг, 3 години	9	1,42±0,82*	15,69±7,82*	82,18±0,98*
	1 мг/кг, 6 годин	11	1,86±0,57	26,33±12,67	83,36±1,12
	5 мг/кг, 3 години	9	1,39±0,72*	15,66±7,88*	81,20±1,03*
	5 мг/кг, 6 годин	12	1,83±0,49	25,89±13,57	83,77±1,07
(S)-піноцембрин	1 мг/кг, 3 години	9	1,29±0,72*	15,32±7,98*	81,95±1,00*
	1 мг/кг, 6 годин	11	1,79±0,63	28,06±12,98	82,96±0,98
	5 мг/кг, 3 години	9	1,59±0,77*	15,78±7,28*	81,87±1,12*
	5 мг/кг, 6 годин	12	1,77±0,70	25,97±12,75	83,37±1,27

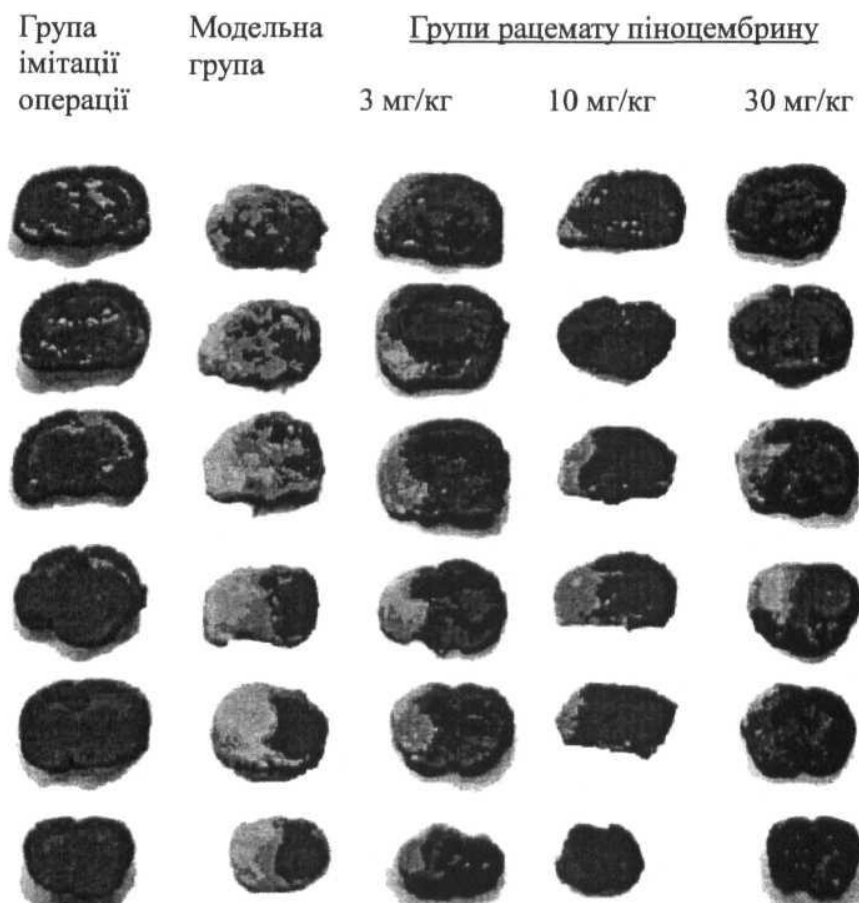
При порівнянні з групою імітації операції <sup>##</sup>P<0,01; при порівнянні з модельною групою \*P<0,05, \*\*P<0,01.

#### 4. Висновок

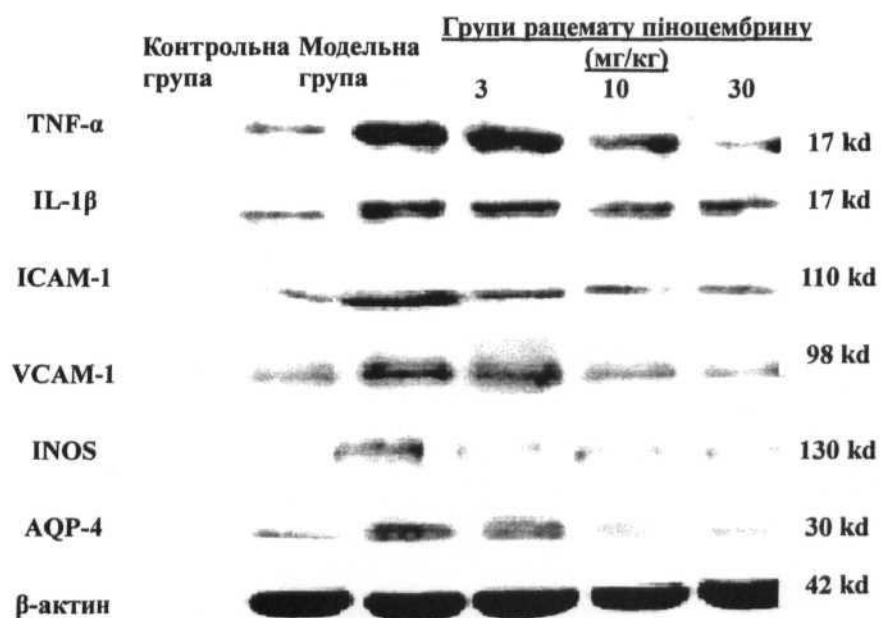
- Результати показали, що ін'єкція рацемату піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг) після 3 годин та 6 годин ішемії зменшувала порушення нейроповедінки та знижувала об'єм інфаркту та пом'якшувала набряк мозку. Активності були значними та показували гарний зв'язок доза-ефект. (R)-піноцембрин та (S)-піноцембрин показали значні ефекти, коли спочатку вводились ін'єкцією після 3 годин ішемії у щурів, але не були ефективними, коли спочатку вводились ін'єкцією після 6 годин ішемії. Німодипін не був суттєво ефективним в експериментальних умовах. Рацемат піноцембрину (1 мг/кг, 5 мг/кг, внутрішньовенно) мав гарні терапевтичні ефекти на гострий ішемічний удар у щурів, та його терапевтичний інтервал часу був приблизно 6 годин.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

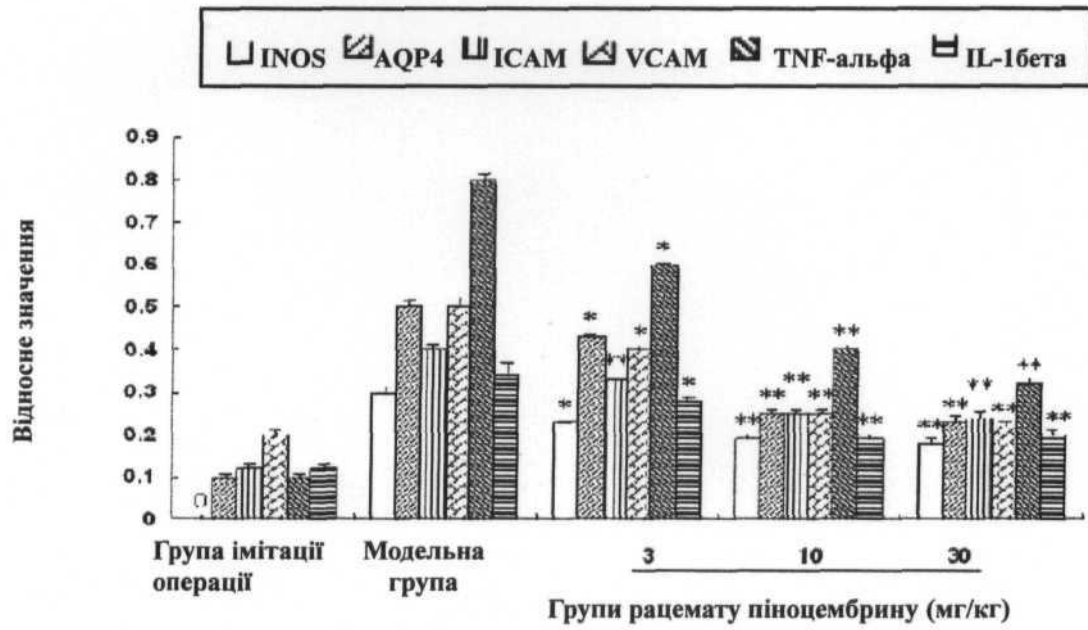
- Застосування рацемату піноцембрину, рацемату солі піноцембрину, рацемату попередника піноцембрину або рацемату гідрату піноцембрину у виробництві лікарського препарату для профілактики та лікування удару, викликаного гіпертонією.
- Фармацевтична композиція для профілактики та лікування удару, викликаного гіпертонією, яка містить рацемат піноцембрину, рацемат солі піноцембрину, рацемат попередника піноцембрину або рацемат гідрату піноцембрину та фармацевтично прийнятний наповнювач.
- Застосування (R)-піноцембрину або його солі, попередника або гідрату у виробництві лікарського препарату для профілактики та лікування удару, де лікарський препарат переважно не містить (S)-піноцембрин.
- Застосування за п. 3, де удар являє собою гострий ішемічний удар.
- Застосування за п. 3, де удар являє собою удар, викликаний гіпертонією.
- Фармацевтична композиція для профілактики та лікування удару, яка містить (R)-піноцембрин або його сіль, попередник або гідрат та фармацевтично прийнятний наповнювач, де лікарський препарат переважно не містить (S)-піноцембрин.



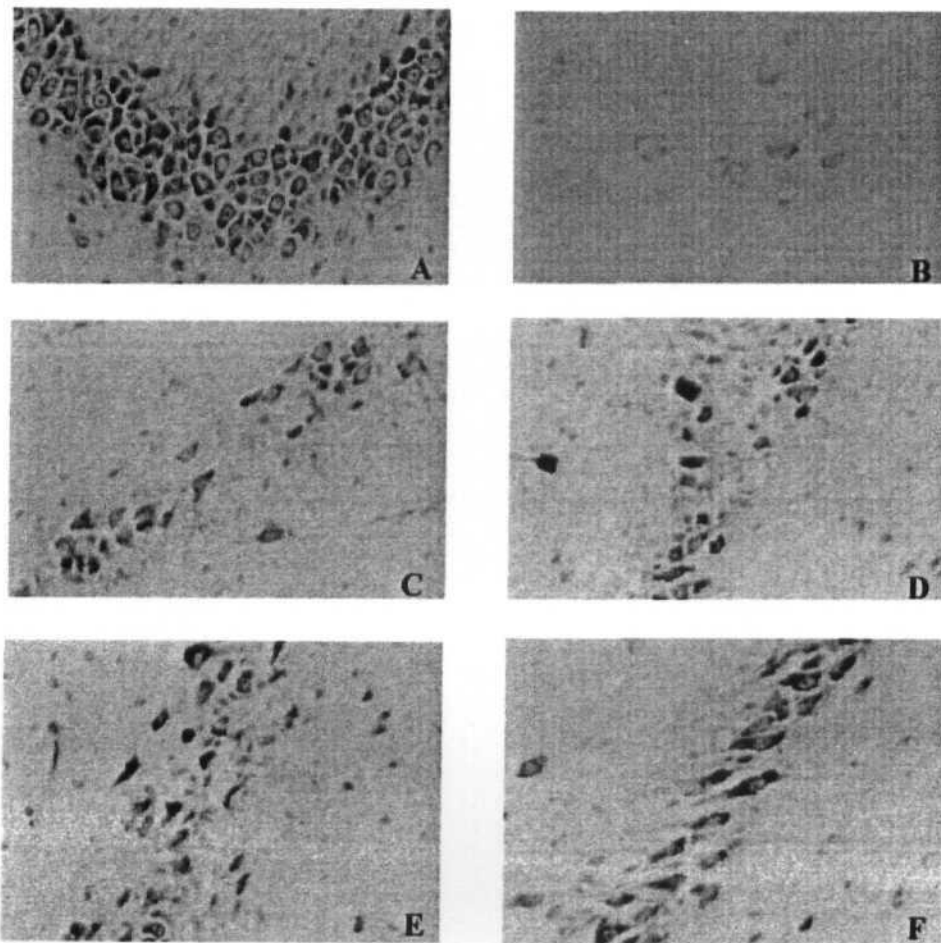
Фігура 1



Фігура 2-А



Фігура 2-В



Фігура 3

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

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

---

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