



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0044507

(51)^{2020.01} A61K 31/702; A61P 3/10; A61P 25/28; (13) B
A61P 29/00; A61P 25/04; A61P 25/16

-
- (21) 1-2021-00491 (22) 28/06/2019
(86) PCT/CN2019/093778 28/06/2019 (87) WO2020/001632 02/01/2021
(30) 201810721327.6 29/06/2018 CN
(45) 25/04/2025 445 (43) 25/05/2021 398A
(71) 1. SHANGHAI GREEN VALLEY PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)
421 Niudun Road, Zhang Jiang Hi-Tech Park, Pudong New Area, Shanghai 201203,
China
2. SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF
SCIENCES (CN)
555 Zuchongzhi Road, Zhang Jiang Hi-Tech Park, Pudong New Area, Shanghai
201203, China
(72) GENG, Meiyu (CN); ZHANG, Zhenqing (CN); JIN, Yingshen (CN); XIAO,
Zhongping (CN); DING, Jian (CN).
(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)
-

(54) CHẾ PHẨM ALGINIC SACARIT DIAXIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA LƯỢNG
HỮU HIỆU CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm alginic oligosacarit diaxit chứa điaxit mannuronic có công thức (IV) và muối được dụng của chúng, trong đó n là số nguyên được chọn từ 1 đến 9, m được chọn từ 0, 1 hoặc 2, m' được chọn từ 0 hoặc 1, và trong đó tổng trọng lượng của alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=1-5$ chiếm không ít hơn 60% tổng trọng lượng của chế phẩm; tổng trọng lượng của axit guluronic chiếm không nhiều hơn 50% tổng trọng lượng của chế phẩm. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và sản phẩm chăm sóc sức khỏe chứa chế phẩm này.

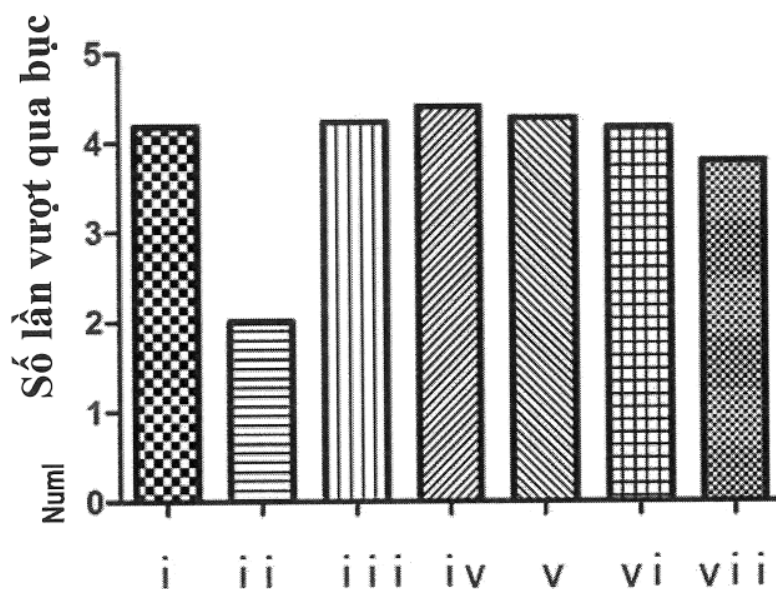
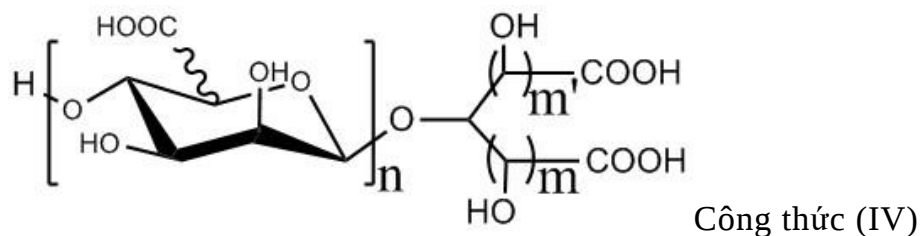


FIG.9

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

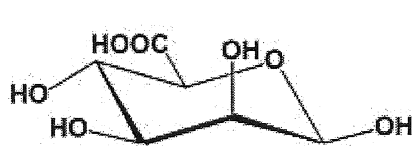
Sáng chế đề cập đến chế phẩm tối ưu của alginic oligosacarit điaxit thu được bằng phương pháp sàng lọc hoạt tính sinh học, sử dụng mô hình động vật mắc bệnh Alzheimer để đánh giá hiệu quả của mức độ polyme hóa khác nhau của alginic oligosacarit và các tỷ lệ của chúng về hoạt tính sinh. Cuối cùng, chế phẩm có hoạt tính sinh học tốt nhất thu được từ quá trình sàng lọc và chất đích mong muốn được điều chế bằng phương pháp phân tách màng siêu lọc.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến được phẩm và sản phẩm chăm sóc sức khỏe chứa chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

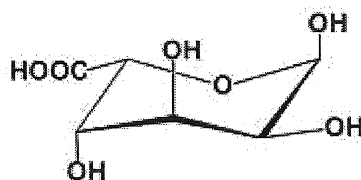
Alginic oligosacarit đã được chú ý rộng rãi do giá trị được phẩm tiềm năng của chúng. Alginic oligosacarit thường được điều chế bằng nhiều bước với axit alginic làm nguyên liệu thô.

Phân tử alginic oligosacarit của nguyên liệu thô, bao gồm phân đoạn M được tạo ra từ axit D-mannuronic được liên kết bởi liên kết β -1,4-glucosidic, phân đoạn G được tạo ra từ axit L-guluronic được liên kết bởi liên kết α -1,4-glucosidic, và phân đoạn MG được tạo ra bằng cách lai hai sacarit. Công thức cấu trúc của axit D-mannuronic và axit L-guluronic được thể hiện trong công thức (I) và công thức (II) như sau:



M; axit β -D-mannuronic

(I)

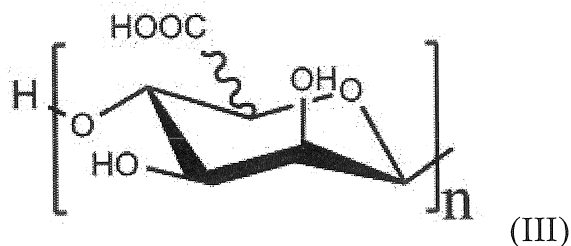


G; axit α -L- guluronic

(II)

Công thức cấu trúc của alginic oligosacarit được thể hiện trong công thức (III)

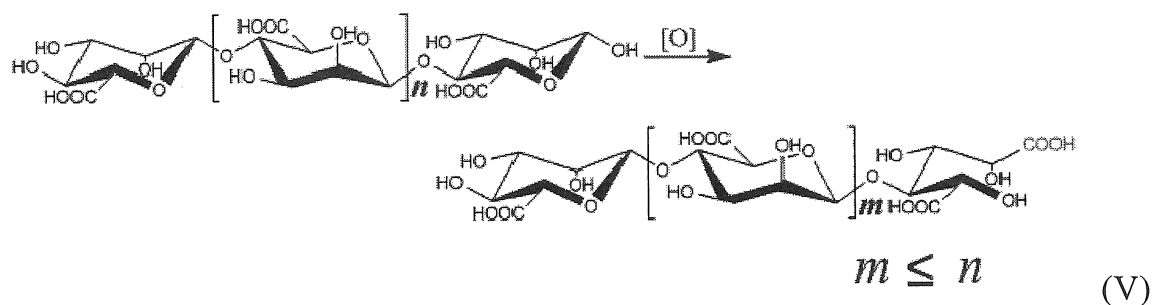
như sau :



Phân đoạn M và phân đoạn G có thể được tách từ nguyên liệu thô, axit alginic. Phương pháp chung có thể được mô tả được giản như sau: axit alginic được thoái biến sơ bộ để thu được hỗn hợp polysacarit của axit polymannuronic và axit polyguluronic; sau đó hỗn hợp polysacarit là đối tượng để kết tủa axit để loại bỏ lượng nhất định axit polyguluronic trong đó. Ví dụ, xem các phương pháp được bộc lộ trong đơn đăng ký sáng chế Trung Quốc số 98806637.8 và CN02823707.2.

Phương pháp để điều chế axit oligomeric mannuronic như sau: chất trung gian phân đoạn M thu được ở trên có thể là đối tượng để axit phân thêm bằng cách làm nóng dưới điều kiện axit để thu được đoạn nhỏ polyme của axit mannuronic có phạm vi trọng lượng phân tử mong muốn. Ngoài ra, hiệu quả thoái biến có thể được cải thiện bằng phương pháp thoái biến oxy hóa; trong khi đó, đầu khỉ có thể được oxy hóa thành diacid sacarit mở vòng, xem đơn đăng ký sáng chế Trung Quốc số 200580009396.5 (tài liệu sáng chế 1) được nộp bởi Meiyu Geng và cộng sự, và sáng chế Mỹ số 8,835,403 B2 (tài liệu sáng chế 2) một cách chi tiết. Để thuận tiện cho sự mô tả, tài liệu sáng chế 1 và 2 sau đây được gọi chung là các tài liệu trước, được đưa vào đây bằng cách tham chiếu toàn bộ.

Phản ứng để thu được diacid mannuronic được bộc lộ trong các tài liệu trước có thể được thể hiện bằng phương trình phản ứng (V) sau đây, đó là, nhóm aldehyt ở vị trí C1 của axit mannuronic ở đầu khỉ của polysacarit của axit oligomannuronic được oxy hóa thành nhóm cacboxyl.



Trong quá trình chuyển đổi oxy hóa ở trên, chất oxy hóa được sử dụng chung là dung dịch đồng sulfat kiềm, tức là thuốc thử Fehling. Các tài liệu trước áp dụng phương pháp oxy hóa này. Đặc biệt là, trong điều kiện kiềm, chất nền phản ứng axit polymannuronic, tức là chất trung gian phân đoạn M, được bổ sung vào dung dịch đồng sulfat và được phản ứng trong bể nước sôi trong 15 phút đến 2 giờ. Phương pháp này sử dụng ion Cu^{2+} làm chất oxy hóa để oxy hóa nhóm aldehyt, và chất kết tủa đồng oxit màu đỏ gạch được tạo ra trong phản ứng này. Phản ứng này thường được sử dụng để xác định đường khử.

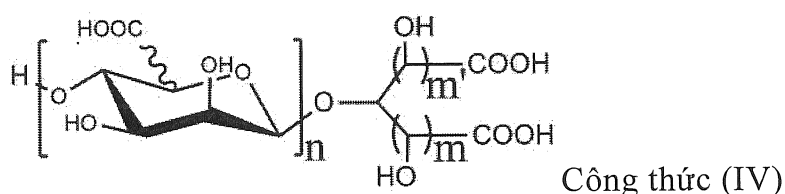
Các tài liệu trước bộc lộ rằng axit oligomannaric có hiệu quả chống lại bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease - AD) và bệnh đái tháo đường (Diabetes Mellitus), và hoạt tính của axit oligomannaric có mức độ polyme hóa 6 là tốt nhất. Sự phát sinh bệnh Alzheimer và bệnh đái tháo đường typ 2 liên quan chặt chẽ với amyloid (β -amyloid và amylin). Protein amyloid kết tụ và sau đó tạo ra oligome protein, mà kết tụ thêm để tạo ra sợi. Khối kết tụ protein này có tính độc tế bào, cảm ứng phản ứng oxy hóa trong tế bào để làm tổn thương ty thể, và kích hoạt phản ứng theo tầng chẳng hạn như phản ứng viêm, gây thương tổn số lượng lớn neuron và tế bào β , và cuối cùng dẫn đến khởi phát bệnh Alzheimer và đái tháo đường typ 2. Axit oligomannaric nhắm đích protein amyloid và protein và đối kháng các phản ứng theo tầng được cảm ứng bởi protein amyloid, và do đó có hiệu quả phòng trừ và điều trị bệnh Alzheimer và đái tháo đường typ 2.

Để thu được axit oligomannaric có hiệu quả chống lại bệnh Alzheimer và chống lại bệnh đái tháo đường đã được bộc lộ trong các tài liệu trước, axit guluronic trong nguyên liệu thô axit alginic cần được loại bỏ. Hàm lượng của axit guluronic trong axit

alginic thường hơn 30%, tối đa lên đến khoảng 70%. Do đó, để thu được axit oligomannuronic tinh khiết cao, chi phí sản xuất thực tế rất cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến chế phẩm alginic oligosacarit diaxit bao gồm axit mannuronic có công thức (IV) và/hoặc axit guluronic hoặc muối được dụng của chúng:



trong đó n là số nguyên được chọn từ 1 đến 9, m được chọn từ 0, 1 hoặc 2, m' được chọn từ 0 hoặc 1,

và trong đó,

tổng trọng lượng của alginic oligosacarin diaxit trong đó n=1-5 chiếm không ít hơn 60% tổng trọng lượng của chế phẩm; tổng trọng lượng của diaxit guluronic chiếm không nhiều hơn 50% tổng trọng lượng của chế phẩm.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến được phẩm hoặc sản phẩm bảo vệ sức khỏe, bao gồm chế phẩm axit alginic oligosacarin. Các khía cạnh khác của sáng chế cũng đề xuất ứng dụng của chế phẩm axit alginic oligosacarin trong điều trị các bệnh được chọn từ bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, viêm, đau, đái tháo đường hoặc sa sút trí tuệ não mạch.

Cụ thể là, chế phẩm axit alginic oligosacarin theo sáng chế là hỗn hợp của axit mannuronic và axit guluronic có các mức độ polyme hóa khác nhau, và thành phần chính là oligosacarin có mức độ polyme hóa từ 2 đến 10 : phân đoạn M được tạo ra từ axit mannuronic được liên kết bởi liên kết β -1,4-glucosidic, phân đoạn G được tạo ra từ axit guluronic được liên kết bởi liên kết α -1,4-glucosidic, và phân đoạn MG được tạo ra bằng cách lai hai sacarin. Được biết rằng diaxit mannuronic có các hoạt tính được lý nhất định chống lại bệnh Alzheimer (AD) và bệnh đái tháo đường. Các sacarin

hoạt động mạnh nhất là pentasacarit đến octasacarit, đặc biệt là hexasacarit. Tuy nhiên, các tác giả tìm ra rằng hỗn hợp diaxit oligosacarin của axit mannuronic và axit guluronic có mức độ polyme hóa từ 2 đến 10 cũng có các hoạt tính dược lý chống lại bệnh Alzheimer (AD) và bệnh đái tháo đường, nhưng tiền đề là hàm lượng axit guluronic được kiểm soát trong phạm vi nhất định. Nói cách khác, chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế có thể được điều chế với chi phí sản xuất giảm đáng kể, giúp dễ dàng thực hiện hơn trong sản xuất thực tế và dễ dàng thực hiện sản xuất hàng loạt công nghiệp hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện phổ NMR của chất trung gian.

Fig. 2 thể hiện khối phổ của disacarit, trisacarit và tetrasacarit trong sản phẩm A.

Fig. 3 thể hiện khối phổ của pentasacarit, hexasacarit và heptasacarit trong sản phẩm A.

Fig. 4 thể hiện khối phổ của octasacarit, nonasacarit và decasacarit trong sản phẩm A.

Fig. 5 thể hiện phổ NMR của sản phẩm A.

Fig. 6 thể hiện phổ NMR của sản phẩm B.

Fig. 7 thể hiện phổ NMR của sản phẩm C.

Fig. 8 thể hiện phổ NMR của sản phẩm D.

Fig. 9 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên số lần động vật AD vượt qua bức. Các mẫu tương ứng với các số trên trục hoành trong hình như sau: i: nhóm đối chứng; ii: nhóm mô hình; iii: sản phẩm A; iv: sản phẩm B; v: sản phẩm C; vi: sản phẩm D; vii: hexasacarit của diaxit mannuronic.

Fig. 10 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên khoảng cách bơi của động vật AD; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 11 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên thời gian leo xuống của động vật PD vào ngày 11; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 12 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên độ tiềm ẩn của động vật PD vào ngày 11; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 13a và Fig. 13b thể hiện hiệu quả điều trị của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic đối với bệnh viêm ruột ở chuột; các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 14 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên đường huyết sau ăn ở chuột mắc bệnh đái tháo đường; các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 15 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên độ tiềm ẩn của phản ứng quần quại ở chuột được cảm ứng bởi axit axetic; các mẫu tương ứng với các số trên trục hoành trong hình như sau: i: nhóm mô hình; ii: sản phẩm A; iii: sản phẩm B; iv: sản phẩm C; v: sản phẩm D; vi: hexasacarit của diaxit mannuronic.

Fig. 16 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên số lần phản ứng quần quại ở chuột được cảm ứng bởi axit axetic; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 15.

Fig. 17 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên số lần gãi đầu ở chuột đau nửa đầu được cảm ứng bởi nitroglycerin; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 18 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên số lượng tế bào dương tính c-fos trong phần đuôi (*nucleus caudalis*) của nhân dây thần kinh sinh ba tủy sống ở chuột đau nửa đầu được cảm ứng

bởi kích thích điện hạch dây thần kinh sinh ba; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 19 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên độ tiềm ẩn trong thử nghiệm tránh bóng tối ở chuột mắc chứng sa sút trí tuệ não mạch do tắc động mạch cảnh chung hai bên; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 20 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên số lần mắc lỗi trong thử nghiệm tránh bóng tối ở chuột mắc chứng sa sút trí tuệ não mạch do tắc động mạch cảnh chung hai bên; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Fig. 21 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên Độ tiềm ẩn thoát ra trong thử nghiệm mê cung nước ở chuột mắc chứng sa sút trí tuệ não mạch do tắc động mạch cảnh chung hai bên; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

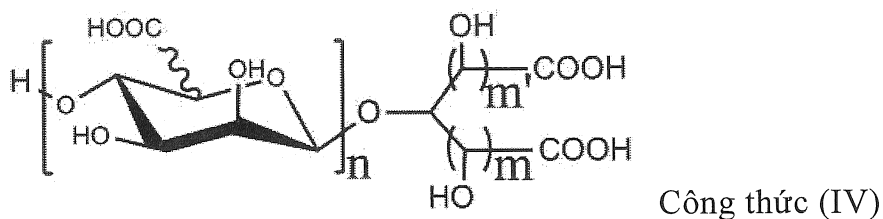
Fig. 22 thể hiện hiệu quả của các chế phẩm oligosacarit khác nhau và hexasacarit của diaxit mannuronic lên số lần vượt qua bức ở chuột mắc chứng sa sút trí tuệ não mạch do tắc động mạch cảnh chung hai bên; trong đó các ký hiệu trên trục hoành trong hình là giống với các ký hiệu trong Fig. 9.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các khía cạnh khác nhau của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bên dưới, nhưng sáng chế không giới hạn ở các phương án cụ thể này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện một số sửa đổi và điều chỉnh đối với sáng chế theo sự bộc lộ đáng kể bên dưới, và những điều chỉnh này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Chế phẩm alginic oligosacarit diaxit

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến chế phẩm alginic oligosacarit diaxit chứa axit mannuronic có công thức (IV) và/hoặc axit guluronic hoặc muối được dụng của chúng:



trong đó n là số nguyên từ 1 đến 9, m được chọn từ 0, 1 hoặc 2, m' được chọn từ 0 hoặc 1,

và trong đó,

tổng trọng lượng của alginic oligosaccharit diaxit trong đó $n=1-5$ chiếm không ít hơn 60% tổng trọng lượng của chế phẩm;

trong đó, tổng trọng lượng của diaxit guluronic chiếm không nhiều hơn 50% tổng trọng lượng của chế phẩm.

Chế phẩm axit alginic oligosaccharic theo sáng chế là hỗn hợp của axit mannuronic và axit guluronic với các mức độ polyme hóa khác nhau, và các thành phần chính của nó là oligosaccharit có mức độ polyme hóa từ 2 đến 10 : phân đoạn M được tạo ra từ các axit mannuronic được liên kết bởi các liên kết β -1,4-glucosidic, phân đoạn G được tạo ra từ các axit guluronic được liên kết bởi các liên kết α -1,4-glucosidic, và phân đoạn MG được tạo ra bằng cách lai hai sacarit. Theo các ứng dụng trước, được biết rằng diaxit mannuronic có hoạt tính được lý chống lại bệnh Alzheimer (AD) và bệnh đái tháo đường, trong đó các sacarit hoạt động mạnh nhất trong các diaxit mannuronic là pentasacarit đến octasacarit, đặc biệt là hexasacarit. Tuy nhiên, khác với các kỹ thuật đã biết trước đây, các tác giả tìm thấy rằng hỗn hợp diaxit oligosaccharic của axit mannuronic và axit guluronic có mức độ polyme hóa từ 2 đến 10 cũng có các hoạt tính được lý chống lại bệnh Alzheimer (AD) và bệnh đái tháo đường, nhưng hàm lượng của axit guluronic cần được kiểm soát trong phạm vi nhất định.

Trong quy trình điều chế thực tế, hàm lượng axit guluronic trong sản phẩm sau khi thoái biến sơ bộ của axit alginic gốc như đã mô tả ở trên thường hơn 30%, và tối đa lên đến khoảng 70%. Nếu theo các ứng dụng trước, để thu được axit oligomannaric có hoạt tính cao, axit guluronic phải được loại bỏ thông qua phương pháp tách cang

hiệu càng tốt. Tuy nhiên, dựa trên khám phá trên của các tác giả, không cần thiết phải tách và loại bỏ axit guluronic khỏi sản phẩm thoái biến. Hơn nữa, các tác giả nhận thấy rằng bằng cách kiểm soát tỷ lệ axit guluronic trong phạm vi nhất định thông qua việc kiểm soát các điều kiện của phản ứng kết tủa axit, hoạt tính của chế phẩm thu được có thể đạt hoặc thậm chí tốt hơn hoạt tính của hexasacarit của axit oligomannaric đã được bộc lộ trong các ứng dụng trước. Ngoài ra, vì axit guluronic không cần phải loại bỏ như là tạp chất, sản lượng sản phẩm cao hơn đáng kể so với năng suất sản phẩm được bộc lộ trong các ứng dụng trước. Do đó, giúp làm giảm đáng kể chi phí sản xuất, giảm xả thải, do đó dễ dàng thực hiện trong thực tế sản xuất, và dễ dàng thực hiện sản xuất công nghiệp quy mô lớn.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=1-5$ chiếm 80-95% tổng trọng lượng của chế phẩm và tổng trọng lượng của các axit guluronic chiếm không nhiều hơn 50% tổng trọng lượng của chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, tỷ lệ tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit có mức độ polyme hóa thấp trong đó $n=1-3$ so với tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit có mức độ polyme hóa thấp trong đó $n=4-7$ là giữa 1,0 và 3,5.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm oligosacarit của alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $m+m'=1$ hoặc 2 là ít hơn 50% tổng trọng lượng của chế phẩm, tốt hơn là 60%-90%, tốt hơn nữa là 70%-90%. Cụ thể là, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit, tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $m+m'=1$ là ít hơn 10% tổng trọng lượng của chế phẩm, tốt hơn là 30-40%. Theo phương án được ưu tiên khác, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit, tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $m+m'=2$ là ít hơn 10% tổng trọng lượng của chế phẩm, tốt hơn là 30-50%.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=1-5$ chiếm 80-95% tổng trọng lượng của chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=1-3$ chiếm 20-70% tổng trọng lượng của chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, tỷ lệ trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=1-3$ so với tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=4-7$ là giữa 1,0 và 3,5, tốt hơn là giữa 1,0 và 3,0.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, hàm lượng phần trăm trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit với từng mức độ polyme hóa trong chế phẩm trên là: disacarit 5-25%, trisacarit 15-30%, tetrasacarit 15-28%, pentasacarit 10-25%, hexasacarit 5-15%, heptasacarit 3-10%, octasacarit 2-5%, nonasacarit 1-5%, decasacarit 1-5%. Cụ thể là, trong chế phẩm, hàm lượng phần trăm trọng lượng của các oligosacarit trong chế phẩm trên là: disacarit 10-20%, trisacarit 18-30%, tetrasacarit 15-28%, pentasacarit 15-20%, hexasacarit 5-10%, heptasacarit 3-5%, octasacarit 2-3%, nonasacarit 1-3%, decasacarit 1-3%.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, tổng trọng lượng của các axit guluronic chiếm 0,1-50% tổng trọng lượng của chế phẩm, tốt hơn là 1-30%.

Trong chế phẩm alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế, muối được dụng của chúng là muối natri và muối kali.

Phương pháp điều chế chế phẩm alginic oligosacarit diaxit

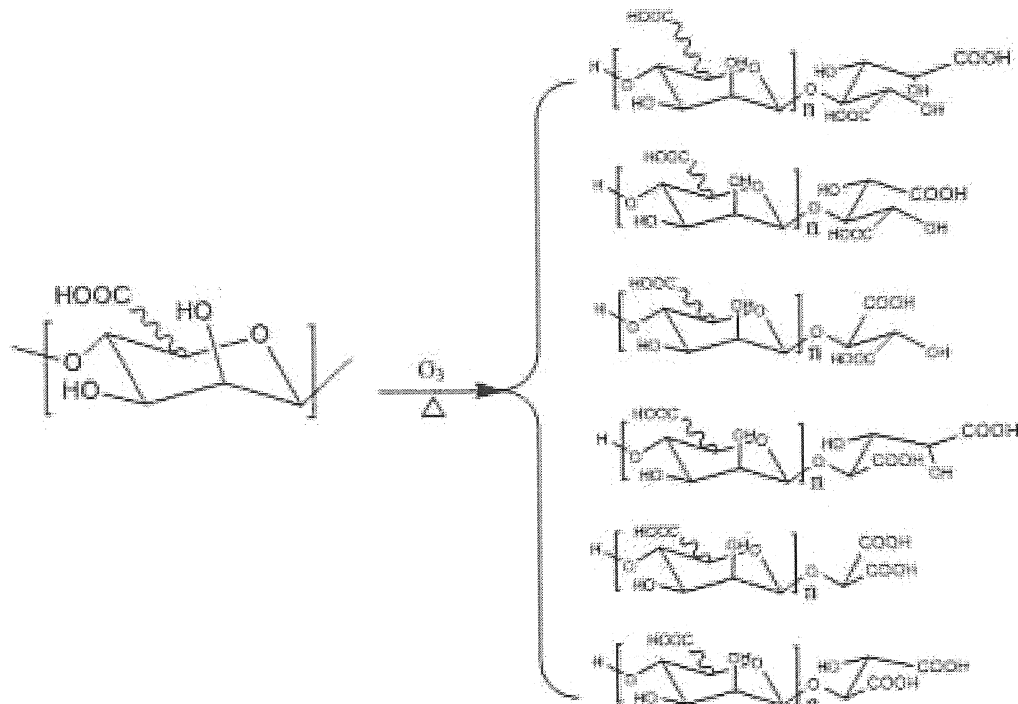
Quy trình điều chế alginic oligosacarit diaxit theo sáng chế được tóm tắt như sau:

Sau sự thoái biến sơ bộ của axit alginic, thu được hỗn hợp polysacarit của axit polymannuronic và axit polyguluronic. Sau đó kết tủa hỗn hợp polysacarit bằng phương pháp axit để loại bỏ lượng nhất định axit polyguluronic. Trong quy trình kết

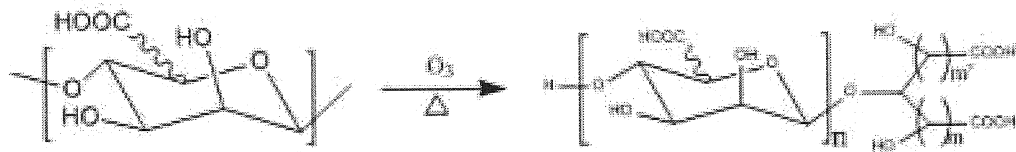
tủa bằng phương pháp axit, pH càng cao, thì hàm lượng axit polyguluronic trong hỗn hợp polysacarit càng cao. Ví dụ, xem các phương pháp đã được bộc lộ trong đơn đăng ký sáng chế Trung Quốc số 98806637.8 và CN02823707.2. Khi có mặt chất oxy hóa, các mạch đường của hỗn hợp polysacarit nói trên trải qua quá trình thoái hóa oxy hóa để thu được các oligosacarit bị oxy hóa với các mức độ polyme hóa khác nhau. Các oligosacarit bị oxy hóa được đặc trưng bởi quá trình oxy hóa axit mannuronic hoặc axit guluronic ở đầu khử của oligosacarit thành diaxit sacaric có 3-6 cacbon.

Chất oxy hóa có hiệu quả đặc biệt trong phản ứng theo sáng chế là ozon. Trong quá trình phản ứng, phản ứng thoái biến oxy hóa của các mạch đường có thể xảy ra khi sục ozon vào dung dịch chứa hỗn hợp polysacarit. Nhiệt độ mà tại đó bước thoái biến oxy hoá được thực hiện tốt hơn là 0-70 °C, tốt hơn nữa là 10-45 °C. Giá trị pH của bước thoái biến oxy hóa ở trên là 3-13, tốt hơn là 4-10, tốt hơn nữa là 6-8.

Phản ứng thoái biến oxy hóa sử dụng ozon theo sáng chế, thủy phân có tính axit với sự có mặt của đồng sunfat kiềm (tài liệu trước) hoặc hydro peroxit và natri hypoclorit (Đơn đăng ký sáng chế Trung Quốc 01107952.5) được sử dụng trong các kỹ thuật trước đây phổ biến ở chỗ ba phương pháp có thể làm thoái biến các mạch đường. Sự khác biệt là cấu trúc đầu khử của mạch đường của sản phẩm thoái biến là khác nhau. Đầu khử của sản phẩm thoái biến oxy hóa, axit mannuronic hoặc axit guluronic, thu được theo sáng chế bao gồm cấu trúc diaxit với 3-6 cacbon. Ngoài ra, quy trình được sử dụng trong bước thoái biến oxy hóa theo sáng chế còn có các ưu điểm khác: 1. điều kiện phản ứng nhẹ và không cần điều kiện phản ứng đặc biệt; 2. ozon được sử dụng có thể được điều chế tại nơi phản ứng, giảm áp lực vận chuyển trong sản xuất công nghiệp; 3. sau phản ứng, ozon tự động được phân hủy thành oxy mà không cần các chất phản ứng tồn dư gây nguy hiểm nên cũng không gây ô nhiễm môi trường. Quá trình phản ứng được thể hiện trong phương trình sau (VI):



Phản ứng ở trên có thể được đơn giản hóa như sau:



(VI)

Trong lược đồ của phương trình phản ứng (VI) và công thức hợp chất chung (IV) ở trên,

Các oligosacarit trong đó $m=2$ và $m'=1$ là các axit sacaric có 6 cacbon ở cuối;

Các oligosacarit trong đó $m=1$ và $m'=1$ hoặc $m=2$ và $m'=0$ là các axit sacaric có 5 cacbon ở cuối;

Các oligosacarit trong đó $m=1$ và $m'=0$ hoặc $m=0$ và $m'=1$ là các axit sacaric có 4 cacbon ở cuối;

Các oligosacarit trong đó $m=0$ và $m'=0$ là các axit sacaric có 3 cacbon ở cuối.

Trong chế phẩm, tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=1-5$ chiếm 80-95% tổng trọng lượng của chế phẩm, tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=1-3$ chiếm 20-70% tổng trọng lượng của chế phẩm, trong đó tỷ lệ tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=1-3$ so với tổng trọng lượng của các alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=4-7$ là giữa 1,0 và 3,5, tốt hơn là giữa 1,0 và 3,0. Tổng trọng lượng của các axit guluronic chiếm không nhiều hơn 50% tổng trọng lượng của chế phẩm, tốt hơn là giữa 0,1% và 50%, tốt nhất là giữa 1% và 30%.

Theo phương án điển hình, phương pháp điều chế theo sáng chế bao gồm các bước sau:

(1) Điều chế các sản phẩm alginic oligosacarit diaxit:

Điều chế hỗn hợp các polysacarit của axit polymannuronic và axit polyguluronic. Như đã được mô tả ở trên, nguyên liệu thô được sử dụng trong sáng chế, hỗn hợp các polysacarit của axit polymannuronic và axit polyguluronic, có thể được điều chế bằng phương pháp đã biết trong các kỹ thuật trước, ví dụ, các phương pháp đã được bộc lộ trong đơn đăng lý sáng chế Trung Quốc số 98806637.8 và CN02823707.2. Phương pháp chung có thể được mô tả đơn giản như sau: thoái biến sơ bộ axit alginic để thu được hỗn hợp các polysacarit của axit polymannuronic và axit polyguluronic. Sau khi hỗn hợp các polysacarit là đối tượng để kết tủa axit một lần nữa, có thể điều chỉnh hàm lượng một phần của axit polyguluronic để thu được hỗn hợp các polysacarit của axit polymannuronic và axit polyguluronic.

Sự thoái biến oxy hóa ozon. Hòa tan hỗn hợp các polysacarit trong lượng nước thích hợp và khuấy ở nhiệt độ phòng hoặc dưới điều kiện đun nóng. Với việc sục ozon liên tục, phản ứng bắt đầu. Điều chỉnh giá trị pH của phản ứng đến 3-13, tốt hơn là 4-10, tốt hơn nữa là 6-8 bằng cách bổ sung từng giọt axit clohydric loãng hoặc dung dịch NaOH loãng. Nhiệt độ tốt hơn là 0-70 °C, tốt hơn nữa là 10-45 °C. Sau khi phản ứng hoàn thành, dừng sục khí và điều chỉnh pH thành trung tính.

Phân tách màng và tinh sạch. Điều chế sản phẩm phản ứng thu được ở trên thành dung dịch oet nồng độ khoảng 10% và được phân tách bởi màng ngăn phân tử để loại bỏ các sản phẩm thoái hóa thấp hơn monosacarit. Thu phần được giữ lại. MWCO màng ngăn phân tử được sử dụng là 1000 Da - 3000 Da, tốt hơn là 2000 Da. Cô đặc chất lỏng thu được trên máy cô quay và làm khô trong chân không để thu được hỗn hợp oligomeric alginic oligosacarit. Sau khi phân tích, nhận thấy rằng các sản phẩm này là tất cả các chế phẩm của oligosacarit từ disacarit đến decasacarit với hàm lượng nằm trong phạm vi tỷ lệ nhất định. Các ví dụ 1-3 thể hiện điển hình các phương pháp đã nêu.

(2) So sánh hoạt tính của các chế phẩm oligosacarit

Hoạt tính được lý của chế phẩm oligosacarit theo sáng chế được so sánh với hexasacarit của axit oligomannaric trong các ứng dụng trước cùng lúc. Kết quả thể hiện rằng hoạt tính được lý của chế phẩm oligosacarit theo sáng chế cao hơn đáng kể so với hexasacarit của axit oligomannaric trong các ứng dụng trước. Không bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào, người ta tin rằng khi tỷ lệ disacarit so với hexasacarit trong chế phẩm cao hơn 60%, và tổng trọng lượng của axit guluronic chiếm không nhiều hơn 50% trong lượng của chế phẩm, thì chế phẩm hoạt động mạnh nhất; nhưng khi tỷ lệ axit guluronic vượt quá 60% thì hoạt tính của chế phẩm cũng sẽ giảm đi.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm hoặc sản phẩm chăm sóc sức khỏe chứa chế phẩm alginic oligosacarit như đã được mô tả ở trên và chất mang hoặc tá dược được dùng tùy chọn.

Như đã được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995), các phương pháp để điều chế thuốc của chế phẩm oligosacarit bao gồm các tỷ lệ khác nhau của các hoạt chất đã biết, hoặc hiển nhiên đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa trên sự bộc lộ của sáng chế. Các phương pháp để điều chế được phẩm bao gồm sự kết hợp các tá dược được phẩm thích hợp, chất mang, chất pha loãng và các chất tương tự.

Các chế phẩm được theo sáng chế được điều chế bằng các phương pháp đã biết, bao gồm cả các phương pháp trộn, hòa tan hoặc đông khô thông thường.

Dược phẩm theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân bằng nhiều đường khác nhau phù hợp với kiểu dùng đã chọn, chẳng hạn như đường uống hoặc đường tiêm (đường tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tại chỗ hoặc dưới da).

Do đó, thuốc chế phẩm theo sáng chế được kết hợp với chất mang dược dụng (như chất pha loãng trợ hoặc chất mang có thể ăn được) có thể được dùng một cách hệ thống, ví dụ, bằng đường uống. Chúng có thể được bao trong viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm và có thể được nén thành viên nén. Đối với việc điều trị bằng đường uống, hợp chất hoạt tính theo sáng chế có thể được kết hợp với một hoặc nhiều tá dược và được sử dụng dưới dạng viên nén nuốt được, viên nén thuộc miệng, viên ngậm, viên nang, thuốc uống, hỗn dịch, siro, viên nén tròn, v.v. Các chế phẩm này nên chứa ít nhất 0,1% hợp chất hoạt tính. Tất nhiên, tỷ lệ của các chế phẩm và công thức này có thể thay đổi, và có thể chứa từ khoảng 1% đến khoảng 99% trọng lượng của một dạng liều đơn vị nhất định. Trong các chế phẩm hữu ích về mặt điều trị này, lượng hợp chất hoạt tính sao cho có thể đạt được mức liều lượng hiệu quả.

Viên nén dài, viên ngậm, thuốc viên, viên nang, v.v. cũng có thể bao gồm: chất kết dính, chẳng hạn như nhựa tragacan, gôm arabic, tinh bột ngô hoặc gelatin; tá dược, chẳng hạn như đicacxi phosphat; và chất phân tan, chẳng hạn như tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, axit alginic, v.v.; chất bôi trơn, chẳng hạn như magie stearat; và chất tạo ngọt, chẳng hạn như sucroza, fructoza, lactoza hoặc aspartam; hoặc chất tạo hương vị chẳng như bạc hà, dầu cây lộc đề, hoặc vị anh đào. Khi dạng liều đơn vị là viên nang, ngoài các loại nguyên liệu nêu trên, nó có thể chứa là chất mang lỏng chẳng hạn như dầu thực vật hoặc polyetylen glycol. Nhiều nguyên liệu khác có thể có mặt dưới dạng lớp phủ hoặc theo cách khác cải biến dạng vật lý của dạng liều đơn vị rắn. Ví dụ, thuốc viên, viên nén tròn, hoặc viên nang có thể được phủ bằng gelatin, sáp, senlac, hoặc đường, và tương tự. Siro hoặc dịch chiết có thể chứa hợp chất hoạt tính, sucroza hoặc fructoza làm chất tạo ngọt, methyl paraben hoặc propyl paraben làm chất bảo quản, chất tạo màu hoặc chất tạo hương vị (chẳng hạn như hương anh đào hoặc hương cam). Tất

nhiên, nguyên liệu bất kỳ được sử dụng để điều chế dạng liều đơn vị bất kỳ nên là được dụng và không độc với lượng được dùng. Ngoài ra, hợp chất hoạt tính có thể được kết hợp vào các chế phẩm giải phóng duy trì và thiết bị giải phóng duy trì.

Hợp chất có hoạt tính có thể cũng được dùng cho tĩnh mạch hoặc màng bụng bằng cách truyền hoặc tiêm. Dung dịch nước của hợp chất hoạt động hoặc muối của nó có thể được điều chế, tùy chọn với chất hoạt động bề mặt không độc có thể trộn lẫn. Các chất phân tan trong glycerin, polyetylen glycol lỏng, triaxetin, và hỗn hợp của chúng và dầu cũng có thể được điều chế. Trong điều kiện bảo quản và sử dụng thông thường, chất phẩm này chứa chất bảo quản để ngăn sự sinh trưởng của vi sinh vật.

Các dạng liều được dụng thích hợp để tiêm hoặc truyền có thể chứa dung dịch nước vô trùng hoặc chất phân tán hoặc bột vô trùng của các hoạt chất (được bọc kín tùy chọn trong liposom) bao gồm chế phẩm dùng ngay tức thì thích hợp cho dung dịch vô trùng để tiêm hoặc truyền hoặc các chất phân tán. Trong tất cả các trường hợp, dạng liều lượng cuối phải vô trùng, lỏng và ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản. Chất mang lỏng có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán lỏng bao gồm, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng, v.v), dầu thực vật, glyxerit không độc, và hỗn hợp thích hợp của chúng. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ bằng cách tạo liposom, bằng cách duy trì kích thước hạt yêu cầu trong trường hợp chất phân tán, hoặc bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Các chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau (chẳng hạn như paraben, clorobutanol, phenol, axit sorbic, thimerosal, v.v) có thể được sử dụng để ngăn ngừa vi sinh vật. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, đệm hoặc natri clorua. Sự hấp thụ kéo dài của chế phẩm tiêm được có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các chất làm chậm sự hấp thụ, (ví dụ, nhôm monostearat và gelatin).

Dung dịch có thể tiêm được vô trùng được điều chế bằng cách kết hợp lượng cần thiết hợp chất hoạt tính trong dung môi thích hợp với các thành phần khác nhau được liệt kê ở trên, khi cần thiết, sau đó là lọc vô trùng. Trong trường hợp bột vô trùng dùng cho quá trình điều chế dung dịch có thể tiêm được vô trùng, phương pháp điều chế

được ưu tiên là làm khô trong chân không và các kỹ thuật đông khô, mà sẽ tạo ra bột hoạt chất cộng với thành phần cần thiết bất kỳ trong dung dịch lọc vô trùng trước đó.

Chất mang rắn hữu ích bao gồm chất rắn nghiền thành bột (ví dụ, đá tan, đất sét, xenluloza vi tinh thể, silic, nhôm, v.v). Chất mang lỏng hữu ích bao gồm nước, etanol, etylen glycol hoặc hỗn hợp etanol/etylen glycol-nước, và thuốc kết hợp theo sáng chế có thể được hòa tan hoặc phân tán trong hàm lượng hiệu quả tùy chọn với sự trợ giúp của chất hoạt động bề mặt không độc. Tá dược (như chất tạo mùi) và chất kháng khuẩn bổ sung có thể được bổ sung để tối ưu hóa đặc tính sử dụng nhất định.

Chất làm đặc (như polyme tổng hợp, axit béo, muối và este của axit béo, rượu béo, xenluloza cải biến hoặc nguyên liệu vô cơ cải biến) cũng có thể được sử dụng với chất mang lỏng để tạo ra bột nhão có thể phủ được, gel, thuốc mỡ, xà phòng, v.v. mà có thể được dùng trực tiếp trên da người dùng.

Lượng hợp chất cần thiết để điều trị hoặc hỗn hợp của chúng phụ thuộc không chỉ vào chính hợp chất, mà còn phụ thuộc vào phương pháp dùng, bản chất của bệnh được điều trị, và tuổi và tình trạng bệnh nhân, cuối cùng phụ thuộc vào quyết định của bác sĩ hoặc bác sĩ lâm sàng.

Chế phẩm nêu trên có thể được thể hiện ở dạng liều đơn vị, là đơn vị phân tán vật lý chứa liều đơn vị, và thích hợp để dùng cho người và cơ thể động vật có vú khác. Dạng liều đơn vị có thể là viên nang hoặc viên nén, hoặc nhiều viên nang hoặc viên nén. Phụ thuộc vào sự điều trị cụ thể liên quan, lượng của liều đơn vị của hoạt chất có thể khác nhau và được điều chỉnh trong khoảng từ 0,1 đến 1000 mg hoặc hơn.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất dược phẩm hoặc sản phẩm chăm sóc sức khỏe, chứa chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế và chất mang thích hợp nếu cần thiết.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả cách sử dụng chế phẩm alginic oligosacarit để điều trị bệnh Alzheimer.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer, trong đó bao gồm việc dùng cho những bệnh nhân cần đến chúng một lượng hữu hiệu của chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả cách sử dụng chế phẩm alginic oligosacarit để điều trị bệnh Parkinson.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer, trong đó bao gồm việc dùng cho những bệnh nhân cần đến chúng một lượng hữu hiệu của chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế mô tả cách sử dụng chế phẩm alginic oligosacarit để điều trị viêm.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhân bị viêm, trong đó bao gồm việc dùng cho những bệnh nhân cần đến chúng một lượng hữu hiệu của chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả cách sử dụng chế phẩm alginic oligosacarit để điều trị các phản ứng đau.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhân bị đau, trong đó bao gồm việc dùng cho những bệnh nhân cần đến chúng một lượng hữu hiệu của chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả cách sử dụng chế phẩm alginic oligosacarit để điều trị bệnh đái tháo đường.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường, trong đó bao gồm việc dùng cho những bệnh nhân cần đến chúng một lượng hữu hiệu của chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế mô tả cách sử dụng chế phẩm alginic oligosacarit để điều trị bệnh sa sút trí tuệ não mạch.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhân mắc bệnh sa sút trí tuệ não mạch, trong đó bao gồm việc dùng cho những bệnh nhân cần đến chúng một lượng hữu hiệu của chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế.

Đau được đề cập trong sáng chế bao gồm các cơn đau khác nhau, bao gồm đau cấp tính, đau mãn tính, đau thần kinh, đau sau phẫu thuật, đau thắt lưng mãn tính, đau đầu cụm, đau dây thần kinh herpes, đau chân tay, đau trung tâm, đau răng, đau kháng opioid, đau nội tạng, đau do phẫu thuật, đau do chấn thương xương, mệt mỏi và đau khi sinh con, đau do bỏng bao gồm cháy nắng, đau sau sinh, đau nửa đầu, đau thắt ngực, và đau liên quan đến đường sinh dục (bao gồm cả viêm bàng quang), đau mạch máu, đau dây thần kinh sinh ba, đau dây thần kinh liên sườn, đau do vết mổ, đau do viêm mạc mãn tính, đau gót chân, đau cơ, đau xương, đau khớp, đau do ung thư, đau không do ung thư, v.v.

Viêm được đề cập trong sáng chế bao gồm các chứng viêm khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở viêm cấp tính, viêm mãn tính, viêm mạch máu, viêm thần kinh, viêm hệ thống thần kinh trung ương (chẳng hạn như bệnh đa xơ cứng, bao gồm viêm não tủy, v.v.), viêm dây thần kinh ngoại vi, Viêm khớp (chẳng hạn như viêm xương khớp, viêm xương cùng, v.v., viêm khớp vẩy nến, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp, v.v.), viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm ruột (chẳng hạn như bệnh Crohn và viêm loét ruột kết), viêm loét do tiểu đường, lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm da (chẳng hạn như bệnh vẩy nến, viêm da dị ứng, eczêma), v.v.

Chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế được điều chế bằng phương pháp khác với các kỹ thuật trước đây, trong đó không bắt buộc phải tách phân đoạn M và phân đoạn G. Nó làm giảm đáng kể sự phức tạp của quá trình sản xuất và giảm đáng kể chi phí sản xuất, và phương pháp điều chế bao gồm phản ứng đơn giản, hàm lượng các hoạt chất cao, và không có chất phản ứng dư. Qua các thử nghiệm đã chứng minh rằng chế phẩm alginic oligosacarit theo sáng chế có khả năng ngăn ngừa và điều trị bệnh Alzheimer, bệnh đái tháo đường, bệnh Parkinson, các phản ứng viêm khác nhau, đau và chứng sa sút trí tuệ não mạch.

Mô hình động vật và các bước đánh giá hoạt tính dược lực học

1. Mô hình động vật để đánh giá được lực học chống AD: Việc tiêm A β vào một bên não thất được sử dụng để cảm ứng mô hình AD, và mê cung nước Morris được sử dụng để đánh giá hành vi học tập và ghi nhớ của chuột mô hình AD.

Chuột Wistar đực (mỗi con có trọng lượng từ 180-220 g) được lấy và chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm đối chứng phẫu thuật giả, nhóm mô hình, nhóm liều lượng, với 14 con mỗi nhóm. Chuột được gây mê bằng cách tiêm màng bụng với natri pentobarbital (40 mg/kg) và cố định trên thiết bị lập thể. Da được chuẩn bị và khử trùng thường xuyên, da được cắt, lộ ra thóp trước, và tiến hành định vị khu vực CA1 của hồi hải mã với tham chiếu đến “3,0 mm sau thóp trước, 2,2 mm cạnh midstitch, và 2,8 mm dưới màng cứng” trong “Rat Brain Stereotactic Atlas” (BAO Xinming, SHU Siyun, Beijing, People’s Medical Press, 1991, 28). Đối với mỗi nhóm mô hình và nhóm liều lượng, kim tiêm siêu nhỏ đã được sử dụng để đưa kim thẳng đứng vào hộp sọ ở khu vực CA1 của hồi hải mã bên phải. 5 μ l A β kết tụ (A β 1-40 được pha chế trong dung dịch PBS đến nồng độ 1,4 mg/mL, được ủ trong tủ ủ 37°C trong 5 ngày để tạo thành các khối kết tụ) được tiêm chậm với lưu lượng 1 μ L/min. Sau khi hoàn thành tiêm, kim được để lại trong 5 phút, để khuếch tán hoàn toàn A β , và sau đó kim được rút ra từ từ. Vết mổ được khâu và chuột giữ ấm để tỉnh lại. Nhóm đối chứng được tiêm với lượng PBS vô trùng tương tự. Thuốc tương ứng được dùng 7 ngày trước khi thực hiện, và việc dùng được tiếp tục đến cuối thử nghiệm.

Thử nghiệm mê cung nước Morris được thực hiện vào ngày 11 sau khi phẫu thuật.

Thử nghiệm điều hướng địa điểm: mỗi nhóm chuột được huấn luyện một lần một ngày trong 5 ngày liên tiếp, tức là, thử nghiệm điều hướng địa điểm. Thời gian động vật tìm bục (tức là, độ tiềm ẩn thoát) được ghi lại. Nếu bục khôn được tìm thấy sau 90 giây, thì chúng được hướng dẫn để bơi đến bục theo đường thẳng và đứng trên bục trong 30 giây để cảm ứng quá trình học và ghi nhớ.

Thử nghiệm thăm dò không gian: một ngày sau khi hoàn thành thử nghiệm điều hướng địa điểm, bục được loại bỏ, và chuột được đặt vào nước từ điểm vào, và số lần chúng vượt qua bục và phần trăm của khoảng cách bơi trong góc một phần tư nơi đặt

bục so với tổng khoảng cách được ghi lại. Chức năng học và ghi nhớ của động vật được đánh giá.

2. Mô hình động vật để đánh giá được lực học chống lại bệnh Parkinson (PD)

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 8 nhóm: nhóm đối chứng trống, nhóm mô hình MPTP, và nhóm dùng thuốc, với 14 con trong mỗi nhóm. Các con vật được chia thành nhiều nhóm và cho uống thuốc cùng ngày. Nhóm đối chứng trống và nhóm mô hình MPTP được cho dùng dung dịch muối bằng đường tiêu hóa, và các nhóm khác được cho dùng thuốc tương ứng mỗi ngày một lần trong 17 ngày liên tục. Thuốc làm mẫu được cho dùng từ ngày thứ 6. Các động vật trong nhóm đối chứng trống được tiêm dưới da 10 ml/kg nước muối, và các động vật khác được tiêm dưới da 25 mg/kg MPTP mỗi ngày một lần trong năm ngày.

Các bài kiểm tra hành vi được thực hiện lần lượt vào các ngày thứ 11, 14 và 17. Nhẹ nhàng đặt đầu chuột hướng lên trên đỉnh thô của thanh (đường kính 8 mm, cao 55 cm). Thời gian điều chỉnh của chuột từ ngẩng đầu lên đến cúi đầu xuống là độ tiềm ẩn (T-quay), và thời gian chuột từ chuyển động đi xuống đến tất cả các chi chạm đến đáy của thanh được ghi là thời gian leo xuống (T-LA). Hơn 30 giây sẽ được ghi là 30 giây. Mỗi con chuột được thử nghiệm 5 lần và kết quả được tính trung bình.

MPTP có tác dụng phá hủy có chọn lọc đối với tế bào thần kinh dopaminergic ở chất nền. Mô hình động vật PD cảm ứng bởi MPTP là mô hình động vật cổ điển nhất giống với những thay đổi bệnh lý và đặc điểm lâm sàng của bệnh Parkinson ở người. Các triệu chứng chính của PD là run khi nghỉ, tăng căng cơ, giảm vận động, v.v. Thời gian quay đầu và thời gian leo xuống của thí nghiệm leo thanh có thể đại diện cho hoạt động tổng thể và khả năng phối hợp của chuột.

3. Mô hình động vật để đánh giá được lực học chống lại phản ứng viêm

(1) Mô hình viêm khớp dạng thấp — mô hình chuột viêm khớp cảm ứng bởi collagen

Chuột đực DBA/1 nặng 19-22 g được lấy và chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm đối chứng trống, nhóm mô hình và nhóm dùng thuốc, với 8 con chuột trong mỗi

nhóm. Ngoại trừ nhóm đối chứng trống, các động vật còn lại đều được miễn dịch bằng cách tiêm dưới da 10 mg/kg nhũ tương tá được Freund hoàn chỉnh collagen loại II của bò (CII-CFA) ở gốc đuôi vào ngày 0, và 1,5mg/kg lipopolysaccharit (LPS) được tiêm trong màng bụng vào ngày 23. Việc dùng được bắt đầu vào ngày 28: nhóm chứng trống và nhóm mô hình được cho uống nước muối, và các nhóm khác được dùng thuốc tương ứng (mỗi ngày một lần trong 14 ngày liên tục). Sau khi tiêm LPS, chuột được quan sát tình trạng bệnh hàng ngày. Khi chuột bắt đầu phát bệnh (xuất hiện các triệu chứng lâm sàng của bệnh viêm khớp), theo các mức độ khác nhau của bệnh (đỏ, biến dạng khớp) và dựa trên tiêu chuẩn 0-4 điểm, chấm điểm lâm sàng được thực hiện để phản ánh mức độ tiến triển của bệnh. 0 có nghĩa là không có ban đỏ và sưng tấy; 1 có nghĩa là xuất hiện ban đỏ hoặc sưng nhẹ gần xương cổ chân hoặc gần khớp mắt cá chân hoặc xương bàn chân, và đỏ và sưng ở một ngón chân; 2 có nghĩa là ban đỏ nhẹ và sưng khớp mắt cá chân và xương bàn chân, hoặc đỏ và sưng ở nhiều hơn hai ngón chân; 3 có nghĩa là ban đỏ vừa phải và sưng khớp cổ chân, khớp cổ tay và xương bàn chân; 4 có nghĩa là sưng đỏ nghiêm trọng ở tất cả các khớp cổ chân, khớp cổ tay, xương bàn chân và ngón chân; điểm cao nhất cho mỗi chi là 4 điểm, và điểm cao nhất cho mỗi con là 16 điểm.

(2) Mô hình đa xơ cứng — Mô hình chuột đa xơ cứng cảm ứng bởi MOG

Chuột đực C57BL/6 nặng 17-20g được lấy và 5 trong số chúng được chọn ngẫu nhiên làm nhóm đối chứng trống. Các con vật còn lại được miễn dịch bằng cách tiêm dưới da nhũ tương tá được Freund hoàn chỉnh myelin oligodendrocyt glycoprotein (MOG-CFA) vào lưng vào ngày 0 (10 mg/kg MOG, 20 mg/kg CFA), và 10 ug/kg độc tố ho gà được tiêm trong màng bụng vào ngày 0 và ngày 2. Việc dùng thuốc được bắt đầu vào ngày 1. Nhóm đối chứng trống và nhóm mô hình được cho uống nước muối, và các nhóm khác được dùng thuốc tương ứng (một lần một ngày trong 24 ngày liên tục). Khoảng 12 ngày sau khi chủng ngừa, chuột được chủng ngừa sẽ xuất hiện các triệu chứng. Bắt đầu quan sát kỹ hàng ngày và ghi chép lại cân nặng và điểm lâm sàng của chúng để phản ánh mức độ tiến triển của bệnh. 0-4 điểm dùng để chỉ các mức độ khác nhau: 0 nghĩa là ngoại hình bình thường không có dấu hiệu

bệnh rõ ràng; 1 có nghĩa là đuôi rủ xuống và yếu, và yếu một bên chi sau; 2 nghĩa là đuôi rủ xuống và yếu, yếu cả hai chi sau và dáng đi loạn choạng; 3 điểm có nghĩa là yếu và liệt một bên chi sau; 4 có nghĩa là yếu và liệt cả hai chi sau.

(3) Mô hình bệnh lupus ban đỏ hệ thống — Mô hình chuột MRL/lpr lupus ban đỏ

Chuột chuyển gen MRL/lpr có đột biến đồng hợp tử của gen Fas^{lpr} có thể tự phát tạo ra sự tăng sản mô lympho. Chuột bắt đầu xuất hiện các triệu chứng của bệnh lupus ban đỏ hệ thống vào khoảng 10-14 tuần tuổi. Chuột cái chuyển gen MRL/lpr (9 tuần tuổi) được chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm đối chứng trống, nhóm dùng thuốc, với 8 con chuột trong mỗi nhóm. Nhóm đối chứng trống được cho uống nước muối và các nhóm khác được dùng thuốc tương ứng (một lần một ngày trong 4 tuần liên tiếp). Việc chấm điểm hạch bạch huyết được thực hiện mỗi tuần một lần. 0-6 điểm cho biết các độ khác nhau: 0 có nghĩa là bình thường; 1 có nghĩa là đường kính nhỏ hơn 1 cm tại một vị trí ở cả hai bên; 2 có nghĩa là đường kính dưới 1 cm tại hai vị trí điểm ở cả hai bên; 3 có nghĩa là đường kính nhỏ hơn 1 cm tại ba vị trí điểm ở cả hai bên; 4 có nghĩa là đường kính lớn hơn 1 cm tại một vị trí ở cả hai bên và đường kính nhỏ hơn 1 cm tại hai vị trí điểm khác ở cả hai bên; 5 có nghĩa là đường kính lớn hơn 1 cm tại hai vị trí điểm ở cả hai bên và đường kính nhỏ hơn 1 cm tại một vị trí điểm khác ở cả hai bên; 6 có nghĩa là đường kính lớn hơn 1 cm tại ba vị trí điểm trên cả hai bên.

(4) Mô hình bệnh viêm ruột (IBD - Inflammatory bowel disease) — mô hình chuột viêm đại tràng cảm ứng bởi dextran sulfat natri (DSS - dextran sulfate sodium)

Chuột cái C57 (7-8 tuần tuổi) nặng 18-20g được lấy và chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm đối chứng trống, nhóm mô hình và nhóm dùng thuốc, mỗi nhóm 8 con. Chuột trong nhóm mô hình và nhóm dùng thuốc được cho 2,5% polyme dextran sulfat natri (DSS) cao phân tử ở dạng nước uống vào ngày 1-7 và bắt đầu dùng vào ngày 1. Nhóm đối chứng và nhóm mô hình được cho uống nước muối, và các nhóm khác được dùng thuốc tương ứng (một lần một ngày trong 30 ngày liên tục). Vào ngày 31, chuột bị chết do trật cổ tử cung, các khoang bụng được mở ra, và màng treo ruột được tách ra. Phần từ bắt đầu của vùng hồi tràng đến cuối hậu môn ở mỗi con chuột được lấy. Mỗi nhóm được lấy mẫu tuần tự. Chiều dài ruột kết được đo.

4. Mô hình động vật để đánh giá được lực học chống lại bệnh đái tháo đường

Chuột đực NIH được sử dụng và chia nhóm ngẫu nhiên thành nhóm đối chứng bình thường, nhóm mô hình, và nhóm dùng thuốc, với 10 con mỗi nhóm. Vào ngày thử nghiệm, ngoại trừ nhóm bình thường, các con vật còn lại đều được tiêm trong màng bụng 150 mg / kg streptozotoxin. Thuốc tương ứng được dùng liên tục trong 10 ngày. Vào ngày thứ 11, nhãn cầu được loại bỏ và lấy máu để đo nồng độ glucoza trong máu.

5. Mô hình động vật để đánh giá được lực học chống đau

(1) Mô hình đau ở chuột được cảm ứng bởi axit axetic

Chuột Côn Minh, một nửa trong số đó là đực và một nửa là cái, nặng 18-22 g, được chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm đối chứng trống, nhóm mô hình và nhóm dùng thuốc, trong đó có 10 con chuột trong mỗi nhóm. Kể từ ngày phân nhóm, nhóm chứng trống được cho dùng trong dạ dày 20 ml/kg nước cất một lần một ngày trong 7 ngày liên tục, và các nhóm khác được cho dùng các loại thuốc tương ứng trong dạ dày một lần một ngày trong 7 ngày liên tiếp. Một giờ sau lần dùng cuối cùng, chuột trong mỗi nhóm được tiêm vào màng bụng 0,2 ml dung dịch axit axetic 0,6%, và độ tiềm ẩn của cơn quặn quai (thời gian từ khi tiêm axit axetic đến khi xuất hiện phản ứng quặn quai) và số lần chuột quặn quai trong vòng 20 phút sau khi tiêm axit axetic được ghi lại.

Việc tiêm các hóa chất như dung dịch axit axetic vào khoang bụng của chuột có thể kích thích màng bụng chuột và gây ra những cơn đau dai dẳng từng cơn, biểu hiện là bụng lõm xuống, thành bụng trước sát đáy lồng, vẹo hông và mở rộng chi sau, thể hiện tư thế đặc biệt được gọi là phản ứng quặn quai. Độ tiềm ẩn của cơn quặn quai (thời gian từ khi tiêm axit axetic đến khi xuất hiện phản ứng quặn quai) và số lần quặn quai trong một khoảng thời gian nhất định có thể thể hiện mức độ nghiêm trọng của cơn đau. Độ tiềm ẩn của cơn quặn quai càng ngắn và số lần quặn quai càng nhiều thì cơn đau càng dữ dội.

(2) Mô hình chuột bị đau nửa đầu được cảm ứng bởi nitroglycerin

Chuột đực SD, nặng 180-220g, được chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm đối chứng trống, nhóm mô hình và nhóm dùng thuốc, trong đó có 8 con chuột trong mỗi nhóm. Việc dùng thuốc được bắt đầu vào ngày phân nhóm. Nhóm đối chứng trống và nhóm mô hình được cho dùng nước cất trong dạ dày một lần mỗi ngày trong 28 ngày liên tục, và các nhóm khác được cho dùng các loại thuốc tương ứng trong dạ dày mỗi ngày một lần trong 28 ngày liên tiếp. 30 phút sau lần dùng cuối cùng, động vật ngoại trừ nhóm đối chứng trống được cho dùng nước muối, và các nhóm khác được tiêm dưới da 10 mg/kg nitroglycerin vào vai phải để thiết lập mô hình. Thời gian xuất hiện và thời gian đỡ tai ở chuột sau khi làm mô hình, và số lần gãi đầu trong vòng 30-45 phút sau khi làm mô hình được quan sát. Hàm lượng của 5-HT trong mô não được xác định bằng phép đo quang phổ huỳnh quang, và đo ở bước sóng Ex356nm/Em 483nm. Kết quả được thể hiện bằng ng/g trọng lượng não.

Đau nửa đầu là tình trạng rối loạn chức năng của mạch máu và dây thần kinh do sự tương tác giữa mạch máu và cơ chế thần kinh. Nitroglycerin có thể gây ra sự quá mẫn của các sợi thần kinh sinh ba và gây ra chứng đau nửa đầu do mở rộng các mạch máu của màng não, gây ra viêm thần kinh và kích hoạt các chức năng của tế bào thần kinh vùng dưới đồi, thân não và tủy sống. Mô hình nitroglycerin là mô hình động vật được thành lập vào năm 1995 và hiện đã trở thành mô hình đau nửa đầu ở động vật cổ điển. Theo cơ chế gây bệnh của nitroglycerin, việc phát hiện thời điểm đỡ tai do giãn mạch, số lần gãi đầu do đau và hàm lượng serotonin (5-HT) (một yếu tố nhạy cảm với đau trong mô não) được sử dụng để đánh giá mức độ nghiêm trọng của chứng đau nửa đầu. Tình trạng đỡ tai càng kéo dài, số lần gãi đầu càng nhiều và hàm lượng 5-HT càng cao thì cơn đau nửa đầu càng nghiêm trọng.

(3) Mô hình chuột bị đau nửa đầu được cảm ứng bởi sự kích thích điện hạch sinh ba

Chuột SD, 5 tháng tuổi, đực, nặng 200-240 g, được chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm đối chứng trống, nhóm phẫu thuật giả, nhóm mô hình, nhóm dùng thuốc, trong đó có 10 con chuột trong mỗi nhóm.

Mỗi nhóm được cho uống các loại thuốc tương ứng, và nhóm đối chứng trống, nhóm phẫu thuật giả, và nhóm mô hình được cho uống nước cất. Sau khi dùng liên tục trong 10 ngày, tất cả chuột ngoại trừ nhóm đối chứng trống đều được gây mê bằng cách tiêm vào màng bụng 350 mg/kg cloral hydrat. Chuột được cố định trên thiết bị lập thể, và đường rạch ở giữa được thực hiện trên đỉnh đầu. Da và cơ được cắt từng lớp để lộ hộp sọ ở giữa vết khâu dọc giữa. Một mũi khoan nha khoa đã được sử dụng để tạo ra lỗ 3 mm phía sau và 3 mm bên ngoài thóp, sau đó đưa điện cực vào hạch sinh ba (độ sâu từ màng cứng là 9,5 mm). Gây mê được tiếp tục sau khi phẫu thuật. Tất cả các hoạt động được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Các điện cực kích thích đã được gỡ lỗi. Các thông số kích thích điện là chu kỳ 200 ms, biên độ 10 v và độ rộng sóng 5 ms cho kích thích 10 phút. Trong nhóm phẫu thuật giả, chỉ có các điện cực được đưa vào nhưng không được kích thích. 50 mg/kg Evans Blue được tiêm vào tĩnh mạch đuôi phải 7 phút trước khi kích thích, sau đó là truyền dịch và cố định trong vòng 20 phút sau khi kích thích.

Năm phút sau khi kết thúc kích thích, tâm thất trái được truyền dịch trong 2 phút. Phẫu thuật cắt xương sọ được thực hiện, và toàn bộ não được lấy ra, cố định để xác định c-fos trong phần bệnh lý bằng phương pháp hóa mô miễn dịch. Vị trí điện cực cũng được xác định, màng cứng ở vị trí đặt điện cực và vị trí tương ứng của bán cầu đại não khác được tách ra, sau đó rửa bằng nước khử ion, trải phẳng trên lam kính, sấy ở 37°C trong 15 phút, và cố định với 70% glyxerol. Cường độ huỳnh quang của vùng được chỉ định ở phía kích thích và phía đối chứng được phát hiện dưới kính hiển vi đồng tiêu với bước sóng kích thích là 647 nm và bước sóng phát xạ là 680 nm. Tỷ lệ giữa cường độ huỳnh quang của bên kích thích/bên đối chứng được tính toán để chỉ ra sự thoát mạch của protein huyết tương (PPE - plasma protein extravasation). Các phần vòng đầu đông lạnh liên tục của toàn bộ não với độ dày lát cắt 10 μ m đã được chuẩn bị, và các tế bào dương tính c-fos được đánh dấu huỳnh quang hóa mô miễn dịch. 5 trường được chọn ngẫu nhiên dưới kính hiển vi đồng tiêu để xác định số lượng tế bào dương tính ở phía thí nghiệm và phía đối chứng ở phần đuôi của nhân sinh ba tủy sống, và sau đó lấy trung bình của 5 trường làm số tế bào dương tính trung bình.

Sự kích hoạt của hệ thống mạch thần kinh sinh ba là phần quan trọng trong việc tạo ra cơn đau ở bệnh nhân đau nửa đầu, và quá trình viêm thần kinh của màng não đóng vai trò quan trọng trong việc sản xuất và duy trì cơn đau nửa đầu. Khi dây thần kinh sinh ba phân bố trong chất màng cứng bị kích thích, nó giải phóng các chất hoạt huyết, gây giãn mạch màng não, thoát mạch các thành phần huyết tương, làm suy giảm tế bào mast và kích hoạt tiểu huyết cầu, dẫn đến chứng đau nửa đầu. Ngoài ra, chất dẫn truyền thần kinh được giải phóng sau khi kích thích đau sẽ liên kết với các thụ thể tương ứng trên màng tế bào. Dưới tác dụng của chất truyền tin thứ hai, gen mRNA c-fos được biểu hiện, dịch mã và tổng hợp trong nhân thành protein c-fos, dẫn đến tác dụng sinh lý lâu dài đối với cơ thể. Do đó, khi xuất hiện chứng đau nửa đầu, số lượng tế bào biểu hiện mRNA c-fos và protein c-fos trong nhân ống cột sống và raphe magnus của dây thần kinh sinh ba tăng lên. Do đó, mức độ đau nửa đầu có thể được phản ánh bằng cách đo lượng protein huyết thanh tiết ra từ màng cứng của động vật đau nửa đầu và số lượng tế bào dương tính c-fos ở phần đuôi (nucleus caudalis) của nhân sinh ba cột sống. Số lượng tế bào càng ít thì chứng đau nửa đầu càng ít nghiêm trọng.

6. Mô hình động vật để đánh giá dược lực học chống lại chứng sa sút trí tuệ não mạch

(1) Mô hình chuột bị sa sút trí tuệ não mạch do tắc động mạch cảnh chung hai bên (BCCAO - bilateral common carotid artery occlusion)

Mô hình tắc động mạch cảnh chung hai bên (BCCAO) là mô hình sa sút trí tuệ não mạch được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực này được thiết lập bởi thiếu máu cục bộ não toàn cầu và tái tưới máu.

1.1 Phân nhóm và quản lý động vật

Chuột đực C57BL/6, nặng 22 ± 2 g được chọn và chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm phẫu thuật giả, nhóm mô hình tắc động mạch cảnh chung hai bên (BCCAO) 30 phút (viết tắt là nhóm BCCAO 30 phút) và nhóm dùng thuốc, trong đó có 10 con trong mỗi nhóm. Sau khi các con vật được chia thành các nhóm, chuột trong nhóm phẫu

thuật giả và nhóm BCCAo 30 phút được cho dùng nước cất trong dạ dày, mỗi ngày một lần, trong 5 ngày liên tục, sau đó là phẫu thuật BCCAo. Chuột trong nhóm dùng thuốc được cho dùng các loại thuốc tương ứng trong dạ dày, một lần một ngày, trong 5 ngày liên tiếp, sau đó là phẫu thuật BCCAo. Phẫu thuật BCCAo là gây mê từng nhóm chuột bằng pentobarbital natri; tách và làm tắc động mạch cảnh chung 2 bên của chuột ở nhóm mô hình và nhóm dùng thuốc trong 30 phút, sau đó loại bỏ tắc và khâu vết thương ở cổ. Đối với nhóm phẫu thuật giả, các động mạch cảnh chung hai bên không bị tắc sau khi tách và vết mổ ở cổ được khâu trực tiếp. Hai mươi bốn giờ sau BCCAo, chuột trong mỗi nhóm tiếp tục được dùng các loại thuốc tương ứng hoặc nước cất trong dạ dày theo lịch dùng thuốc trước khi phẫu thuật, trong thêm 23 ngày liên tục sau khi dùng thuốc. Thử nghiệm tránh bóng tối được thực hiện vào ngày thứ 7 sau BCCAo, và thử nghiệm mê cung nước Morris được bắt đầu vào ngày thứ 13 để đánh giá tác động cải thiện của chế phẩm diaxit mannuronic đối với khả năng học tập và ghi nhớ của chuột. Sau bài kiểm tra hành vi, chuột được hiến tế, và các mô não được cố định. Tổn thương tế bào thần kinh trong hồi hải mã của chuột sau khi BCCAo và tác dụng bảo vệ của chế phẩm diaxit mannuronic đối với các tế bào thần kinh bị thương được đánh giá bằng các phương pháp như nhuộm HE.

1.2 Thử nghiệm tránh bóng tối

Thử nghiệm tránh bóng tối được sử dụng để kiểm tra khả năng học tập và ghi nhớ của chuột trong phân biệt không gian. Suy giảm trí nhớ về khả năng định vị không gian chỉ có thể xuất hiện khi hồi hải mã hoặc vùng xung quanh hồi hải mã bị tổn thương. Hộp thí nghiệm tránh bóng tối là thiết bị được thiết kế nhằm lợi dụng thói quen theo bóng tối và tránh ánh sáng ở chuột. Một nửa hộp là phòng tối và nửa còn lại là phòng sáng, có lỗ nhỏ ở giữa để kết nối. Đáy của phòng tối được bao phủ bởi lưới đồng. Các con vật bị sốc khi chúng vào phòng tối và trốn trở lại phòng sáng. Sau khi động vật được huấn luyện trong 24 giờ, thử nghiệm được thực hiện lại. Độ tiềm ẩn trong thử nghiệm tránh bóng tối đề cập đến thời gian từ khi con vật được đưa vào phòng sáng đến lần đầu tiên vào phòng tối. Độ tiềm ẩn trong thử nghiệm tránh bóng tối càng dài và số lần tránh sai lầm càng ít thì trí nhớ của động vật càng tốt.

1.3 Thử nghiệm hành vi mê cung nước Morris

Thử nghiệm mê cung nước Morris (MWM - Morris water maze) là thử nghiệm trong đó các động vật thí nghiệm buộc phải bơi và học cách tìm các bục ẩn dưới nước. Nó chủ yếu được sử dụng để kiểm tra khả năng học tập và trí nhớ của động vật thí nghiệm về vị trí và hướng không gian (định vị không gian). Mê cung nước Morris của chuột chủ yếu bao gồm một bể bơi hình trụ có đường kính 80 cm và cao 70 cm và một bục có thể di động có đường kính 8 cm. Máy ảnh kỹ thuật số trên bầu trời phía trên bể bơi được kết nối với máy tính. Trước khi thử nghiệm, nước sạch được đổ vào bể bơi trước. Độ sâu của nước là 15 cm, và mặt nước cao hơn mặt bục là 0,5 cm. Sữa được thêm vào để làm cho nước bể bơi có màu đục. Vị trí của bục không thay đổi trong quá trình thử nghiệm. Hành vi mê cung nước Morris bao gồm hai chỉ số kiểm tra sau đây.

Bài kiểm tra điều hướng địa điểm được sử dụng để đo khả năng học và ghi nhớ mê cung nước của chuột. Thử nghiệm được bắt đầu vào ngày thứ 13 sau BCCAO và kéo dài 4 ngày. Chuột được huấn luyện một lần vào cả buổi sáng và buổi chiều, tổng cộng 8 lần. Trong quá trình huấn luyện, chuột vào bể bơi ở 1/2 cung ở góc phần tư phía tây, và đi vào nước với đầu hướng về thành bể bơi. Nếu bục không được tìm thấy trong vòng 120 giây, nhân viên thử nghiệm sẽ dẫn nó đến bục và để nó trong 30 giây để hướng dẫn cách học và ghi nhớ của nó. Bản đồ đường đi và thời gian cần thiết để chuột tìm và leo lên bục được quan sát và ghi lại, tức là ghi lại Độ tiềm ẩn thoát và tốc độ bơi của chúng trong thử nghiệm mê cung nước Morris. Độ tiềm ẩn thoát trong thử nghiệm mê cung nước Morris đề cập đến thời gian kể từ khi chuột xuống nước để tìm bục. Độ tiềm ẩn thoát trong thử nghiệm mê cung nước Morris càng ngắn thì trí nhớ của động vật càng tốt.

Thử nghiệm thăm dò không gian được sử dụng để đo khả năng chuột giữ lại bộ nhớ về vị trí không gian của bục sau khi học cách tìm ra bục. Sau khi kết thúc thử nghiệm điều hướng địa điểm, bục đã bị loại bỏ sau khoảng thời gian 1 ngày. Chuột được đưa vào nước từ cùng một điểm vào, và số lần chúng vượt qua bục ban đầu được đo. Việc thu thập và xử lý dữ liệu được hoàn thành bởi hệ thống giám sát và xử lý hình ảnh tự động.

(2) Mô hình chuột mắc chứng sa sút trí tuệ não mạch do tắc động mạch não giữa (MCAO - middle cerebral artery occlusion)

Mô hình tắc động mạch não giữa (MCAO) là mô hình sa sút trí tuệ não mạch thường được sử dụng trong lĩnh vực này được thiết lập bởi thiếu máu não cục bộ khu trú.

2.1 Phân nhóm và quản lý động vật

Chuột Wistar đực được chọn và chia ngẫu nhiên thành các nhóm: nhóm đối chứng trống, nhóm phẫu thuật giả, nhóm mô hình (nhóm MCAO) và nhóm dùng thuốc, trong đó có 10 con trong mỗi nhóm. Động vật trong nhóm trống, nhóm phẫu thuật giả và nhóm MCAO được uống nước cất, và các động vật trong nhóm algin oligosacarit algin đều được cho uống liều lượng tương ứng của algin oligosacarit. Sau 7 ngày dùng liên tục ở mỗi nhóm, ngoại trừ chuột ở nhóm trống, chuột ở các nhóm khác được gây mê bằng cách tiêm vào màng bụng 350 mg/kg cloral hydrat, và cố định trên bảng chuột ở vị trí bên trái. Dưới kính hiển vi phẫu thuật, da được rạch dọc theo điểm giữa của kết nối giữa ống thính giác bên ngoài và bầu mắt để lộ ra vòm zygomatic. Khoảng cách giữa xương phosphat và xương hàm được lan rộng bằng cách sử dụng thiết bị distractor nhỏ. Cửa sổ xương 2 mm x 2 mm đã được mở ra ở đáy hộp sọ. Chất màng cứng được mở ra để lộ ra động mạch não giữa và một bên động mạch não giữa bị đông lại bằng phương pháp đốt điện cao tần gây thiếu máu não cục bộ khu trú (chuột trong nhóm phẫu thuật giả chỉ lộ ra động mạch não giữa mà không đông lại). Vết mổ được khâu từng lớp. Nhiệt độ phòng trong và sau khi phẫu thuật được kiểm soát chặt chẽ ở mức 24~25°C. Sau mổ, thuốc hoặc nước cất được tiếp tục dùng cho từng nhóm theo lịch dùng thuốc trước phẫu thuật. Thử nghiệm mê cung nước Morris được thực hiện cho mỗi nhóm vào ngày thứ 11 sau phẫu thuật.

Trong thí nghiệm này, chuột trong mỗi nhóm được huấn luyện mỗi ngày một lần trong 5 ngày liên tục, tức là thử nghiệm điều hướng địa điểm. Thời gian các con vật tìm thấy bục (tức là quá trình chờ thoát trong thử nghiệm mê cung nước Morris) đã được ghi lại. Những con không tìm thấy bục trong khoảng 120 giây được hướng dẫn bơi về phía bục theo đường thẳng và đứng trên bục trong 30 giây để học và ghi nhớ.

Sau khi kết thúc thử nghiệm điều hướng địa điểm, bực đã bị loại bỏ trong khoảng thời gian 1 ngày. Chuột được đưa xuống nước từ điểm vào, và thời gian chúng đến bực ban đầu lần đầu tiên và số lần chúng vượt qua bực ban đầu được ghi lại, tức là thử nghiệm thăm dò không gian. Chức năng học tập và ghi nhớ của động vật đã được đánh giá. Độ tiềm ẩn thoát trong thử nghiệm mê cung nước Morris đề cập đến thời gian kể từ khi chuột xuống nước để tìm bực. Độ tiềm ẩn thoát trong thử nghiệm mê cung nước Morris càng ngắn thì trí nhớ của động vật càng tốt.

Ưu điểm của sáng chế được minh họa thêm trong các ví dụ không giới hạn sau đây. Tuy nhiên, các vật liệu và lượng cụ thể của chúng cũng như các điều kiện thí nghiệm khác được sử dụng trong các ví dụ không được coi là giới hạn sáng chế. Trừ khi được quy định khác, các bộ phận, tỷ lệ, phần trăm, và tương tự trong sáng chế đều được tính theo khối lượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1:

Bước 1): Điều chế hỗn hợp oligosacarit của axit alginic

Điều chế 5 kg natri alginat thành dung dịch khoảng 10%, và điều chỉnh pH đến khoảng 3,0 bằng cách bổ sung axit clohydric loãng. Làm nóng dung dịch đến 80 °C, và khuấy. Cho phép phản ứng trong 10 giờ trước khi ngừng làm nóng. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, điều chỉnh pH đến 9,0 bằng cách bổ sung NaOH, và tiếp tục điều chỉnh đến 3,2 bằng cách bổ sung axit clohydric loãng. Ly tâm dung dịch ở tốc độ 5000 rpm trong 10 phút. Thu phần dịch nổi và điều chỉnh đến pH 1,0 bằng cách bổ sung HCl. Sau khi ly tâm, thu kết tủa và cô đặc trên thiết bị cô quay, và làm khô trong chân không để tạo ra 1500 g chất trung gian.

Xem Fig. 1 để biết phổ NMR của chất trung gian. Phương pháp đo NMR như sau: chuẩn bị mẫu: cân 30 mg mẫu để thử nghiệm và hòa tan trong 0,5 ml D₂O, và đông khô; thêm tiếp 0,5 ml nước nặng được đơteri vào để hòa tan; thực hiện đông khô lại; và cuối cùng, hòa tan bột mẫu đông khô với lượng nước nặng thích hợp, chuyển vào ống NMR, và điều chế thành dung dịch 100 mg/ml để thử nghiệm; thêm 0,01% (trọng

lượng/thể tích) muối natri TSP (trimethylsilylpropionic) được đoteri vào làm chất chuẩn nội.

Thu thập và xử lý dữ liệu từ trường hạt nhân: Dụng cụ cộng hưởng từ hạt nhân biến đổi Fourier 400M thu thập phổ hydro một chiều ở 60°C. Chuỗi xung là 45° xung, mỗi lần thu được là 4 giây, thời gian thư giãn là 1 giây, và tích lũy là 20 lần, và độ rộng phổ từ -2 ppm đến 10 ppm. Sau khi thu thập dữ liệu, phép biến đổi Fourier được sử dụng để thu được phổ hydro một chiều, và tín hiệu TSP methyl hydro được đặt thành 0,00 ppm.

Có thể thấy từ Fig. 1 rằng chất trung gian chứa phân đoạn axit mannuronic (khối M, dịch chuyển hóa học 5,1 ppm) và phân đoạn axit guluronic (khối G, dịch chuyển hóa học 5,5 ppm), cũng như phân đoạn khảm của axit mannuronic và axit guluronic (khối MG, độ dịch chuyển hóa học 5,3 ppm). Cân 500 g chất trung gian, và hòa tan trong nước cất để điều chế dung dịch có thể tích 5 L. Điều chỉnh dung dịch đến pH 6,5 bằng NaOH, và làm nóng trong bể nước để kiểm soát nhiệt độ phản ứng ở 75 °C. Điều chỉnh lưu lượng khí tại cửa ra của xi lanh oxy và công suất của máy tạo ozon sao cho ozon được sục vào dung dịch phản ứng với lưu lượng của nồng độ khối lượng là 8 g/giờ. Sau 4 giờ phản ứng, ngừng sục ozon, và bổ sung lượng nước thích hợp để điều chỉnh nồng độ dung dịch đến khoảng 10%. Lọc dung dịch qua màng siêu lọc có trọng lượng phân tử loại bỏ là 2.000 Da để thu lấy phần lưu lại trên màng. Cô đặc chất lỏng thu được trên máy cô quay và làm khô trong chân không thu được 350 g sản phẩm A.

Bước 2): Phân tích tỷ lệ và cấu trúc của oligosacarit với các mức độ polyme hóa khác nhau trong sản phẩm A alginic oligosacarit diaxit

Cân chính xác 100 mg sản phẩm A alginic oligosacarit diaxit đã được làm khô ở trên, hòa tan trong nước đến nồng độ 10 mg/mL, cho qua màng lọc 0,22 um để thu được dung dịch mẫu thử. Tỷ lệ các oligosacarit với các mức độ polyme hóa khác nhau trong chế phẩm được xác định bằng sắc ký lọc phân tử dùng peptit Superdex (GE Co.) kết hợp với tán xạ ánh sáng laze đa góc (MALS, Wyatt Co.). Các điều kiện thử nghiệm như sau:

Cột sắc ký: peptit Superdex 10/300G1

Pha động: 0,1 mol/L NaCl

Thể tích bơm: 10 μ L

Lưu lượng: 0,3 mL/min

Kết quả thử nghiệm: từ disacarit đến decasacarit được thể hiện lần lượt bằng dp2-dp10, dp2 là 18%, dp3 là 24%, dp4 là 23%, dp5 là 14%, dp6 là 8%, dp7 là 7%, dp8 là 2%, dp9 là 2% và dp10 là 2%.

Bước 3): Phân tích LC-MS cấu trúc oligosacarit có các mức độ polyme hóa khác nhau trong sản phẩm A alginic oligosacarit diaxit

Các điều kiện thử nghiệm:

Cột sắc ký: peptit Superdex 10/300G1

Pha động: 20% metanol + 80% NH_4Ac 80 mmol/L

Lưu lượng: 0,1 mL/min

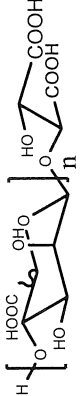
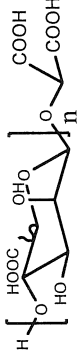
Nhiệt độ cột: $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,8\text{ }^\circ\text{C}$.

Các điều kiện khối phổ: Agilent 6540 QTOF; nguồn ion: điện áp va chạm ESI 120 V; chế độ ion âm. Độ rộng của tín hiệu thu được (m/z) là 100-1000.

Khối phổ oligosacarit với các mức độ polyme hóa khác nhau được thể hiện trong Fig. 1-3. Các đỉnh tín hiệu khác nhau trong khối phổ được gán, xác nhận cấu trúc phân tử của tất cả các oligosacarit trong sản phẩm A, tức là, cấu trúc được thể hiện trong công thức chung (III). Sự gán tín hiệu và cấu trúc tương ứng cho các tín hiệu được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: 6 cấu trúc điaxit của oligosacarit có các mức độ polyme hóa khác nhau trong sản phẩm A và tỷ lệ khối lượng so với điện tích của chúng trong khối phổ

Số thứ tự	Cấu trúc phân tử	Công thức phân tử	Tỷ lệ khối lượng so với điện tích (m/z)								
			n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	n=8	n=9
			[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-2] ²⁻	[M-2] ²⁻
1		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₆ H ₁₀ O ₈ n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	720	808	896
2		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₅ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₅ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₄ H ₆ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866

5		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		$(C_6H_8O_6)_n C_3H_4O_5$ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	675	763	851

Từ phân tích cấu trúc khối phổ trên đã phát hiện rằng axit mannuronic ở đầu khử của mạch đường trong sản phẩm A được oxy hóa thành cấu trúc axit sacaric (xem công thức chung IV của cấu trúc này), mà có thể là cấu trúc mannaric hoặc axit gulunoric bao gồm 6 nguyên tử cacbon ($m+m'=3$) có hàm lượng khoảng 10-30%, hoặc sản phẩm khử cacboxyl hóa của axit mannaric hoặc axit gulunoric, tức là, diaxit sacaric bao gồm 5 cacbon ($m+m'=2$) (30-50%) và diaxit sacaric bao gồm 4 cacbon ($m+m'=1$) (30-40%).

Bước 4) Phân tích NMR của hàm lượng axit guluronic trong sản phẩm A alginic oligosacarit diaxit

Chuẩn bị mẫu: cân 50 mg mẫu để thử nghiệm, hòa tan trong 0,5 ml D₂O, và đông khô; bổ sung 0,5 ml nước nặng được đeteri vào để hòa tan; thực hiện đông khô một lần nữa; cuối cùng, hòa tan bột mẫu đông khô với lượng nước nặng thích hợp, tất cả được chuyển vào ống NMR và điều chế lại thành dung dịch 100 mg/ml để thử nghiệm; và bổ sung 0,01% (trọng lượng/thể tích) muối natri TSP (trimethylsilylpropionic) được đeteri vào làm chất chuẩn nội.

Thu thập và xử lý dữ liệu từ trường hạt nhân: Dụng cụ cộng hưởng từ hạt nhân biến đổi Fourier 400M thu thập phổ hydro một chiều ở nhiệt độ phòng. Chuỗi xung là 45° xung, mỗi lần thu được là 4 giây, thời gian thư giãn là 1 giây, và tích lũy là 20 lần, và độ rộng phổ từ -2 ppm đến 10 ppm. Sau khi thu thập dữ liệu, phép biến đổi Fourier được sử dụng để thu được phổ hydro một chiều, và tín hiệu TSP methyl hydro được đặt thành 0,00 ppm. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton của sản phẩm A được thể hiện trong Fig. 5. Trong Fig. 5, bội số có độ dịch chuyển hóa học 4,6 ppm là tín hiệu hydro ở vị trí C-1 của axit mannuronic (M), 5,0 ppm là tín hiệu hydro ở vị trí C-1 của axit guluronic (G), 4,9 ppm là tín hiệu hydro C-1 của phân đoạn khảm của axit mannuronic và axit guluronic (MG). Công thức tính hàm lượng của axit guluronic là:

$$G\% = \frac{I_{5.0} + 0.5I_{4.9}}{I_{5.0} + I_{4.6} + I_{4.9}} \times 100\%$$

Trong công thức trên, I4.6, I5.0 và I4.9 lần lượt là các giá trị tích phân tín hiệu hydro tại các vị trí C-1 của axit mannuronic (M), axit guluronic (G), phân đoạn khảm của axit mannuronic và axit guluronic (MG). Theo tính toán, hàm lượng axit guluronic trong A là 30%.

Ví dụ 2:

Cân 100 g natri alginat có bán trên thị trường (mua từ trang web của Công ty thuốc thử Sinopharm, CAS số 9005-38-3, thông số kỹ thuật CP, đã thử nghiệm tại Thượng Hải), trộn đều khi bổ sung nước cất, và được điều chế thành dung dịch với thể tích 1 L sau khi trương nở. Điều chỉnh dung dịch đến pH 4,0 bằng NaOH, và thực hiện phản ứng ở nhiệt độ phòng (25 °C). Điều chỉnh lưu lượng khí ở cửa ra của xi lanh oxy và công suất của máy tạo ozon sao cho ozon được sục vào dung dịch phản ứng với lưu lượng của nồng độ khối lượng là 1 g/giờ. Sau 10 giờ phản ứng, ngừng sục ozon, và bổ sung lượng nước thích hợp để điều chỉnh nồng độ dung dịch đến khoảng 15%. Lọc dung dịch qua màng siêu lọc có khối lượng phân tử loại bỏ là 1000 Da để thu được phần lưu lại trên màng. Cô đặc chất lỏng thu được trên thiết bị cô quay và làm khô trong chân không thu được 80 g sản phẩm B.

Tỷ lệ các thành phần oligosacarit với các mức độ polyme hóa khác nhau trong B được xác định bằng sắc ký lọc phân tử dùng peptit Superdex (GE Co.) kết hợp với tán xạ ánh sáng laze đa góc (MALS, Wyatt Co.). Phương pháp đo giống như phần liên quan trong ví dụ 1. Kết quả thử nghiệm: từ disacarit đến decasacarit được thể hiện lần lượt bằng dp2-dp10, dp2 là 25%, dp3 là 24%, dp4 là 18%, dp5 là 13%, dp6 là 10%, dp7 là 5%, dp8 là 2%, dp9 là 2% và dp10 là 1%.

Hàm lượng axit guluronic trong sản phẩm B được xác định là 50% ở 60 °C bằng thiết bị cộng hưởng từ hạt nhân biến đổi Fourier 400M. Phương pháp đo giống như trong phần liên quan của ví dụ 1. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton được thể hiện trong Fig. 6. Từ hình vẽ này có thể thấy rằng vùng tích hợp của axit mannuronic (M, giá trị dịch chuyển hóa học 4,6ppm) và axit guluronic (G, giá trị dịch chuyển hóa học 5,0ppm) tương đối gần nhau, trong khi vùng tích hợp của phân đoạn khảm của axit

mannuronic và axit guluronic (MG, giá trị dịch chuyển hóa học 4,9 ppm) là nhỏ. Theo công thức tính hàm lượng của sản phẩm axit guluronic (G), hàm lượng của G là 50%.

Ví dụ 3

Cân 100 g chất trung gian của ví dụ 1. Sau khi bổ sung nước để tạo huyền phù, bổ sung NaOH vào để điều chỉnh giá trị pH về bazơ để cho phép bột tan hoàn toàn. Cuối cùng điều chế dung dịch thành dung dịch 1 L, và bổ sung tiếp HCl vào để điều chỉnh giá trị pH đến 2,95. Xuất hiện một phần kết tủa trắng, được loại bỏ thông qua ly tâm. Thu thập phần dịch nổi phía trên. Bổ sung nước cất vào để pha loãng thêm cho đến khi điều chế được dung dịch có thể tích 1,5 L. Điều chỉnh dung dịch đến pH 9,0 bằng NaOH, và thực hiện phản ứng trong bể nước ở 45 °C. Điều chỉnh lưu lượng khí ở cửa ra của xi lanh oxy và công suất của máy tạo ozon sao cho ozon được sục vào dung dịch phản ứng với lưu lượng của nồng độ khối lượng là 3 g/giờ. Sau 2 giờ phản ứng, ngừng sục ozon, và bổ sung lượng nước thích hợp để điều chỉnh nồng độ của dung dịch đến khoảng 5%. Lọc dung dịch qua màng siêu lọc có trọng lượng phân tử loại bỏ là 3.000 Da để thu được phần lưu lại trên màng. Cô đặc chất lỏng thu được trên thiết bị cô quay và làm khô trong chân không thu được 60 g sản phẩm C.

Tỷ lệ các oligosacarit với các mức độ polyme hóa khác nhau trong C được xác định bằng sắc ký lọc phân tử dùng peptit Superdex (GE Co.) kết hợp với tán xạ ánh sáng laze đa góc (MALS, Wyatt Co.). Phương pháp đo giống như phần liên quan trong ví dụ 1. Kết quả thử nghiệm: từ disacarit đến decasacarit được thể hiện lần lượt bằng dp2-dp10, dp2 là 9%, dp3 là 21%, dp4 là 27%, dp5 là 18%, dp6 là 13%, dp7 là 6%, dp8 là 3%, dp9 là 2%, và dp10 là 1%.

Hàm lượng axit guluronic trong sản phẩm C được xác định là 10% sử dụng thiết bị cộng hưởng từ hạt nhân biến đổi Fourier 400M ở 60 °C, và phương pháp xác định giống như trong phần liên quan của ví dụ 1. Kết quả thử nghiệm được hiển thị trong Fig. 7. Bằng cách tích hợp các tín hiệu tương ứng một cách riêng biệt, vùng tích hợp của axit mannuronic (M, giá trị dịch chuyển hóa học 4,6ppm) gấp 13 lần vùng tích hợp của axit guluronic (G, giá trị dịch chuyển hóa học 5,0ppm), và vùng tích hợp của

phân đoạn khảm của axit mannuronic và axit guluronic (MG, giá trị dịch chuyển hóa học 4,9ppm) gần với vùng tích hợp của axit guluronic. Theo công thức tính hàm lượng của sản phẩm axit guluronic (G) trong ví dụ 1, hàm lượng của G là 10%.

Ví dụ 4:

Đánh giá hoạt tính được lý giữa chế phẩm alginic oligosacarit diaxit và hexasacarit của diaxit mannuronic.

Chuẩn bị mẫu:

1. Điều chế hexasacarit của diaxit mannuronic

Với tham chiếu đến các phương pháp được bộc lộ trong ví dụ 1 và 2 của sáng chế trước 200580009396.5, điều chế 20 g hexasacarit của diaxit mannuronic.

Tỷ lệ oligosacarit và hàm lượng axit guluronic của các sản phẩm A, B và C được điều chế trong các ví dụ 1, 2 và 3 ở trên của sáng chế được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

2. Điều chế sản phẩm D

Điều chế sản phẩm có hàm lượng G cao với tham chiếu đến phương pháp điều chế của ví dụ 2 ở trên. Nguyên liệu thô natri alginat là mẫu có hàm lượng G cao được cung cấp bởi Công ty TNHH Phát triển Công nghệ Sinh học Haizhilin Thanh Đảo, và phương pháp điều chế giống như phản tương ứng của ví dụ 2. Cụ thể, trộn đều 500g bột natri alginat có hàm lượng G cao với nước cất, và điều chế thành dung dịch thể tích 5L sau khi trương nở, và sau đó điều chỉnh đến pH 4,0 bằng NaOH, và phản ứng ở nhiệt độ phòng 25°C. Điều chỉnh lưu lượng khí tại cửa ra của xi lanh oxy và công suất của máy tạo ozon sao cho ozon được sục vào dung dịch phản ứng với lưu lượng của nồng độ khối lượng là 1 g/giờ. Sau 12 giờ phản ứng, ngừng sục ozon, và bổ sung lượng nước thích hợp để điều chỉnh nồng độ dung dịch đến khoảng 15%. Lọc dung dịch qua màng siêu lọc có trọng lượng phân tử loại bỏ là 1000 Da để thu lấy phần lưu lại trên màng. Cô đặc chất lỏng thu được trên máy cô quay và làm khô trong chân không để thu được 350 g sản phẩm D.

Tỷ lệ các thành phần oligosacarit với các mức độ polyme hóa khác nhau trong D được xác định bằng sắc ký lọc phân tử dùng peptit Superdex (GE Co.) kết hợp với tán xạ ánh sáng laze đa góc (MALS, Wyatt Co.). Phương pháp đo giống như phần liên quan trong ví dụ 1. Kết quả thử nghiệm: từ đisacarit đến decasacarit được thể hiện lần lượt bằng dp2-dp10, dp2 là 18%, dp3 là 26%, dp4 là 20%, dp5 là 15%, dp6 là 8%, dp7 là 7%, dp8 là 3%, dp9 là 2% và dp10 là 1%.

Hàm lượng axit guluronic trong sản phẩm D được xác định là 60% ở 60 °C bằng thiết bị cộng hưởng từ hạt nhân biến đổi Fourier 400M. Phương pháp đo giống như trong phần liên quan của ví dụ 1. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hydro được thể hiện trong Fig. 8. Từ hình vẽ này có thể thấy rằng vùng tích hợp của axit guluronic (G, giá trị dịch chuyển hóa học 5,0ppm) lớn hơn so với vùng tích hợp của axit mannuronic (M, giá trị dịch chuyển hóa học 4,6ppm), trong khi vùng tích hợp của phân đoạn khám của axit mannuronic và axit guluronic (MG, giá trị dịch chuyển hóa học là 4,9 ppm) nhỏ hơn. Theo công thức tính hàm lượng sản phẩm axit guluronic (G) trong ví dụ 1, hàm lượng G là 60%.

Bảng 2: Tỷ lệ phần trăm các oligosacarit và hàm lượng của axit guluronic trong các sản phẩm của chế phẩm oligosacarit của diaxit alginic

Chế phẩm \ Tỷ lệ phần trăm	Disacarit	Trisacarit	Tetrasacarit	Pentasacarit	Hexasacarit	Heptasacarit	Octasacarit	Nonasacarit	Decasacarit	Hàm lượng axit guluronic
A	18%	24%	23%	14%	8%	7%	2%	2%	2%	30%
B	25%	24%	18%	13%	10%	5%	2%	2%	1%	50%
C	9%	21%	27%	18%	13%	6%	3%	2%	1%	10%
D	18%	26%	20%	15%	8%	7%	3%	2%	1%	60%

Lấy 10 g của mỗi loại trong số bốn mẫu A, B, C và D ở trên và mẫu hexasacarit của diaxit mannuronic. Theo các phương pháp được mô tả trong “mô hình động vật để đánh giá dược lực học chống AD”, “mô hình động vật để đánh giá dược lực học chống PD”, “mô hình động vật để đánh giá dược lực học chống viêm”, “mô hình động vật để đánh giá dược lực học chống lại bệnh đái tháo đường”, “mô hình động vật để đánh giá dược lực học chống đau”, và “mô hình động vật để đánh giá dược lực học chống lại bệnh sa sút trí tuệ não mạch”, các hoạt tính dược lý của chế phẩm alginic oligosacarit diaxit này so với hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic.

1. Đánh giá dược lực học chống AD

Trong thử nghiệm này, so với nhóm đối chứng phẫu thuật giả, nhóm mô hình có độ tiềm ẩn lâu hơn đáng kể để tìm ra bực, cho thấy rằng mô hình đánh giá đã được thiết lập thành công. So với nhóm mô hình, độ tiềm ẩn để tìm ra bực trong mỗi nhóm dùng thuốc ngắn hơn đáng kể.

Một ngày nghỉ ngơi sau khi hoàn thành thử nghiệm điều hướng địa điểm, bực đã được loại bỏ, và bắt đầu thử nghiệm thăm dò không gian. Số lần các con vật vượt qua bực và phần trăm khoảng cách bơi trong góc phần tư nơi đặt bực trên tổng khoảng cách được quan sát và xác định. Chức năng học tập và ghi nhớ của động vật đã được đánh giá. Kết quả cho thấy rằng so với nhóm đối chứng phẫu thuật giả, số lần vượt qua bực đã giảm đáng kể trong nhóm mô hình, và số lần vượt qua bực đã tăng lên đáng kể trong nhóm dùng thuốc, như thể hiện trong Fig. 9. Tỷ lệ phần trăm khoảng cách bơi trong góc phần tư nơi đặt bực ban đầu trên tổng khoảng cách có xu hướng tương tự với số lần vượt qua bực. So với nhóm đối chứng phẫu thuật giả, tỷ lệ phần trăm khoảng cách bơi trong góc phần tư nơi đặt bực gốc trên tổng khoảng cách đã giảm đáng kể trong nhóm mô hình, và tỷ lệ phần trăm khoảng cách bơi trong góc phần tư nơi đặt bực ban đầu trên tổng khoảng cách trong nhóm dùng thuốc tăng lên đáng kể, như thể hiện trong Fig. 10.

Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng hoạt tính dược lực học của các sản phẩm A, B, và C mạnh hơn so với hoạt tính dược lực học của hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy rằng chế phẩm oligosacarit chứa một lượng axit guluronic nhất định và có tỷ lệ đisacarit so với hexasacarit cao hơn 60 % có tác dụng hiệp đồng. Tuy nhiên, hoạt tính của thành phần oligosacarit D với hàm lượng axit guluronic cao hơn đã bị giảm.

2. Đánh giá dược lực học chống PD

Trong thử nghiệm này, so với nhóm đối chứng trống, độ tiềm ẩn và thời gian leo xuống của nhóm mô hình dài hơn đáng kể. So với nhóm mô hình, độ tiềm ẩn và thời gian leo xuống của mỗi nhóm dùng thuốc được rút ngắn ở các mức độ khác nhau. Trong số đó, hoạt tính dược lực học của các sản phẩm A, B, và C tốt hơn so với hoạt tính dược lực học của hexasacarit của diaxit mannuronic với một mức độ polyme hóa duy nhất, mà trước đây được mong đợi là hoạt động mạnh nhất. Nhưng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Không bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào, hàm lượng axit guluronic trong chế phẩm và tỷ lệ của đisacarit so với hexasacarit được suy đoán rằng có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm, tuy nhiên, khi tỷ lệ axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm. Xem Fig. 11 và 12.

3. Đánh giá dược lực học chống phản ứng viêm

(1) Mô hình chuột viêm khớp cảm ứng bởi collagen

Trong thử nghiệm này, so với nhóm đối chứng bình thường, nhóm mô hình cho thấy các triệu chứng rõ ràng của bệnh viêm khớp, và ban đỏ vừa phải và sưng mắt cá chân, khớp cổ tay và xương bàn chân. Điểm lâm sàng đạt 6 điểm, cho thấy mô hình viêm khớp đã được thiết lập thành công. So với nhóm mô hình, tỷ lệ mắc bệnh của mỗi nhóm dùng thuốc đã giảm ở các mức độ khác nhau. Các sản phẩm A, B, và C làm chậm đáng kể thời gian khởi phát của chuột so với hexasacarit của diaxit mannuronic có một mức độ trùng hợp duy nhất, và điểm lâm sàng cũng thấp hơn so với hexasaccharide diacid mannuronic, cho thấy rằng các hoạt động dược lực học của sản phẩm A, B, và C tốt hơn hoạt tính dược lực học của hexasacarit của diaxit

mannuronic. Nhưng sự khởi phát của sản phẩm D sớm hơn và điểm lâm sàng cao hơn, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hexasacarit của diaxit mannuronic. Nó chứng tỏ rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ đisacarit so với hexasacarit trong thành phần có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm.

(2) Mô hình chuột đa xơ cứng được cảm ứng bởi MOG

Trong thử nghiệm này, so với nhóm đối chứng bình thường, hầu hết chuột trong nhóm mô hình đều có biểu hiện yếu và tê liệt ở cả hai chi sau. Điểm lâm sàng trung bình của nhóm mô hình đạt 3 điểm, cho thấy mô hình đa xơ cứng đã được thiết lập thành công. So với nhóm mô hình, sự tiến triển viêm của mỗi nhóm dùng thuốc đã giảm ở các mức độ khác nhau. Điểm lâm sàng của các sản phẩm A, B và C trong toàn bộ thử nghiệm và ở điểm cuối thấp hơn điểm lâm sàng của hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy hoạt động dược lực học của các sản phẩm A, B, và C tốt hơn so với hoạt động dược lực học của hexasacarit của diaxit mannuronic; trong khi điểm lâm sàng của sản phẩm D trong toàn bộ thử nghiệm và ở điểm cuối cao hơn một chút, cho thấy hoạt tính chống viêm của sản phẩm D là yếu nhất. Nó chứng tỏ rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ đisacarit so với hexasacarit trong chế phẩm có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm.

(3) Mô hình chuột lupus ban đỏ MRL/lpr

Bắt đầu từ tuần 10, chuột chuyển gen bắt đầu phát bệnh và xuất hiện sưng hạch bạch huyết, điểm hạch bạch huyết tiếp tục tăng theo thời gian, cho thấy nhóm mô hình đã phát bệnh thành công và bệnh tiến triển nhanh chóng. So với nhóm mô hình, tiến triển bệnh của mỗi nhóm dùng thuốc giảm ở các mức độ khác nhau. Sản phẩm A, B, và C làm chậm đáng kể thời gian khởi phát của chuột so với hexasacarit của diaxit mannuronic và điểm hạch bạch huyết cũng thấp hơn so với điểm hạch bạch huyết của hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy hoạt động dược lực học của sản phẩm A, B và C là tốt hơn so với hoạt động dược lực học của hexasacarit của diaxit

mannuronic. Tuy nhiên, thời gian khởi phát của sản phẩm D sớm hơn và điểm hạch bạch huyết của sản phẩm D cao hơn, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Nó chứng tỏ rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ đisacarit so với hexasacarit trong chế phẩm có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm.

(4) Mô hình chuột viêm đại tràng cảm ứng bởi dextran sulfat natri (DSS - Dextran sulfate sodium)

Sau khi hoàn thành thử nghiệm, so với nhóm đối chứng bình thường, ruột kết ở nhóm mô hình đã ngắn lại đáng kể do bị viêm, và hầu hết các con chuột đều giảm cân. Gần một nửa số động vật trong nhóm mô hình chết sau đó, chứng tỏ tình trạng viêm ruột rất nghiêm trọng. So với nhóm mô hình, tình trạng viêm ruột của mỗi nhóm dùng thuốc đã giảm ở các mức độ khác nhau, điều này được phản ánh trong việc phục hồi chiều dài ruột kết và cải thiện tỷ lệ sống sót. Từ Fig. 13a và 13b, có thể thấy rằng các sản phẩm A, B, và C làm cho chiều dài ruột kết của chuột và tỷ lệ sống sót của động vật lớn hơn so với hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy rằng hoạt tính được lý của các sản phẩm A, B, và C tất cả đều tốt hơn hoạt tính được lý của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, sản phẩm D có chiều dài ruột kết ngắn hơn và tỷ lệ sống sót thấp hơn một chút so với hexasacarit của diaxit mannuronic, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn so với hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tương tự, kết quả thử nghiệm nhất quán với các thử nghiệm trước đó, cho thấy rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ đisacarit so với hexasacarit trong chế phẩm có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm.

4. Đánh giá được lực học chống lại bệnh đái tháo đường

Trong thử nghiệm này, nhóm mô hình được so sánh với nhóm đối chứng bình thường, và đường huyết sau ăn của nhóm mô hình cao hơn đáng kể, cho thấy rằng mô hình đánh giá đã được thiết lập thành công. So với nhóm mô hình, đường huyết sau

ăn của mỗi nhóm dùng thuốc thấp hơn đáng kể. Trong số đó, hoạt tính dược lực học của các sản phẩm A, B, và C đều tốt hơn hoạt tính dược lực học của hexasacarit của diaxit mannuronic, nhưng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Kết quả thử nghiệm nhất quán với các thử nghiệm trước, chỉ ra rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ disaccharide so với hexasacarit trong chế phẩm có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm. Xem Fig. 14.

5. Đánh giá dược lực học chống đau

(1) Mô hình đau của chuột được cảm ứng bởi axit axetic

Trong thử nghiệm này, so với nhóm đối chứng trống, độ tiềm ẩn quần quai của nhóm mô hình ngắn hơn đáng kể và số lần quần quai tăng lên đáng kể, cho thấy rằng mô hình đánh giá đã được thiết lập thành công. So với nhóm mô hình, độ tiềm ẩn quần quai của mỗi nhóm dùng thuốc được kéo dài hơn đáng kể, và số lần quần quai giảm đáng kể. Trong số đó, các sản phẩm A, B và C cho phép độ tiềm ẩn quần quai ở chuột lâu hơn so với hexasacarit của diaxit mannuronic và cho phép số lần quần quai ít hơn so với hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy hoạt tính dược lực học của các sản phẩm A, B và C đều tốt hơn so với hoạt tính dược lực học của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, sản phẩm D có độ tiềm ẩn quần quai ngắn hơn và số lần quần quai nhiều hơn một chút so với hexasacarit của diaxit mannuronic, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tương tự, kết quả thử nghiệm này nhất quán với các thử nghiệm trước, cho thấy rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ disacarit so với hexasacarit trong chế phẩm có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm. Xem Fig. 15 và 16.

(2) Mô hình chuột bị đau nửa đầu được cảm ứng bởi nitroglycerin

Chuột bị đau tai khoảng 3 phút sau khi tiêm nitroglycerin dưới da, kéo dài khoảng 2,5 giờ. Số lần gãi đầu trong vòng 30-45 phút sau khi làm mô hình ở nhóm mô hình nhiều hơn đáng kể so với nhóm đối chứng trống. So với nhóm mô hình,

nhóm dùng thuốc cho thấy sự chậm trễ đáng kể trong việc xuất hiện mẩn đỏ tai, thời gian đỏ tai rút ngắn, và giảm số lần gãi đầu trong khoảng thời gian 30-45 phút. Trong số đó, các sản phẩm A, B và C cho phép số lần gãi đầu ở chuột ít hơn so với hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy rằng các hoạt tính dược lý của các sản phẩm A, B và C đều tốt hơn so với hoạt tính dược lý của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, sản phẩm D có số lần gãi đầu ở chuột nhiều hơn một chút so với hexasacarit của diaxit mannuronic, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tương tự, kết quả thử nghiệm này nhất quán với các thử nghiệm trước, cho thấy rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ đisacarit so với hexasacarit trong chế phẩm có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm. Xem Fig. 17.

(3) Mô hình đau nửa đầu được cảm ứng bởi sự kích thích điện hạch sinh ba

Kích thích điện vào hạch sinh ba của chuột rõ ràng đã gây ra tiết protein huyết thanh màng cứng. So với nhóm đối chứng trống và nhóm phẫu thuật giả, tỷ lệ PPE đã tăng lên đáng kể, và số lượng tế bào dương tính biểu hiện c-fos đã tăng lên đáng kể trong nhóm mô hình. So với nhóm mô hình, tỷ lệ PPE đã giảm đáng kể và số lượng tế bào dương tính biểu hiện c-fos giảm đáng kể trong nhóm dùng thuốc. Trong số đó, số lượng tế bào dương tính biểu hiện c-fos trong nhóm các sản phẩm A, B và C ít hơn trong hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy rằng các hoạt tính dược lý của các sản phẩm A, B và C đều tốt hơn so với hoạt tính dược lý của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, nhóm sản phẩm D có số lượng tế bào dương tính biểu hiện c-fos nhiều hơn một chút so với hexasacarit của diaxit mannuronic, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn so với hexasacarit của diaxit mannuronic. Tương tự, kết quả thử nghiệm này nhất quán với các thử nghiệm trước, cho thấy rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ đisacarit so với hexasacarit trong chế phẩm có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm. Xem Fig. 18.

6. Đánh giá dược lực học chống lại chứng sa sút trí tuệ não mạch

(1) Mô hình chuột mắc chứng sa sút trí tuệ não mạch do tắc động mạch cảnh chung hai bên (BCCAO)

1.1 Kết quả thử nghiệm của thử nghiệm tránh bóng tối

Trong thử nghiệm này, nhóm mô hình được so sánh với nhóm đối chứng phẫu thuật giả. Đối với nhóm mô hình, độ tiềm ẩn trong thử nghiệm tránh bóng tối ngắn hơn đáng kể, và số lần mắc lỗi tăng lên đáng kể, cho thấy khả năng ghi nhớ của chuột trong nhóm mô hình đã giảm đáng kể, và mô hình đánh giá đã được thiết lập thành công. So với nhóm mô hình, độ tiềm ẩn trong thử nghiệm tránh bóng tối ở mỗi nhóm dùng thuốc đã được tăng lên đáng kể, và số lượng sai lầm đã giảm đáng kể. Trong số đó, độ tiềm ẩn của chuột ở các nhóm của sản phẩm A, B và C dài hơn so với độ tiềm ẩn của chuột ở các nhóm của hexasacarit của diaxit mannuronic, và số lượng lỗi của các nhóm cũng ít hơn số lượng lỗi trong hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy rằng các hoạt tính dược lý của các sản phẩm A, B và C đều tốt hơn so với hoạt tính dược lý của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, nhóm sản phẩm D có độ tiềm ẩn của chuột ngắn hơn một chút so với hexasacarit của diaxit mannuronic, và số lượng các lỗi cũng cao hơn một chút, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tương tự, kết quả thử nghiệm này nhất quán với các thử nghiệm trước, cho thấy rằng hàm lượng axit guluronic và tỷ lệ disacarit so với hexasacarit trong chế phẩm có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, khi hàm lượng axit guluronic quá cao, thì hoạt tính của chế phẩm sẽ giảm. Xem Fig. 19 và 20.

1.2 Kết quả thử nghiệm mê cung nước Morris

Trong thử nghiệm này, so với nhóm phẫu thuật giả, Độ tiềm ẩn thoát khỏi thử nghiệm mê cung nước Morris của chuột trong nhóm mô hình lâu hơn đáng kể, cho thấy rằng mô hình chuột sa sút trí tuệ não mạch máu cảm ứng bởi BCCAO đã được thiết lập thành công. So với nhóm mô hình, Độ tiềm ẩn thoát của mỗi nhóm dùng thuốc ngắn hơn đáng kể. Trong số đó, Độ tiềm ẩn thoát của chuột trong các nhóm của sản phẩm A, B, và C ngắn hơn so với Độ tiềm ẩn thoát của chuột trong các nhóm của

hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy rằng các hoạt tính dược lý của các sản phẩm A, B và C đều tốt hơn so với hoạt tính dược lý của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, nhóm sản phẩm D có Độ tiềm ẩn thoát lâu hơn một chút so với hexasacarit của diaxit mannuronic, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Xem Fig. 21.

Bốn ngày sau thử nghiệm điều hướng địa điểm mê cung nước, bực đã được loại bỏ. Thử nghiệm thăm dò không gian được tiến hành để quan sát số lần các con vật vượt qua bực. So với nhóm phẫu thuật giả, số lần chuột vượt qua bực ban đầu trong nhóm mô hình giảm đáng kể, cho thấy khả năng ghi nhớ của chuột BCCAO đã giảm đáng kể; trong khi số lần chuột vượt qua bực ban đầu trong mỗi nhóm dùng thuốc được tăng lên. Trong số đó, số lần chuột vượt qua bực ở các nhóm của sản phẩm A, B và C nhiều hơn số lần chuột vượt qua bực ở các nhóm của hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy các hoạt tính dược lý của các sản phẩm A, B và C đều tốt hơn hoạt tính dược lý của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, nhóm sản phẩm D có số lần chuột vượt qua bực ít hơn một chút so với hexasacarit của diaxit mannuronic, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic. Xem Fig. 22.

(2) Tác dụng trên chuột bị sa sút trí tuệ não mạch do tắc động mạch não giữa (MCAO)

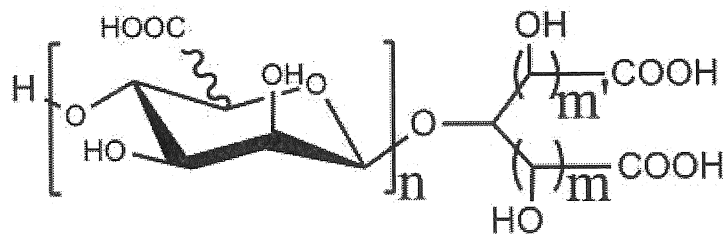
Trong thử nghiệm này, so với nhóm phẫu thuật giả, độ tiềm ẩn thoát khỏi thử nghiệm mê cung nước Morris của chuột trong nhóm mô hình lâu hơn đáng kể, cho thấy rằng mô hình sa sút trí tuệ não mạch cảm ứng bởi MCAO đã được thiết lập thành công. So với nhóm mô hình, độ tiềm ẩn thoát của mỗi nhóm dùng thuốc ngắn hơn đáng kể. Trong số đó, độ tiềm ẩn thoát của chuột trong các nhóm sản phẩm A, B và C ngắn hơn so với độ tiềm ẩn thoát của chuột trong các nhóm của hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy rằng hoạt tính dược lý của các sản phẩm A, B và C đều tốt hơn hoạt tính dược lý của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, nhóm sản phẩm D có độ tiềm ẩn thoát lâu hơn một chút so với hexasacarit của diaxit

mannuronic, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic.

Một ngày sau khi kết thúc thử nghiệm điều hướng địa điểm, thử nghiệm thăm dò không gian đã được thực hiện để quan sát và xác định số lần con vật vượt qua bức trong vòng 2 phút. So với nhóm phẫu thuật giả, số lần chuột vượt qua bức ban đầu giảm đáng kể trong nhóm mô hình, cho thấy khả năng ghi nhớ của chuột trong nhóm MCAO đã giảm đáng kể; trong khi số lần chuột vượt qua bức ban đầu trong mỗi nhóm dùng thuốc được tăng lên. Trong số đó, số lần chuột vượt qua bức trong các nhóm các sản phẩm A, B và C cao hơn trong hexasacarit của diaxit mannuronic, cho thấy rằng các hoạt tính dược lý của các sản phẩm A, B và C tất cả đều tốt hơn so với hoạt tính dược lý của hexasacarit của diaxit mannuronic. Tuy nhiên, nhóm sản phẩm D có số lần chuột vượt qua bức thấp hơn một chút so với hexasacarit của diaxit mannuronic, phản ánh rằng hoạt tính của sản phẩm D yếu hơn hoạt tính của hexasacarit của diaxit mannuronic.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm alginic sacarit diaxit chứa hỗn hợp axit mannuronic và axit guluronic có công thức (IV) hoặc muối được dụng của chúng:



Công thức (IV)

trong đó n là số nguyên được chọn từ 1 đến 9, m được chọn từ 0, 1 hoặc 2, m' được chọn từ 0 hoặc 1,

và trong đó,

tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $n=1-5$ chiếm nhiều hơn 60% tổng trọng lượng của chế phẩm;

trong đó, tổng trọng lượng của axit guluronic chiếm 1%-30% tổng trọng lượng của chế phẩm, và trong đó tổng trọng lượng alginic sacarit diaxit mà $m+m'=1$ và 2 không ít hơn 50% tổng trọng lượng của chế phẩm.

2. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $m+m'=1$ không ít hơn 10% tổng trọng lượng của chế phẩm.

3. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $m+m'=2$ không ít hơn 10% tổng trọng lượng của chế phẩm.

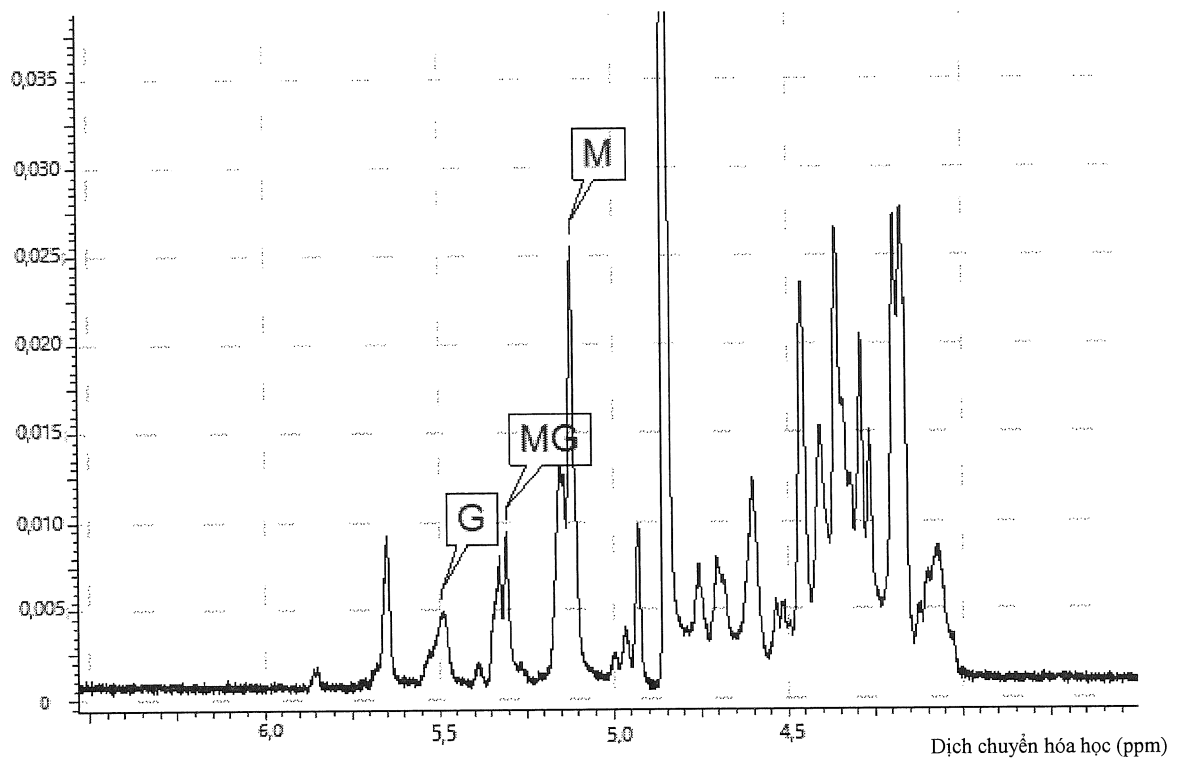
4. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $n=1-5$ chiếm 80%-95% tổng trọng lượng của chế phẩm.

5. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $n=1-3$ chiếm 20%-70% tổng trọng lượng của chế phẩm.

6. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó tỷ lệ tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $n=1-3$ so với tổng trọng lượng của alginic oligosacarit diaxit trong đó $n=4-7$ là giữa 1,0 và 3,5.

7. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 6, trong đó tỷ lệ tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $n=1-3$ so với tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $n=4-7$ là giữa 1,0 và 3,0.
8. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó hàm lượng phần trăm trọng lượng của alginic sacarit diaxit với mỗi mức độ polyme hóa trong chế phẩm là: $n=1$: 5-25%, $n=2$: 15-30%, $n=3$: 15-28%, $n=4$: 10-25%, $n=5$: 5-15%, $n=6$: 3-10%, $n=7$: 2-5%, $n=8$: 1-5%, $n=9$: 1-5%.
9. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 8, trong đó hàm lượng phần trăm trọng lượng của alginic sacarit diaxit với mỗi mức độ polyme hóa trong chế phẩm là: $n=1$: 10-20%, $n=2$: 18-30%, $n=3$: 15-28%, $n=4$: 15-20%, $n=5$: 5-10%, $n=6$: 3-5%, $n=7$: 2-3%, $n=8$: 1-3%, $n=9$: 1-3%.
10. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó muối được dụng là muối natri hoặc muối kali.
11. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1 và chất mang phù hợp khi cần thiết.
12. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $m+m'=1$ và 2 chiếm 60%-90% tổng trọng lượng của chế phẩm.
13. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $m+m'=1$ chiếm 30%-40% tổng trọng lượng của chế phẩm.
14. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của alginic sacarit diaxit trong đó $m+m'=2$ chiếm 30%-50% tổng trọng lượng của chế phẩm.
15. Chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 9, trong đó muối được dụng là muối natri hoặc muối kali.
16. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu chế phẩm alginic sacarit diaxit theo điểm 9 và chất mang phù hợp khi cần thiết.

1/14



2/14

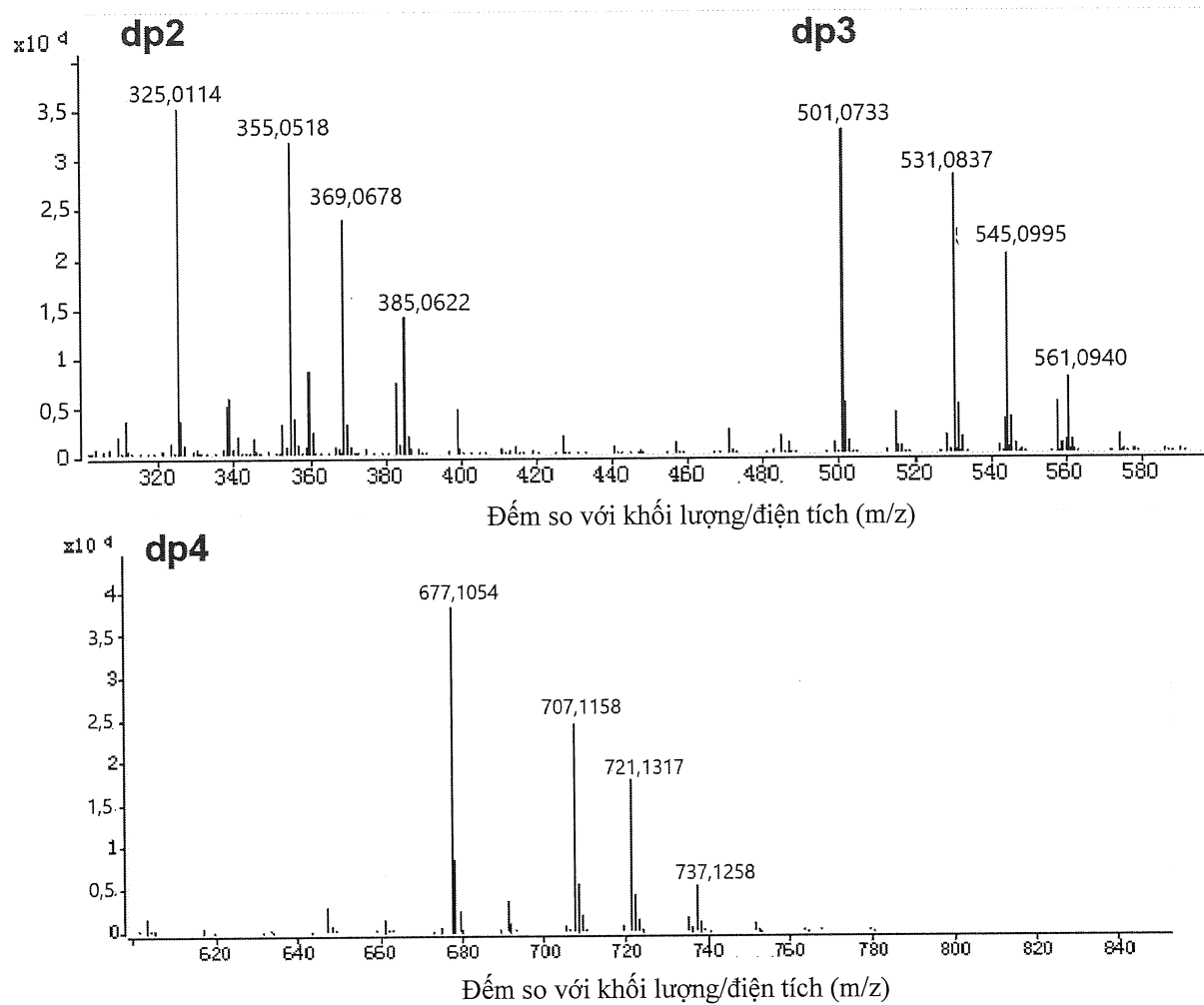


FIG.2

3/14

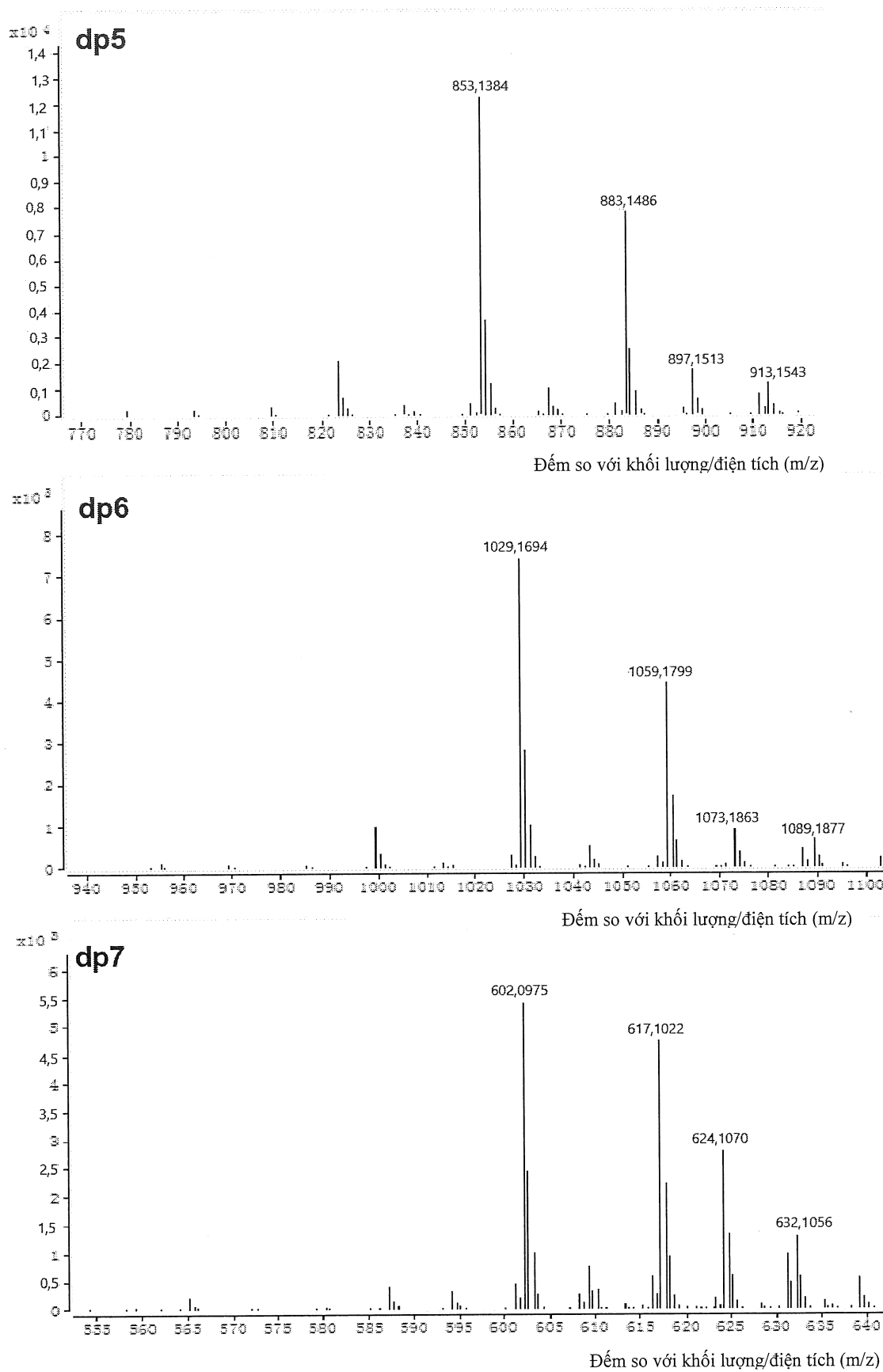


FIG.3

4/14

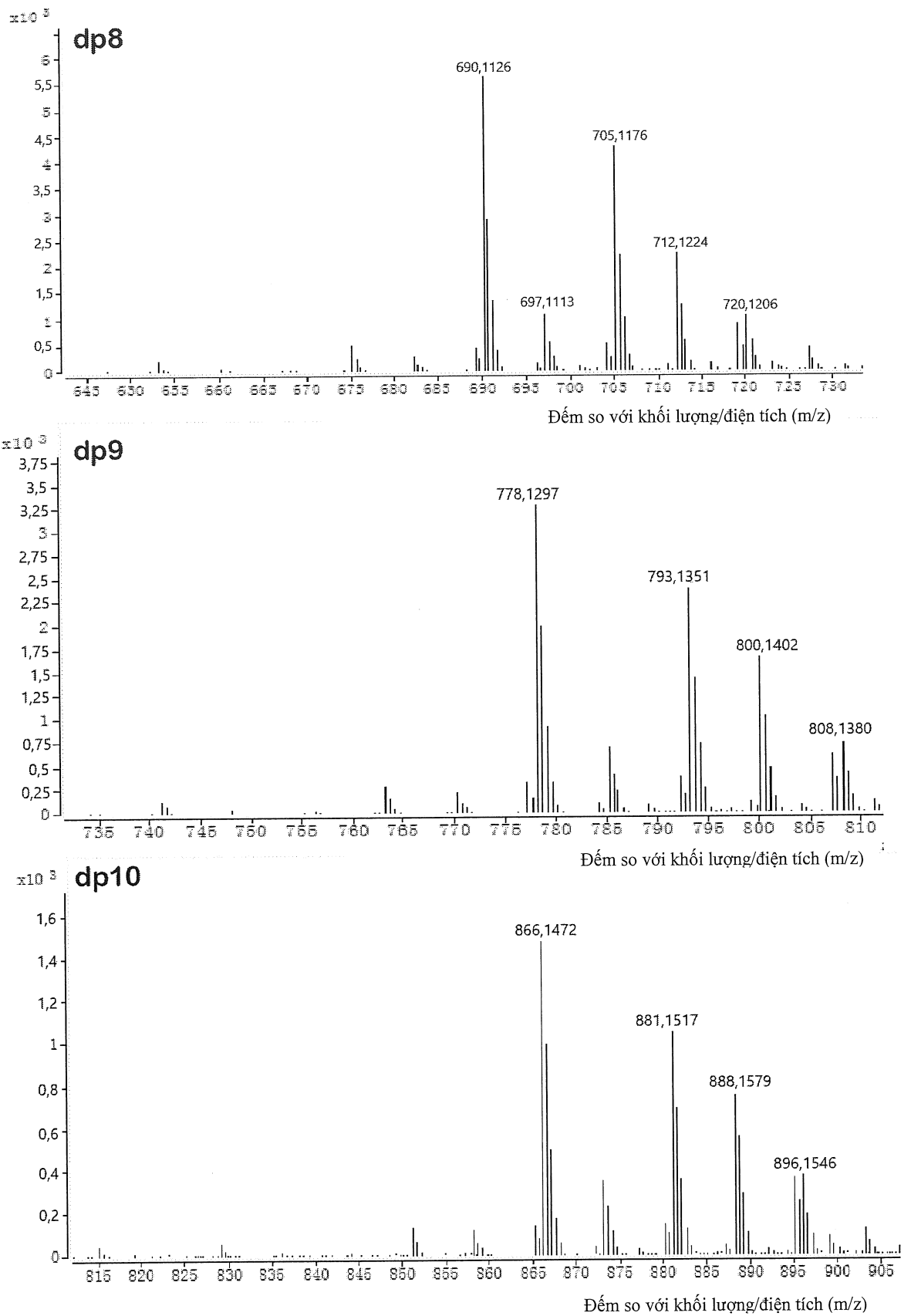


FIG.4

5/14

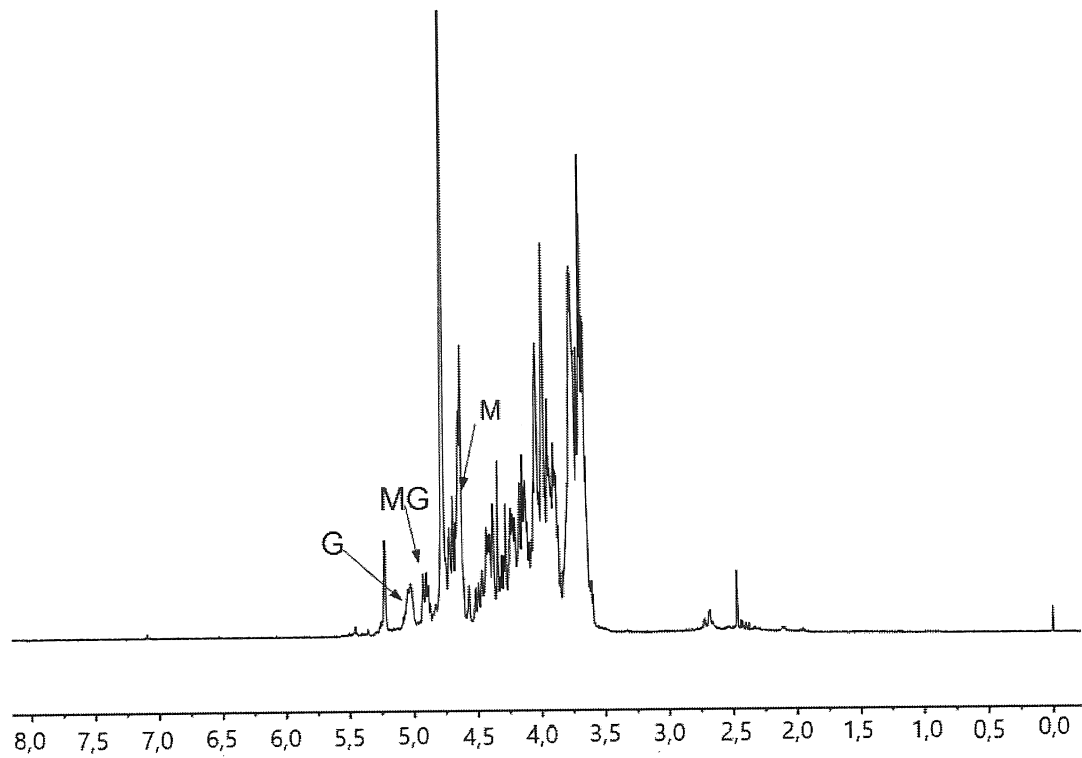


FIG. 5

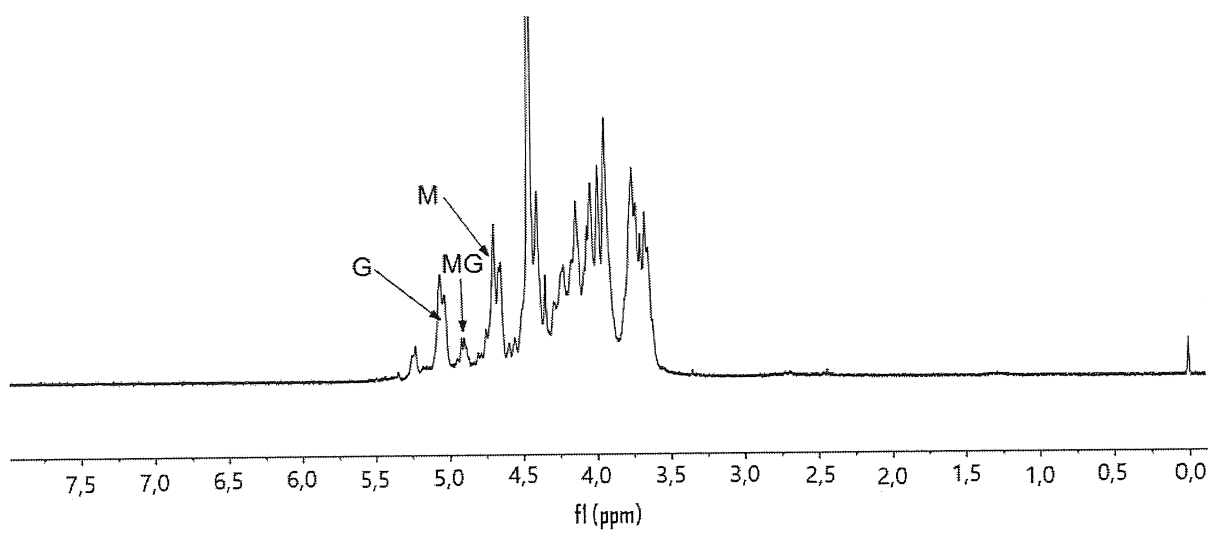


FIG. 6

6/14

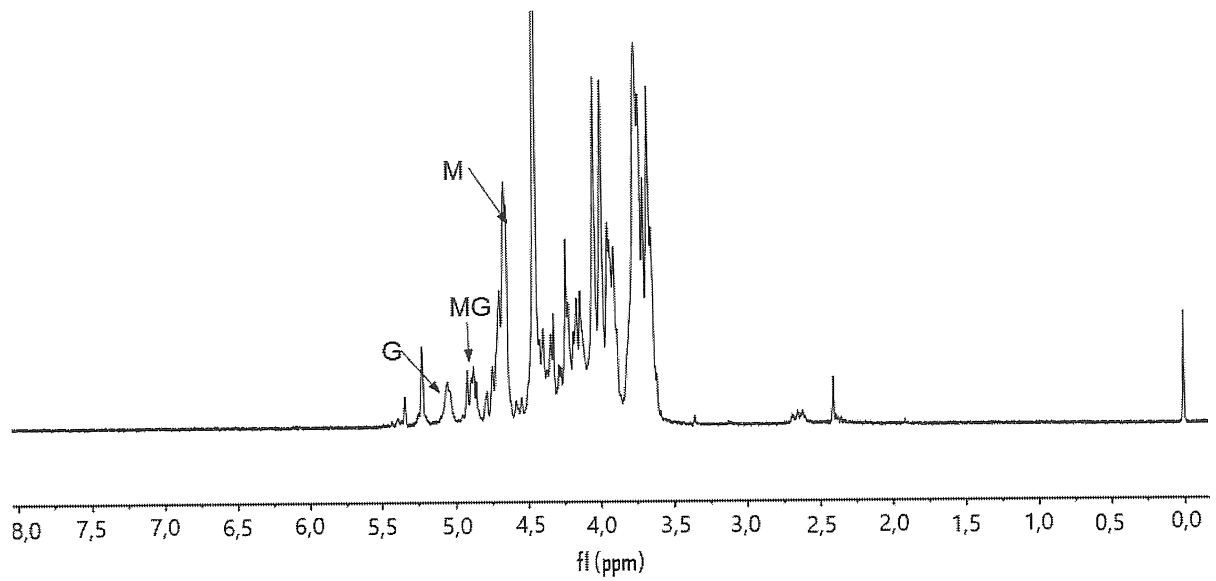


FIG. 7

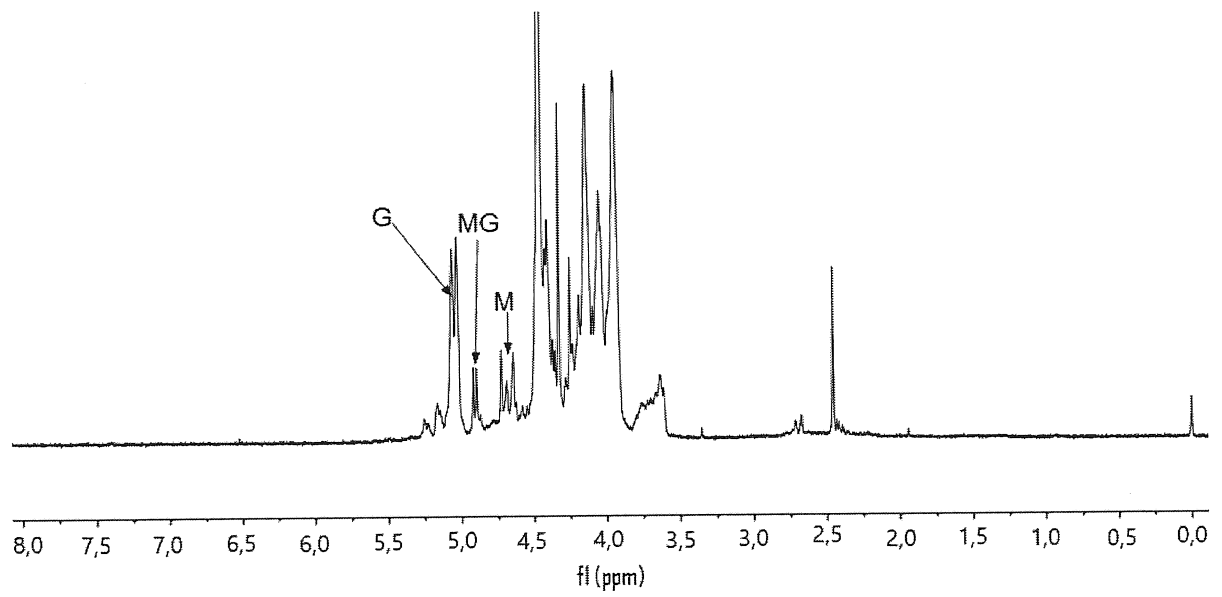


FIG. 8

7/14

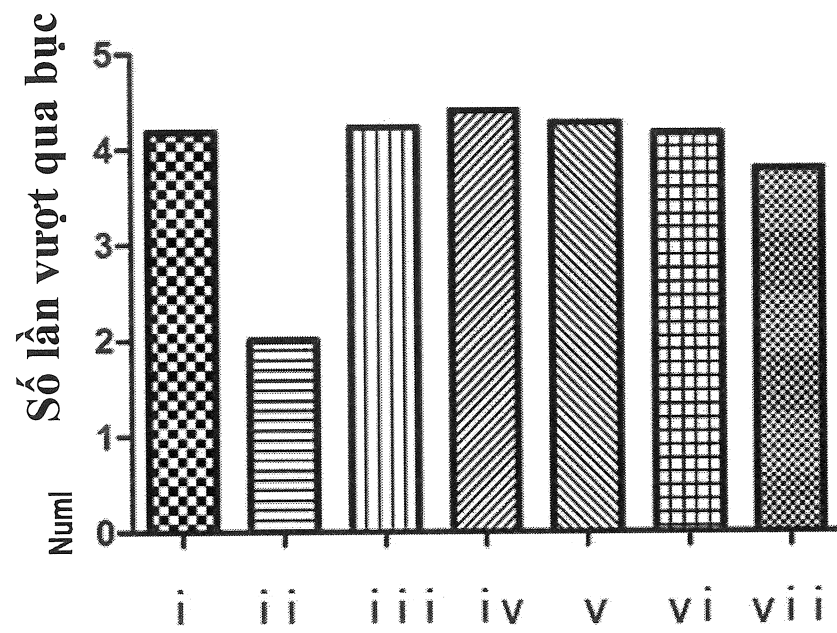


FIG.9

8/14

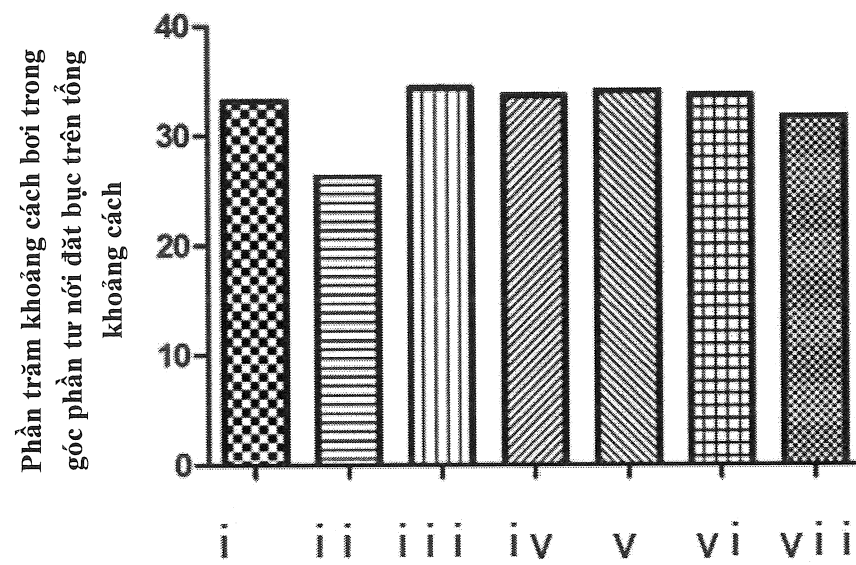


FIG.10

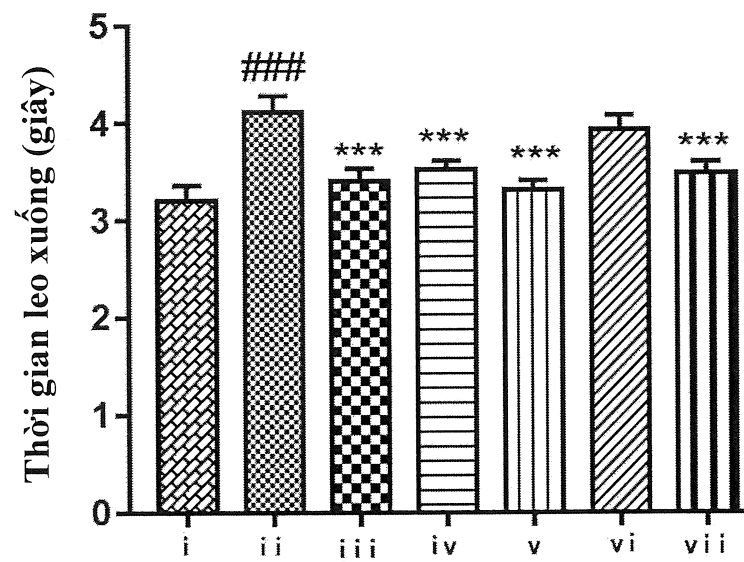


FIG.11

9/14

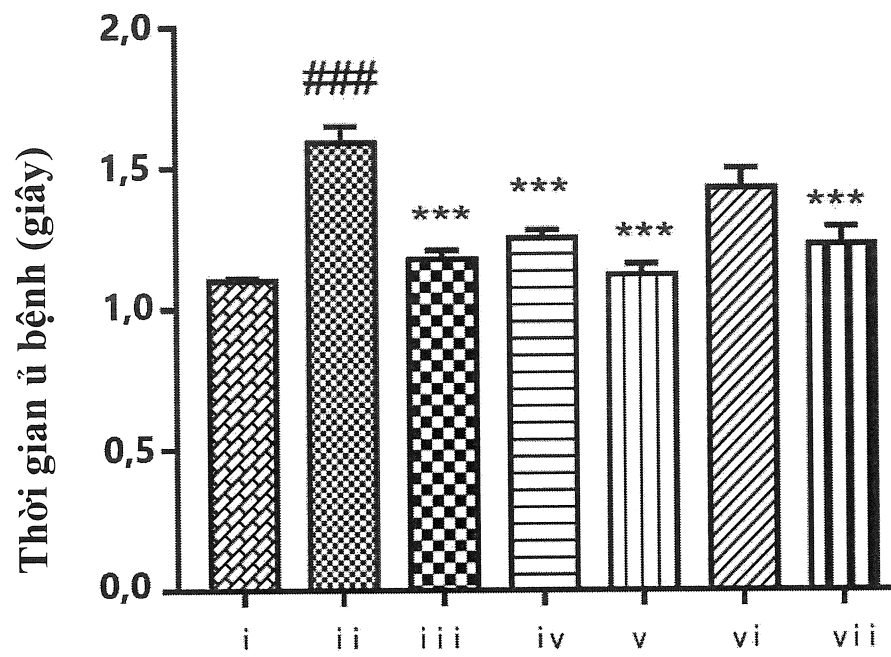


FIG.12

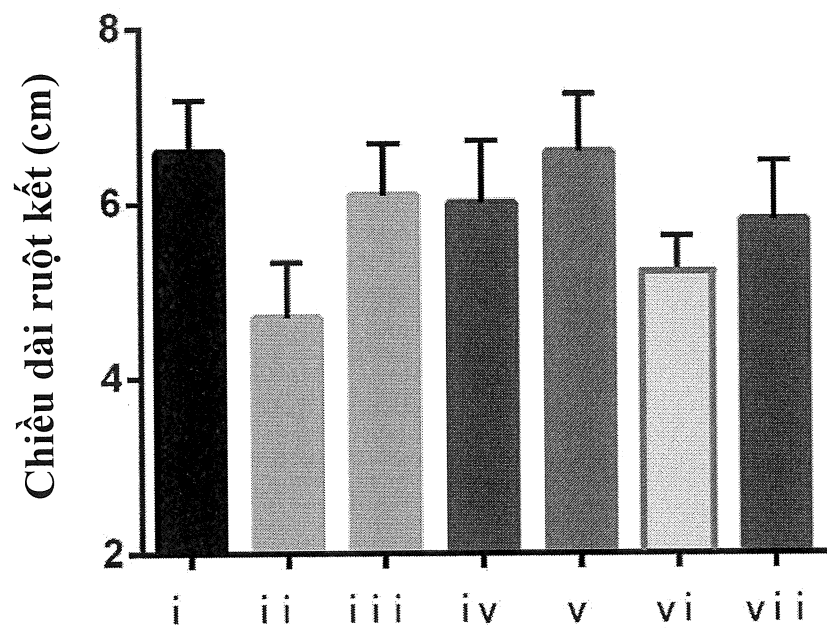


FIG.13a

10/14

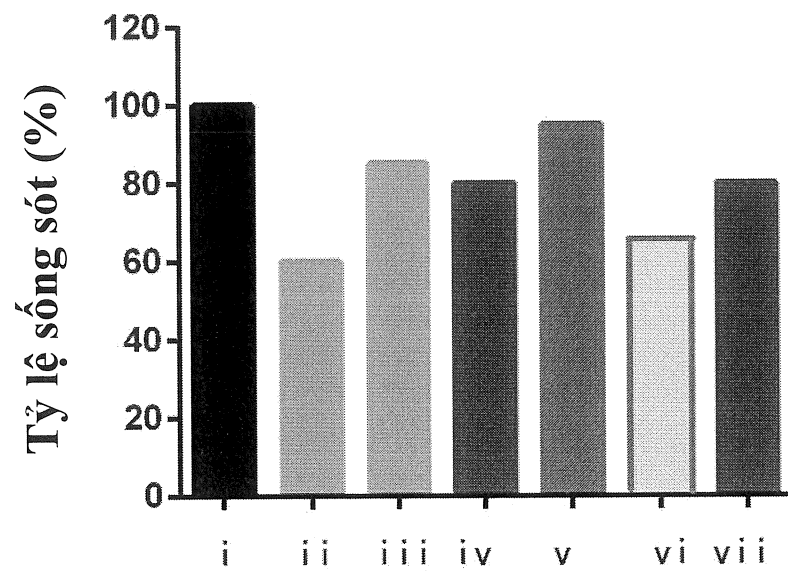


FIG.13b

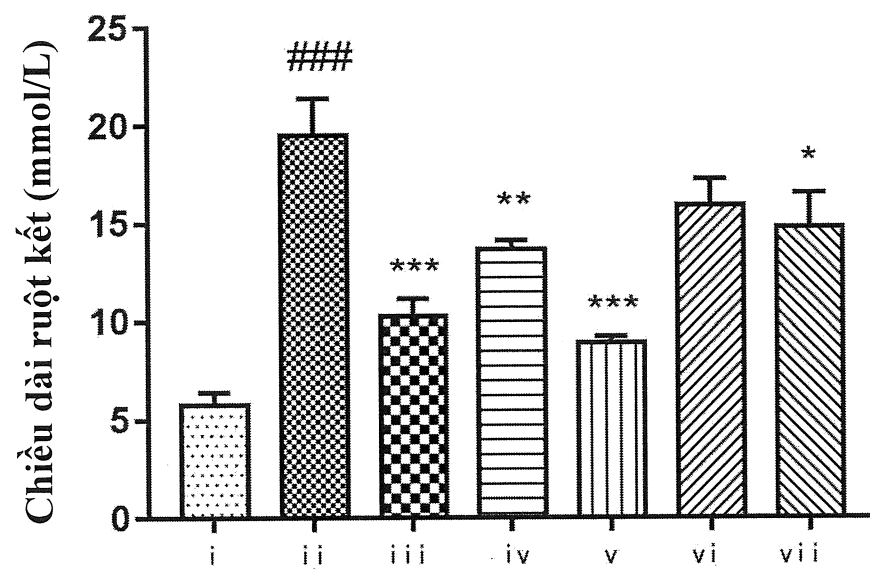


FIG.14

11/14

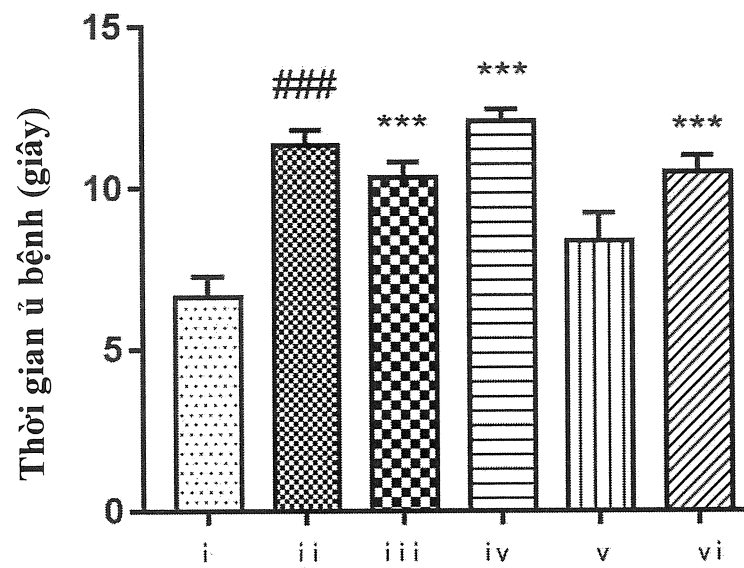


FIG.15

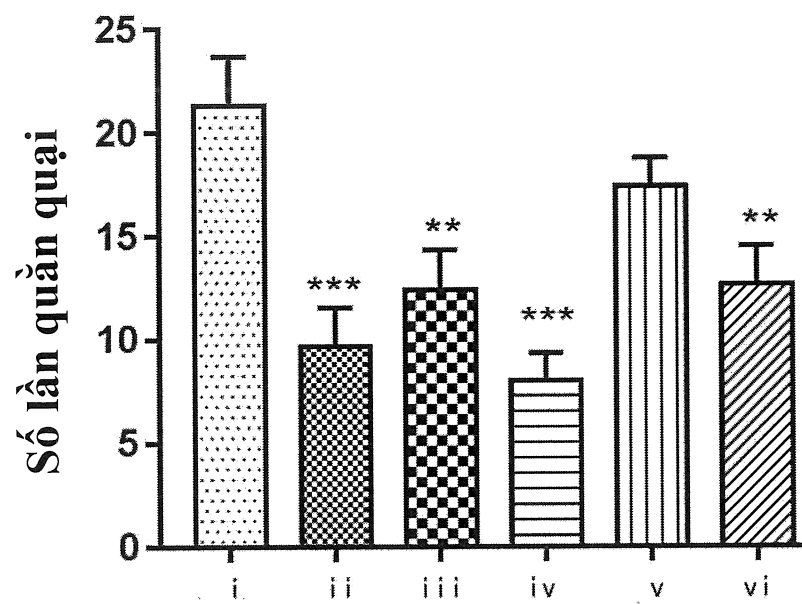


FIG.16

12/14

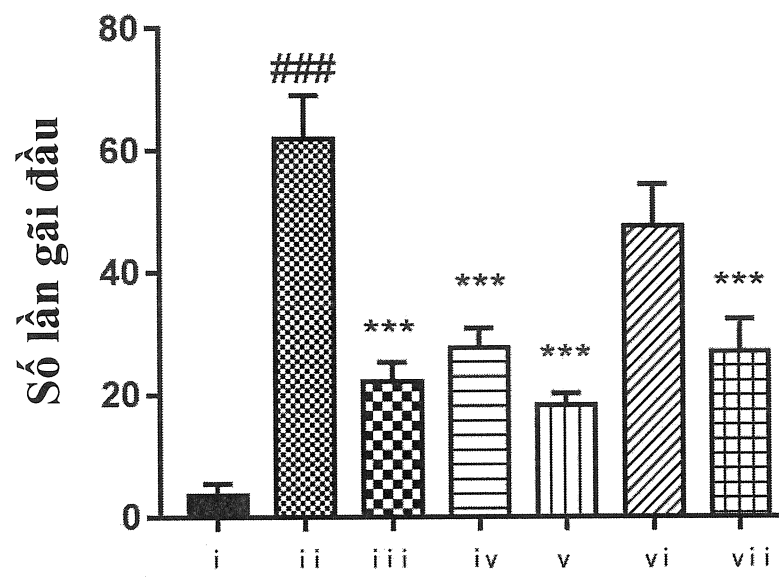


FIG.17

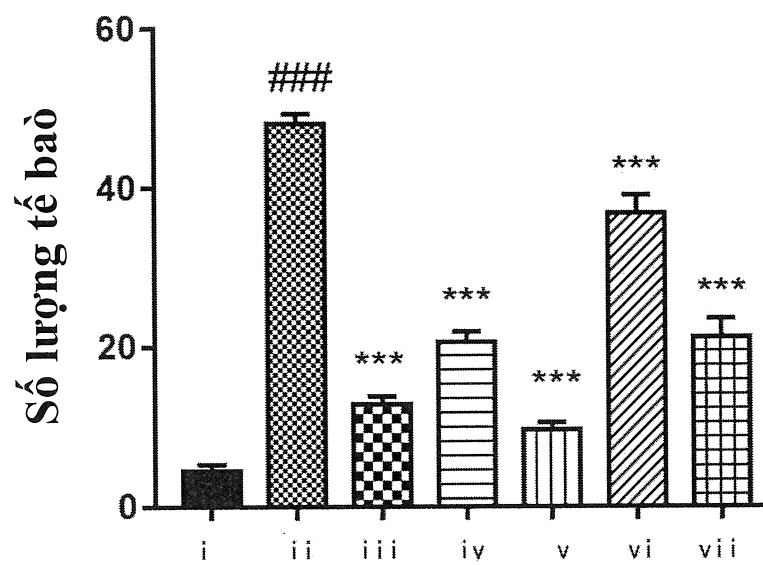


FIG.18

13/14

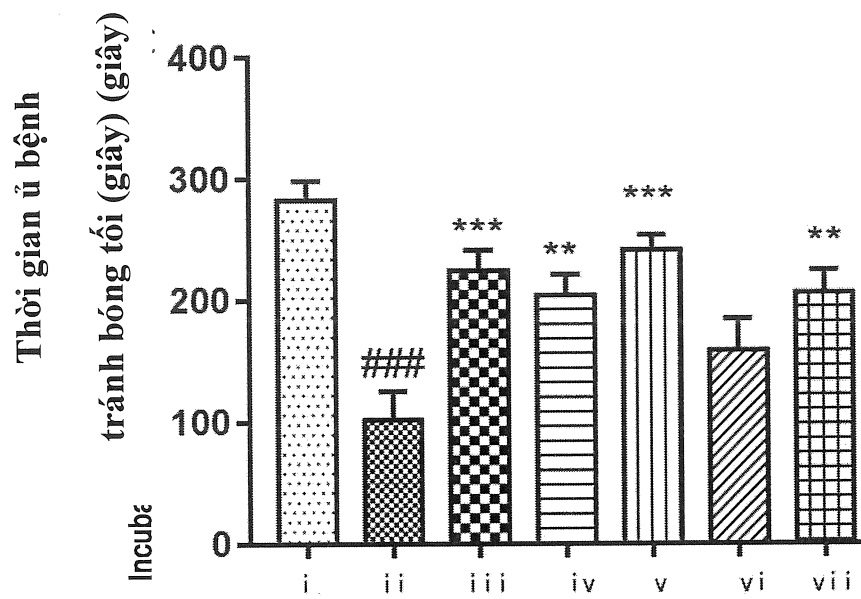


FIG.19

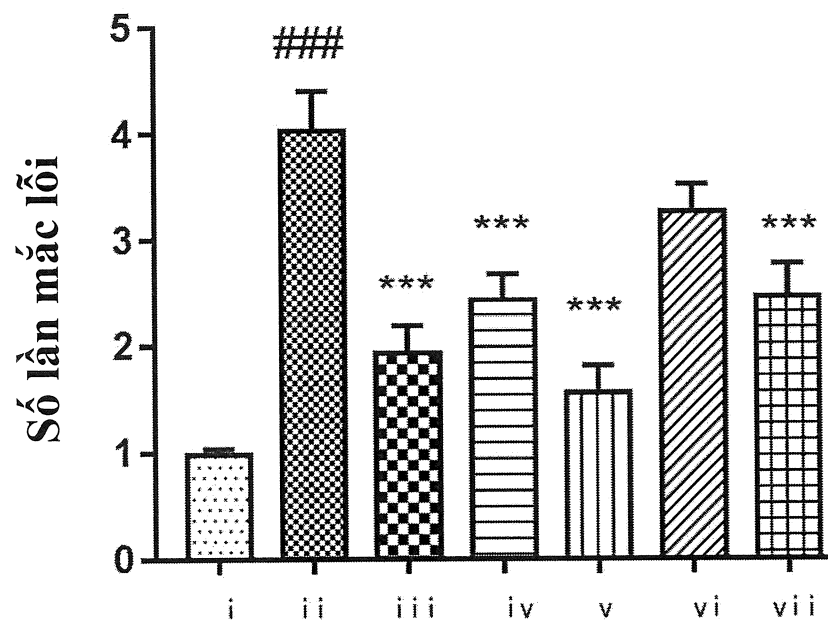


FIG.20

14/14

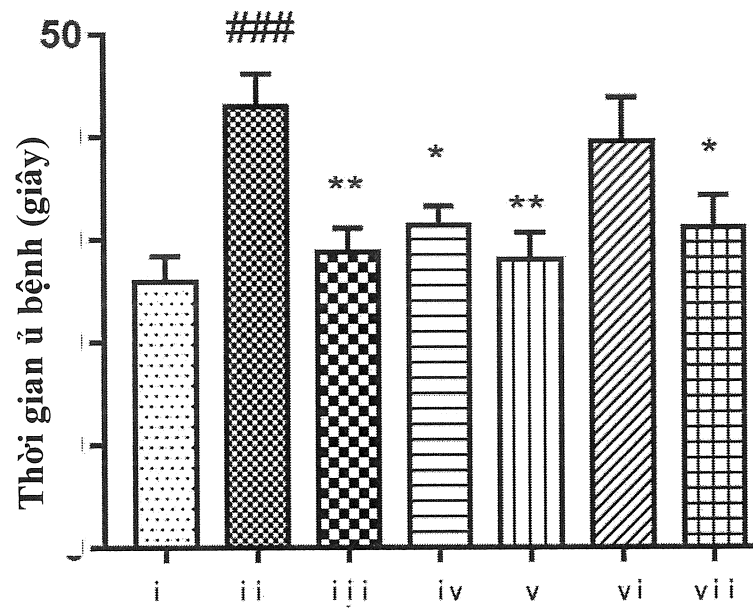


FIG.21

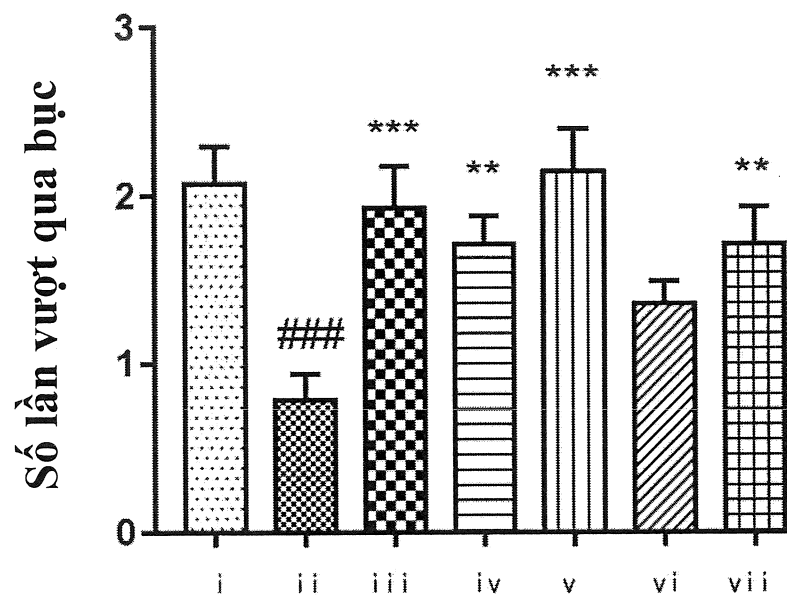


FIG.22