



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

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

(11) 
1-0022385

(51)⁷ **A61K 31/197, 31/366, 31/455, A61P**
3/06, 7/02, 9/10

(13) **B**

(21) 1-2012-00205

(22) 21.06.2010

(86) PCT/LV2010/000008 21.06.2010

(87) WO2010/151096 29.12.2010

(30) P-09-116 25.06.2009 LV

P-10-94 21.06.2010 LV

(45) 25.12.2019 381

(43) 25.06.2012 291

(73) TETRA, SIA (LV)

Aizkraukles iela 21, LV-1006 Riga, Latvia

(72) KALVINS, Ivars (LV), BIRMANS, Anatolijs (LV), VEVERIS, Maris (LV),
LEBEDEVIS, Antons (LV), MISNOVS, Anatolijs (LV)

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) **DƯỢC PHẨM CHỨA AXIT NICOTINIC VÀ MELDONIUM**

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa axit nicotinic hoặc muối được dụng của nó với liều hữu hiệu và meldonium hoặc muối được dụng của nó với liều hữu hiệu kết hợp với tá dược hoặc chất mang dược dụng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa axit nicotinic hoặc muối được dụng của nó với liều hữu hiệu và meldonium hoặc muối được dụng của nó với liều hữu hiệu kết hợp với tá dược hoặc chất mang được dụng.

Các ký hiệu viết tắt sau được sử dụng trong bản mô tả:

ATP:	Adenosin triphosphat
C:	Cholesterol
GL:	Glucoza
HDL-C:	Lipoprotein-cholesterol tỷ trọng cao
I/R:	Bệnh thiếu máu cục bộ/tái đồ bưng mặt
LDL-C:	Lipoprotein-cholesterol tỷ trọng thấp
MD:	Meldonium (INN)
NA:	Axit nicotinic
NAMg:	Muối magie của axit nicotinic
PI:	Piracetam
RPP:	Tích số của huyết áp và nhịp tim = huyết áp trung bình x nhịp tim $\times 1000^{-1}$
SI:	Simvastatin
TG:	Triglyxerit
TR:	Triton WR1339 (Tyloxapol)
VF:	Rung tâm thất
VT:	Nhịp tim nhanh tâm thất

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

NA là dược chất quan trọng trong điều trị rối loạn chuyển hóa lipid và duy nhất hiện nay có hoạt tính hữu hiệu đến toàn bộ các dạng lipid: làm giảm nồng độ cholesterol tổng số, nồng độ TG tổng số và nồng độ LDL-C tổng số trong máu và làm tăng nồng độ HDL-C hữu hiệu nhất trong số các dược chất biến đổi lipid (Pieper JA, *Am J Manag Care* 2002; 8 (12 Suppl): S308-14).

NA đã được báo cáo là hữu hiệu trong điều trị rối loạn chuyển hóa lipid ngay từ năm 1955 (Altshul R, Hoffer A, Stephen JD, *Arch Biochem Biophys* 1955; 54: 558-559) và 1959 (Parsons Jr WB, Flinn JH, *AMA Arch Intern Med* 1959; 103: 783-790).

Do NA làm gia tăng hữu hiệu nồng độ HDL-C (McKenney J, *Arch Intern Med* 2004; 164 (7): 697-705. Carlson LA, *J Intern Med* 2005; 258: 94-114), nên NA hiện được kết hợp với các dược chất cải biến lipid khác tác động chủ yếu đến nồng độ LDL-C, để làm gia tăng nồng độ HDL-C (Rosenson RS, *Am J Med* 2005; 118 (10): 1067-77).

NA là được chất biến đổi lipid một cách hữu hiệu, phòng ngừa tiến triển hội chứng xơ vữa động mạch và làm giảm các ca tim mạch trong lâm sàng (Savel'ev AA, Shershevskii MG, *Klin Med (Rus)* 1996; 74: 48-52. Drexel H, *European Heart Journal Supplements* 2006; Vol 8, Suppl F: F23-F29. Brown BG, Zhao XQ, *Am J Cardiol* 2008; 101 (8A): 58B-62B) bằng cách làm tăng nồng độ HDL-C. NA làm giảm tỷ lệ mắc phải và tỷ lệ tử vong ở các bệnh nhân bị hội chứng tăng lipid máu (Canner PL et al, *J Am Coll Cardiol* 1986; 8: 1245-55). NA là được chất làm tăng HDL-C hữu hiệu nhất trong điều trị các trường hợp hội chứng tăng lipid máu (Ellingworth DR et al, *Arch Intern Med* 1994; 154: 1586-95. Schectman G et al, *Am J Cardiol* 1993; 71: 758-65). NA làm giảm chứng huyết khối, giảm độ nhớt của máu và có tác dụng bảo vệ tim có thể hạn chế thương tổn do thiếu máu cục bộ-tái đồ bùng mặt. (Lamping KA et al, *Pharm Exp Ther* 1984; 231 (3): 532-538. Trueblood NA et al, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279 (2), H764-H771. Rosenson RS *Atherosclerosis* 2003; 171 (1): 87-96).

Do nồng độ HDL-C thấp là yếu tố rủi ro trong đột quỵ (Wannamethee SG, Shaper AG, Ebrahim S, *Stroke* 2000; 31: 1882. Sacco RL, Benson RT, Kargman DE *JAMA* 2001; 285: 2729-2735. Rizos E, Mikhailidis DP, *Cardiovasc Res* 2001; 52 (2), 199-207. Sanossian N, Tarlov NE, *Curr Treatmt Opt Cardio Med* 2008; 10 (3), 195-206). NA có hoạt tính làm tăng HDL-C (Carlson LA, *Curr Opin Cardiol* 2006; 21 (4) 336-344) sẽ hữu ích để phòng ngừa đột quỵ và các tình trạng sau đột quỵ (Koniukov SG, Liberzon SP, *Klin Med (Mosk)* 1975; 53 (9): 38-41.). Đã biết rằng nồng độ HDL-C giảm ở thời điểm đột quỵ do thiếu máu cục bộ cấp tính (Russman AN et al, *J Neurol Sci* 2009; 279 (1-2): 53-56). Đã thấy rằng NA cải thiện khả năng phục hồi chức năng sau đột quỵ (Chen J et al, *Ann Neurol* 2007; 62 (1): 49-58). HDL-C cũng đã được đề xuất để điều trị đột quỵ và các tình trạng liên quan đến thiếu máu cục bộ khác (Kapur NK et al, *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4 (1): 39-57. EP 1 425 031).

NA được bào chế ở ba dạng chế phẩm (giải phóng tức thì, giải phóng kéo dài và giải phóng duy trì). NA giải phóng tức thì thường gây ra tác dụng không mong muốn là hiện tượng đỏ bừng mặt và làm tăng nồng độ glucoza trong máu. NA giải phóng duy trì làm giảm hiện tượng đỏ bừng mặt, nhưng có rủi ro do gây độc cho gan. NA giải phóng kéo dài ít gây ra hiện tượng đỏ bừng mặt và nguy cơ gây tổn thương gan thấp (Pieper JA, *Am J Health Syst Pharm* 2003; 60 (13 Suppl 2): S9-14. McKenney J, *Arch Intern Med*

2004; 164 (7): 697-705. Knopp RH, *Am J Cardiol* 2008; 86 (Suppl); 51L-56L). Việc sử dụng NA ở dạng muối natri, kali và magie cũng được mô tả.

Nhược điểm chính của NA là buộc phải sử dụng liều lớn để biến đổi nồng độ lipit trong máu. Hầu như 100% đối tượng được điều trị bằng NA bị các tác dụng không mong muốn là hiện tượng đỏ bừng mặt và trong nhiều trường hợp tác dụng không mong muốn này làm hạn chế việc điều trị bằng NA. Prostaglandin D2 được giải phóng dưới da được xác định là nguyên nhân trực tiếp gây ra hiện tượng đỏ bừng mặt do NA gây ra (Morrow JD et al, *J Invest Dermatol* 1992; 98: 812-5). Do hiện tượng đỏ bừng mặt có liên quan đến NA là do hoạt tính của prostaglandin, nên axit axetylsalixylic ức chế tổng hợp prostaglandin đã được sử dụng để điều trị hiện tượng đỏ bừng mặt. Ngoài axit axetylsalixylic, các NSAIDS khác cũng có hoạt tính này (Oberwittler H, Baccara-Dinet M, *Int J Clin Pract* 2006; 60 (6): 707-715). Tuy nhiên, các NSAIDS cũng có nhiều tác dụng không mong muốn và có thể gây ra bệnh loét và kích ứng đường tiêu hóa.

Gần đây, chất đối kháng đặc hiệu thụ thể prostaglandin D2 tít phụ 1 (Parhofer KG, *Vascular Health and Risk Management* 2009 ;5 :901-908), laropiprant, được sử dụng để làm giảm hiện tượng đỏ bừng mặt do NA gây ra (Lai E et al, *Clin Pharm Ther* 2007; 81: 849-857. Davidson MH, *Am J Cardiol* 2008; 101 (suppl): 14B-19B). Mặc dù, sẽ làm giảm tần xuất của hiện tượng đỏ bừng mặt, nhưng laropiprant sẽ không loại bỏ hoàn toàn được tác dụng không mong muốn này. Laropiprant không làm thay đổi tác dụng của niacin đối với lipit hoặc các tác dụng không mong muốn khác của niacin. Do đó, tổ hợp chứa niacin và laropiprant có thể cho phép sử dụng niacin ở liều lượng cao hơn và do đó khai thác được toàn bộ tiềm năng của thuốc này (Parhofer KG, *Vascular Health và Risk Management* 2009; 5: 901-908, Olsson AG, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2010; 11 (10): 1715-1726).

Các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường tít 2 thường bị rối loạn chuyển hóa lipit đặc trưng bởi nồng độ TG tăng cũng như nồng độ HDL-C giảm. Do có hoạt tính trên chuyển hóa lipit, nên NA sẽ làm giảm rối loạn chuyển hóa lipit ở các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường tít 2. Tuy nhiên, một số báo cáo cho thấy rằng NA làm tăng tính kháng insulin (Garg A, Grundy SM, *JAMA* 1990; 264: 723-6. Kahn SE et al, *Diabetes* 1989; 38: 562-8) và làm tăng nồng độ glucoza (Elam, MB et al, *JAMA* 2000; 284 (10): 1263-1270). Do đó NA chỉ được khuyến cáo sử dụng ở liều thấp cho các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường (<2g/ngày). (Shepher J, Betteridge J, Van Gaal L, *Curr Med Res Op* 2005; 21 (5):

665-682). Do đó, cần có các dược chất thể hệ mới giúp cải thiện kiểm soát nồng độ glucoza trong máu ở các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường sử dụng NA. Hoạt tính làm giảm glucoza máu của meldonium đã được lưu ý trong lâm sàng (Statsenko ME et al, *Klin Med (Rus)* 2007; 85 (7): 39-42), do dược chất này được hi vọng là có thể kết hợp với NA để tạo ra hiệu quả điều trị cao hơn trên lâm sàng.

Các tiểu cầu đóng vai trò quan trọng trong sự tiến triển của chứng hội chứng xơ vữa động mạch và sự hình thành các cục nghẽn gây chết người trong bệnh mạch vành tim. Chất chống kết tập tiểu cầu có ý nghĩa lớn trong phòng ngừa và khống chế các bệnh khác nhau bao gồm tim mạch, mạch não và hệ động mạch ngoại biên (Meadows TA et al, *Circ Res* 2007; 100 (9): 1261-75). NA là dược chất biến đổi lipit hữu hiệu phòng ngừa chứng hội chứng xơ vữa động mạch và làm giảm các trường hợp tim mạch. NA có tác dụng chống huyết khối và hoạt tính trên các lipoprotein khác nhau do hội chứng xơ vữa động mạch giúp cải thiện chức năng nội mô, làm giảm viêm, gia tăng độ ổn định mảng bám và làm giảm chứng huyết khối (Rosenson RS, *Atherosclerosis* 2003; 171: 87-96)

NA ức chế kết tập tiểu cầu (Lakin KM, *Farmakol Toksikol*, 1980; 43 (5): 581-5). NA tác động đến hoạt tính tiểu cầu *in vitro* bằng cách ức chế nhẹ kết tập tiểu cầu, và kích thích giải phóng prostaglandin đáng kể, với sự biểu hiện thụ thể tiểu cầu chính gần như nguyên vẹn. Tác dụng của NA là duy nhất, khác với các dược chất kháng tiểu cầu đã biết khác và gợi ra cơ hội tiềm năng để sử dụng trong tổ hợp trị liệu (Serebruany VL et al, *Thrombosis and Haemostasis*, 2010 (in press)).

NA ức chế gần như hoàn toàn sự hình thành cục nghẽn trong mạch do thromboplastin và pituitrin gây ra, cho thấy NA có tác dụng làm tan huyết khối (Baluda VP, *Kardiologija* 1974; 14 (11): 105-7 (Rus). Các đặc tính chống huyết khối của NA được mô tả trong tài liệu Shestakov VA, *Probl Gematol Pereliv Krovi*, 1977; 22 (8): 29-35. Chekalina SI, *Sov Med* 1982 (5) :105-8. Niacin làm giảm nguy cơ đông máu (Chesney CM et al, *Am Heart J*, 2000; 140: 631-36).

MD là thuốc gây ảnh hưởng có lợi cho tim và mạch. Một số hoạt tính mong muốn của MD được phát hiện ở mô hình hội chứng xơ vữa động mạch trên động vật (Veveris M, Smilsaraja B, *Baltic J Lab Anim Sci* 2000; 10,194-199. Veveris M et al., *Baltic J Lab Anim Sci* 2002; 12: 116-122. Okunevich IV, Ryzhenkov VE, *Patol Fiziol Eksp Ter* 2002; (2): 24-7), và được quan sát trong lâm sàng (Karpov RS et al, *Ter Arkh* 1991; 63 (4): 90-

3), do đó mong đợi là dược chất này có thể được kết hợp với NA để mang lại lợi ích hơn nữa trong lâm sàng.

Cũng nhận thấy rằng MD ức chế kết tập tiểu cầu (Tsirkin VI, *Ros Kardiolog Zh* 2002; 1: 45-52). Việc sử dụng MD qua đường miệng trong hai tuần để mục đích trị liệu ở thỏ và chó bị mắc chứng huyết khối động mạch thử nghiệm có tác dụng làm tan huyết khối (Logunova L et al, *Experim Clin Pharmacoter* 1991; 19: 91-98 (Rus)). Chưa hề có dữ liệu nào về tác dụng phòng ngừa của MD đối với việc làm giảm hoặc phòng ngừa chứng huyết khối.

Xu hướng hiện nay là phát triển các tổ hợp để điều trị các rối loạn liên quan đến chuyển hóa để cải thiện hiệu quả chăm sóc trong lâm sàng (Black DM, *Curr Ther Rep* 2003; 5: 39-32). Do các fibrat, NA và statin điều chỉnh nồng độ lipid trong huyết thanh theo các cơ chế khác nhau, nên phương pháp điều trị kết hợp có thể tạo ra các lợi ích mong muốn cụ thể ở bệnh nhân tốt hơn so với phương pháp điều trị bằng cách sử dụng riêng biệt từng dược chất. Do ít có tiến triển trong việc phát triển các dược chất mới để làm giảm nồng độ LDL-C, nghiên cứu này hướng tới việc phát triển các dược chất tốt hơn để gia tăng nồng độ HDL-C. Việc sử dụng tổ hợp trị liệu bao gồm NA, fibrat, statin và chất tạo phức kim loại axit mật (bile acid sequestrants) dùng để điều trị các rối loạn liên quan đến chuyển hóa ngày càng tăng do profin cộng hợp của các sản phẩm kết hợp (Miller M, *Mayo Clin Proc* 2003; 78 (6): 735-42. Backes JM et al, *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1 (4): 317-331. Belsey L et al, *Curr Med Res Opin* 2008; 24 (9), 2703-9. Rosenson RS, Pitt B, *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009; 6 (2): 98-100). Ngày càng gia tăng việc sử dụng tổ hợp trị liệu gồm NA và các chất khác, ví dụ như, axit axetylsalicylic và các NSAID khác làm các chất ức chế tiểu cầu (USP 5,981,555). Tuy nhiên, các tổ hợp này không làm tăng hoạt tính của NA, tức là không có tác dụng hiệp đồng nào được báo cáo. Do đó, các dược chất bất kỳ có thể làm tăng cường tác dụng chữa bệnh của NA ở các bệnh liên quan đến chuyển hóa, mà không làm tăng các tác dụng không mong muốn của NA sẽ có tác dụng có lợi trong lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa axit nicotinic hoặc muối được dùng của nó với liều hữu hiệu và meldonium hoặc muối được dùng của nó với liều hữu hiệu kết hợp với tá dược hoặc chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa cả NA lẫn MD.

Sáng chế cũng đề xuất tổ hợp có tác dụng phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn liên quan đến chuyển hóa, bằng cách sử dụng NA cùng với MD, điều này còn có lợi nữa là làm giảm các tác dụng không mong muốn của NA. Tổ hợp theo sáng chế có tác dụng hiệp đồng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn liên quan đến chuyển hóa, bao gồm rối loạn chuyển hóa lipid, hội chứng tăng lipid máu, hội chứng xơ vữa động mạch, bệnh mạch vành tim được chọn từ nhóm bao gồm chứng đau thắt ngực và nhồi máu cơ tim, thiếu máu não cục bộ tạm thời và thường trực bao gồm tai biến mạch máu não và đột quỵ và bệnh tắc nghẽn động mạch ngoại biên, phòng ngừa tình trạng kết tập tiểu cầu và chứng huyết khối.

Tổ hợp theo sáng chế được xem là có tác dụng hiệp đồng khi tác dụng điều trị của nó cao hơn tác dụng của NA hoặc MD riêng biệt. Cần hiểu rằng tổ hợp được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là sử dụng đồng thời, lần lượt hoặc riêng biệt các dược chất trong tổ hợp.

Các mục đích khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện ảnh hưởng của NA, dung môi và dung môi dùng cho LA đến nhiệt độ da tai chuột.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa axit nicotinic hoặc muối được dụng của nó với liều hữu hiệu và meldonium hoặc muối được dụng của nó với liều hữu hiệu kết hợp với tá dược hoặc chất mang được dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế theo các phương pháp thông thường bằng cách sử dụng các tá dược hoặc chất mang được dụng và các kỹ thuật thông thường.

Sáng chế cũng đề xuất tổ hợp chứa NA và MD có tác dụng hiệp đồng hữu hiệu để điều trị các rối loạn liên quan đến chuyển hóa, tốt hơn nếu ở dạng bào chế đơn vị. Theo một cách khác, hai dược chất này có thể được sử dụng theo thứ tự riêng biệt đồng thời hoặc liên tiếp. Dạng bào chế chứa các dược chất này không bị giới hạn cụ thể, miễn là

thu được hiệu quả mong muốn theo sáng chế. Các dược chất này có thể được bào chế ở dạng viên nang, hỗn dịch, thể phân tán, cồn ngọt, sirô, hoặc các dạng bào chế tương tự, bất kể là được sử dụng riêng biệt hoặc trong cùng một tổ hợp.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện thấy rằng NA và MD có tác dụng hiệp đồng đối với các rối loạn liên quan đến chuyển hóa và các tác dụng có lợi khác. Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện thấy rằng MD là dược chất đầu tiên tăng cường tác dụng có lợi của NA, nghĩa là làm giảm nồng độ TG và LDL-C và làm tăng nồng độ HDL-C, tăng cường tác dụng chống kết tập tiểu cầu của NA và cải thiện các tác dụng không mong muốn của NA, cụ thể là hiện tượng đỏ bừng mặt và làm tăng nồng độ glucoza trong máu.

Do đó, tổ hợp theo sáng chế là thích hợp để điều trị rối loạn chuyển hóa lipid ở các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường. Các tác giả sáng chế cũng đã bất ngờ phát hiện thấy rằng tổ hợp theo sáng chế cải thiện hậu quả của chứng nhồi máu và đột quỵ trên mô hình thử nghiệm.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện thấy rằng NA và MD có tác dụng hiệp đồng đối với tình trạng kết tập tiểu cầu. Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện thấy rằng MD là dược chất đầu tiên tăng cường tác dụng chống kết tập tiểu cầu của NA.

Tổ hợp theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng thích hợp để sử dụng qua đường miệng (như viên nén, viên nang, hỗn dịch nước hoặc bột hoặc hạt có thể phân tán được), để sử dụng ngoài đường tiêu hóa (như dung dịch nước vô trùng để tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, hoặc tiêm bắp) hoặc thuốc đạn để sử dụng qua đường trực tràng. Tốt hơn nữa, tổ hợp theo sáng chế được bào chế ở dạng thích hợp để sử dụng qua đường miệng, như viên nén hoặc viên nang.

Tổ hợp theo sáng chế cũng chứa các dược chất riêng biệt bao gồm dược chất thứ nhất là NA hoặc muối dược dụng của nó và tá dược hoặc chất mang dược dụng, và dược chất thứ hai là MD hoặc muối dược dụng của nó và tá dược hoặc chất mang dược dụng. Phương pháp kết hợp các dược chất như vậy tạo ra tổ hợp theo sáng chế để sử dụng đồng thời hoặc lần lượt. Lợi ích của phương pháp kết hợp này là ở chỗ bác sỹ điều trị có thể điều chỉnh tỷ lệ của các dược chất đối với mỗi bệnh nhân. Tổ hợp theo sáng chế cũng có thể còn chứa chế phẩm giải phóng duy trì và giải phóng kéo dài chứa NA, cũng như muối dược dụng của NA (natri, kali hoặc magie) và MD và muối của nó.

Tổ hợp theo sáng chế cũng có thể chứa các dược chất khác có hoạt tính đã biết đối với các rối loạn liên quan đến chuyển hóa, tức là statin, cụ thể là simvastatin.

Tổ hợp theo sáng chế cũng có thể chứa các dược chất khác có hoạt tính đã biết đối với các rối loạn liên quan đến chuyển hóa, tức là các chất ức chế tình trạng kết tập tiểu cầu, cụ thể là clopidogrel hoặc dipyridamol.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được nêu chỉ để mục đích minh họa mà không giới hạn sáng chế.

Thử nghiệm

Hoạt tính dược lý của các dược chất thử nghiệm được nghiên cứu theo các phương pháp tiêu chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực này. Các chuột thử nghiệm được nhốt làm 6 chuột mỗi nhóm trong các lồng thích hợp trong phòng điều hòa ở nhiệt độ $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối bằng $60\pm 5\%$ và chu trình chiếu sáng là 12 giờ chiếu sáng và 12 giờ trong bóng tối được cho sử dụng thức ăn và nước uống đầy đủ. Toàn bộ các thử nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của European Community Council ngày 24 tháng 11 năm 1986 (86/609/EEC) về chăm sóc động vật thử nghiệm. Toàn bộ mọi nỗ lực được thực hiện để làm giảm tình trạng đau đớn của động vật và số lượng các chuột thử nghiệm được sử dụng.

Hóa chất

Cholesterol (Acros Organics), meldonium (Grindex), thức ăn dinh dưỡng dùng cho động vật (R 70 Lactamin), bơ (có bán trên thị trường), Na cholat (Acros Organics), NA (Acros Organics), Laropiprant (MK 0524, Cayman Chemicals). Toàn bộ các hóa chất đều có bán trên thị trường.

Ví dụ 1

Đánh giá hoạt tính chống hội chứng xơ vữa động mạch

Phương pháp

Mô hình chuột nhắt C57BL/6J dễ bị mắc hội chứng xơ vữa động mạch do di truyền, được đề xuất trong tài liệu sau được sử dụng (Smith J D, Breslow JL, *J Intern Med* 1997; 242: 99-109). Nhóm đối chứng được cho sử dụng thức ăn dinh dưỡng tiêu

chuẩn dùng cho động vật thử nghiệm. Mô hình hội chứng xơ vữa động mạch thử nghiệm được gây ra bằng cách bổ sung vào thức ăn dinh dưỡng tiêu chuẩn 1,25% cholesterol, 15% bơ từ sữa và 0,5% Na cholat (Nishina P et al, *J Lipid Res* 1993; 34: 1413-1422). Các nhóm thử nghiệm được sử dụng các dược chất thử nghiệm ở dạng riêng biệt và kết hợp, ở các liều lượng được thiết lập để có hoạt tính trong các thử nghiệm ở quy mô nhỏ. Ở tuần 22, mức thay đổi về hội chứng xơ vữa động mạch được đánh giá về mặt hình thái, hoá sinh và mô học theo các phương pháp tiêu chuẩn (Paigen B et al, *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-240). Tổng nồng độ C, HDL-C, LDL-C và TG trong huyết thanh được xác định bằng các kit định lượng có bán trên thị trường. Tỷ lệ LDL-C/HDL-C được sử dụng làm tiêu chuẩn đánh giá nguy cơ tim mạch (Fernandez ML, Webb D, *J Am Coll Nutr*, 2008; 27 (1): 1-5).

Chỉ số so sánh hội chứng xơ vữa động mạch (phản ánh hội chứng xơ vữa động mạch vành và phân biệt với hội chứng xơ vữa động mạch ngoại biên) được tính toán như sau: Chỉ số = LDL-C/HDL-C.

Hệ số hội chứng xơ vữa động mạch (phản ánh hội chứng xơ vữa động mạch vành) được tính toán như sau: Hệ số = Tổng nồng độ C/HDL-C.

Thống kê

Dữ liệu được thể hiện dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn của từ 7 đến 10 chuột riêng biệt/một lần đo. Mức độ khác biệt giữa các nhóm thử nghiệm được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều với phép so sánh lặp lại (phép kiểm định Tukey's). $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Thử nghiệm thứ nhất được thực hiện để đánh giá hoạt tính của dược chất trong tổ hợp ở các tỷ lệ và liều lượng khác nhau. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1 cho thấy sau 22 tuần, các chuột thuộc nhóm đối chứng C được cho sử dụng thực phẩm dinh dưỡng giàu lipit và C có sự thay đổi hội chứng xơ vữa động mạch chủ, đặc biệt là ở vòm động mạch chủ. NA và MD, khi được sử dụng riêng biệt, có hoạt tính làm giảm diện tích tổn thương. Bất ngờ là, tổ hợp chứa NA và MD có hoạt tính bảo vệ mạnh hơn đáng kể và có ý nghĩa thống kê đối với tình trạng tổn thương do hội chứng xơ vữa động mạch so với khi mỗi dược chất được sử dụng riêng biệt, tức là tổ hợp này có tác dụng hiệp đồng.

Bảng 1

Hoạt tính của NA và MD đến tình trạng tổn thương do hội chứng xơ vữa động mạch chủ; n = 7-10; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Diện tích tổn thương, mkm ² , vòm động mạch chủ	Diện tích tổn thương, % diện tích động mạch chủ
Nhóm đối chứng	44 $\pm$ 25,8**	0,02 $\pm$ 0,01**
Nhóm đối chứng C	6076 $\pm$ 1282	5,44 $\pm$ 1,12
NA 50mg/kg	5867 $\pm$ 975	5,21 $\pm$ 1,07
NA 200mg/kg	4153 $\pm$ 742	3,39 $\pm$ 0,69
MD 50mg/kg	4741 $\pm$ 786	3,87 $\pm$ 0,64
MD 150mg/kg	3801 $\pm$ 573	3,30 $\pm$ 0,49
MD 200mg/kg	3098 $\pm$ 547	2,74 $\pm$ 0,47*
NA50+MD50	3106 $\pm$ 368 ^{\$}	2,58 $\pm$ 0,31* ^{\$}
NA50+MD150	2231 $\pm$ 390* ^{\$} &	1,93 $\pm$ 0,40* ^{\$} &
NA200+MD200	1602 $\pm$ 404* ^{\$} &	1,29 $\pm$ 0,38* ^{\$} &
NA50+MD50 = NA 50mg/kg + MD 50mg/kg NA50+MD150 = NA 50mg/kg + MD 150mg/kg NA200+MD200 = NA 200mg/kg + MD 200mg/kg *P<0,05 so với nhóm đối chứng C **P<0,005 so với nhóm đối chứng C \$P<0,05 so với NA ở cùng liều lượng &P<0,05 so với MD ở cùng liều lượng		

Kết quả được thể hiện trong Bảng 2 cho thấy tổ hợp chứa NA và MD có hoạt tính làm giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ LDL-C và TG và làm tăng nồng độ HDL-C. Ở tổ hợp NA50+MD150, trong đó NA được sử dụng ở liều không có hoạt tính đáng kể đến nồng độ lipid, tác dụng thu được cao hơn rất nhiều so với tác dụng khi mỗi được chất được sử dụng riêng biệt. Chỉ số so sánh hội chứng xơ vữa động mạch và tỷ lệ tổng nồng độ C/HDL-C, cho thấy tác dụng hiệp đồng của NA và MD.

Bảng 2

Hoạt tính của các được chất thử nghiệm lên nồng độ lipid trong huyết thanh; n = 7-10; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Tổng nồng độ C mg/dL	HDL-C mg/dL	LDL-C mg/dL	Chỉ số so sánh, LDL-C/HDL-C	Tổng nồng độ C/HDL-C	TG mg/dL
Nhóm đối chứng	66,5 $\pm$ 4,5 [#]	57 $\pm$ 3,4	9,7 $\pm$ 2,2 [#]	0,17 $\pm$ 0,04 [#]	1,17 $\pm$ 0,04 [#]	22,1 $\pm$ 2,19**
Nhóm đối chứng C	161 $\pm$ 10,4	50 $\pm$ 5,0	110 $\pm$ 9,9	2,22 $\pm$ 0,25	3,23 $\pm$ 0,25	48,8 $\pm$ 4,93
NA 50mg/kg	156 $\pm$ 9,4	56 $\pm$ 5,2	100 $\pm$ 6,9	1,78 $\pm$ 0,19	2,77 $\pm$ 0,18	37,8 $\pm$ 4,56
NA 200mg/kg	153 $\pm$ 11,1	59 $\pm$ 4,7	93 $\pm$ 8,3	1,63 $\pm$ 0,15*	2,60 $\pm$ 0,2*	31,7 $\pm$ 4,21**
MD 50mg/kg	157 $\pm$ 9,5	54 $\pm$ 5,0	102 $\pm$ 7,5	1,97 $\pm$ 0,20	2,94 $\pm$ 0,2	44,3 $\pm$ 4,84
MD 150mg/kg	153 $\pm$ 11,8	59 $\pm$ 5,0	94 $\pm$ 9,1	1,65 $\pm$ 0,18*	2,63 $\pm$ 0,18*	42,9 $\pm$ 4,62
MD 200mg/kg	151 $\pm$ 11,2	56 $\pm$ 3,9	95 $\pm$ 10,0	1,72 $\pm$ 0,20	2,70 $\pm$ 0,2	42,2 $\pm$ 3,35

NA50+MD50	156±10,2	58±5,5	97±7,9	1,71±0,23	2,72±0,23	40,1±3,75
NA50+MD150	148±8,9	65±5,7	83±4,4* ^{\$}	1,31±0,09* ^{\$&}	2,30±0,08* ^{\$&}	36,1±2,23*
NA200+MD200	152±7,1	67±5,2*	85±5,1*	1,29±0,11* ^{\$&}	2,31±0,12* ^{\$&}	33,6±2,45* ^{&}
NA50+MD50 = NA 50mg/kg + MD 50mg/kg NA50+MD150 = NA 50mg/kg + MD 150mg/kg NA200+MD200 = NA 200mg/kg + MD 200mg/kg *P<0,05 so với nhóm đối chứng C **P<0,005 so với nhóm đối chứng C #P<0,0005 so với nhóm đối chứng C \$P<0,05 so với NA ở cùng liều lượng &P<0,05 so với MD ở cùng liều lượng						

Trong thử nghiệm khác, hoạt tính chống hội chứng xơ vữa động mạch của tổ hợp theo sáng chế được đánh giá cụ thể hơn, và được chất chống hội chứng tăng lipid máu đã biết (SI) được bổ sung vào tổ hợp này. NA và MD, khi được sử dụng riêng biệt, có hoạt tính làm giảm diện tích tổn thương (Bảng 3). Bất ngờ là, tổ hợp chứa NA+MD gây ra tác dụng bảo vệ cao hơn đáng kể và có ý nghĩa thống kê đối với sự tổn thương do hội chứng xơ vữa động mạch so với mỗi chất riêng biệt. Việc bổ sung tổ hợp theo sáng chế vào SI còn làm tăng hơn nữa hoạt tính bảo vệ đối với sự tổn thương do hội chứng xơ vữa động mạch gây ra.

Bảng 3

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm đến tình trạng tổn thương do hội chứng xơ vữa động mạch chủ; n = 7-9; trị số trung bình ± sai số chuẩn

Nhóm	Diện tích tổn thương, mkm ² , vòm động mạch chủ	Diện tích tổn thương, % diện tích động mạch chủ
Nhóm đối chứng	29,4±14,8**	0,01±0,01 [#]
Nhóm đối chứng C	6416±860	5,97±0,89
NA 50mg/kg	5001±726	4,52±0,64
MD 150mg/kg	4189±628	3,58±0,67*
SI 10mg/kg	2819±447**	2,67±0,36**
NA50+MD150	2413±442* ^{&\$}	2,28±0,40* ^{\$}
NA50+MD50+SI10	2263±314* ^{\$&}	2,19±0,30* ^{\$&}
NA50+MD150 = NA 50mg/kg + MD 150mg/kg NA50+MD50+SI10 = NA 50mg/kg + MD 50mg/kg + SI 10mg/kg *P<0,05 so với nhóm đối chứng C **P<0,005 so với nhóm đối chứng C #P<0,0005 so với nhóm đối chứng C \$P<0,05 so với NA &P<0,05 so với MD		

Trong cùng thử nghiệm, tổng nồng độ C, HDL-C, LDL-C và TG trong huyết thanh được xác định. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4 cho thấy NA và MD, khi được sử dụng riêng biệt chỉ cải thiện một chút tỷ lệ các phân đoạn cholesterol và chỉ số so sánh hội chứng xơ vữa động mạch không có ý nghĩa thống kê. Bất ngờ là, tổ hợp NA và MD

cải thiện đáng kể tỷ lệ các phân đoạn cholesterol và mức có ý nghĩa thống kê của chỉ số so sánh hội chứng xơ vữa động mạch và tỷ lệ tổng nồng độ C/HDL-C là giảm. Tổ hợp này cũng phòng ngừa gia tăng LDL-C và TG trong huyết thanh. Do đó, tổ hợp theo sáng chế có hoạt tính bảo vệ đối với sự thay đổi trong chuyển hóa lipid cao hơn đáng kể về so với hợp phần của nó khi được sử dụng riêng biệt. Tổ hợp ba thành phần chứa SI cũng vẫn có tác dụng bảo vệ rõ rệt.

Bảng 4

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm lên nồng độ lipid trong huyết thanh; n = 7-9; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Tổng nồng độ C mg/dL	HDL-C mg/dL	LDL-C mg/dL	Chỉ số so sánh, LDL-C/ HDL-C	Tỷ lệ tổng nồng độ C/ HDL-C	TG mg/dL
Nhóm đối chứng	66,8 $\pm$ 3,7 [#]	58 $\pm$ 3,4	8,7 $\pm$ 1,94 [#]	0,15 $\pm$ 0,03 [#]	1,15 $\pm$ 0,03 [#]	22,8 $\pm$ 1,82 [#]
Nhóm đối chứng C	167 $\pm$ 8,64	54 $\pm$ 4,7	113 $\pm$ 8,4	2,24 $\pm$ 0,25	3,23 $\pm$ 0,24	52,2 $\pm$ 3,98
NA 50mg/kg	158 $\pm$ 9,9	57 $\pm$ 5,2	100 $\pm$ 7,6	1,76 $\pm$ 0,21	2,75 $\pm$ 0,19	41,0 $\pm$ 4,62
MD 150mg/kg	159 $\pm$ 7,8	62 $\pm$ 4,1	95 $\pm$ 8,2	1,58 $\pm$ 0,21	2,60 $\pm$ 0,21	44,2 $\pm$ 4,05
SI 10mg/kg	132 $\pm$ 9,9*	55 $\pm$ 5,0	77 $\pm$ 6,7*	1,4 $\pm$ 0,08*	2,4 $\pm$ 0,08*	47,7 $\pm$ 3,73
NA50+MD150	139 $\pm$ 7,5*	60 $\pm$ 6,1	79 $\pm$ 6,2*	1,32 $\pm$ 0,20* ^{\$}	2,30 $\pm$ 0,20*	39,5 $\pm$ 3,96*
NA50+MD50+SI10	141 $\pm$ 7,3*	61 $\pm$ 5,5	80 $\pm$ 5,7*	1,31 $\pm$ 0,16* ^{\$}	2,30 $\pm$ 0,16* ^{\$}	42,2 $\pm$ 3,65
NA50+MD150 = NA 50mg/kg + MD 150mg/kg NA50+MD50+SI10 = NA 50mg/kg + MD 50mg/kg + SI 10mg/kg *P<0,05 so với nhóm đối chứng C #P<0,0005 so với nhóm đối chứng C \$P<0,05 so với NA						

Trong thử nghiệm khác nữa, tổ hợp NAMg và NA+SI được đánh giá (Bảng 5). NAMg được so sánh với NA ở các gà trống choai (Burstein J, Telkka A, *Acta Pathol Microbiol Scand* 1962;56:261-265). Tổ hợp chứa NA (50mg/kg) và MD (150mg/kg) có tác dụng có lợi rõ rệt nhất đối với động mạch chủ, cao hơn NA và NAMg, cũng như vượt trội hơn tác dụng của tổ hợp chứa SI và NA, được sử dụng với tỷ lệ dựa trên cơ sở thử nghiệm lâm sàng (Pandian A et al, *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(5):1001-1009).

Bảng 5

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm đến tình trạng tổn thương do hội chứng xơ vữa động mạch chủ; n = 7-9; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Diện tích tổn thương, mkm2, vòm động mạch chủ	Diện tích tổn thương, % diện tích động mạch chủ
Nhóm đối chứng	35 $\pm$ 19,8***	0,02 $\pm$ 0,01***
nhóm đối chứng C	6216 $\pm$ 839	5,75 $\pm$ 0,82
NA 50mg/kg	4978 $\pm$ 688	4,23 $\pm$ 0,67

NAMg 60mg/kg	4053±518*	3,39±0,44*
MD 150mg/kg	3904±489*	3,47±0,45*
NA50+MD150	2105±215**\$@#&	1,95±0,30**\$@#&
NA50+SI2	3068±297*	2,67±0,48*
NA50+MD150 = NA 50mg/kg + MD 150mg/kg NA50+SI2 = NA 50mg/kg +SI 2mg/kg *P<0,05 so với nhóm đối chứng C **P<0,005 so với nhóm đối chứng C ***P<0,0005 so với nhóm đối chứng C \$P<0,05 so với NA @P<0,05 so với NAMg &P<0,05 so với MD #P<0,05 so với NA50+SI2		

Tương tự các dữ liệu hình thái học các thử nghiệm hoá sinh cho thấy rằng tổ hợp chứa NA+MD có hoạt tính điều hòa bình thường nồng độ lipit cao hơn đáng kể so với NA hoặc NAMg (Bảng 6).

Bảng 6

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm lên nồng độ lipit trong huyết thanh; n = 7-9; trị số trung bình ± sai số chuẩn

Nhóm	Tổng nồng độ C mg/dL	HDL-C mg/dL	LDL-C mg/dL	Chỉ số so sánh, LDL-C/HDL-C	Tổng nồng độ C/HDL-C	TG mg/dL
Nhóm đối chứng	67±3,9***	56±3,0	7,8±1,83***	0,14±0,03***	1,19±0,04***	26,5±2,13**
Nhóm đối chứng C	164±9,2	50±3,8	107±7,4	2,21±0,18	3,33±0,19	54,8±5,56
NA 50mg/kg	158±8,7	57±4,7	96±6,2	1,74±0,15	2,82±0,16*	40,8±3,46*
NAMg 60mg/kg	151±9,6	55±4,0	91±7,7	1,67±0,12*	2,73±0,14*	41,4±1,06*
MD 150mg/kg	154±8,1	55±3,3	95±5,5	1,75±0,14	2,74±0,11*	43,2±1,25
NA50+MD 150	148±7,4	63±3,9*	81±4,1*	1,31±0,11**\$@&	2,35±0,10**\$@&	37,5±0,97*@\$&
NA50+SI2	144±4,7	58±4,4	82±4,8*	1,49±0,12**	2,52±0,12**	42,4±1,74
NA50+MD150 = NA 50mg/kg + MD 150mg/kg NA50+SI2 = NA 50mg/kg +SI 2mg/kg *P<0,05 so với nhóm đối chứng C **P<0,005 so với nhóm đối chứng C ***P<0,0005 so với nhóm đối chứng C \$P<0,05 so với NA @P<0,05 so với NAMg &P<0,05 so với MD						

Tổ hợp chứa NA+MD có hoạt tính làm giảm tổng nồng độ C và LDL-C tương tự như tổ hợp chứa NA+SI, nhưng tổ hợp chứa NA+MD có ưu điểm hơn tổ hợp này ở chỗ có tác dụng có lợi cao hơn đối với nồng độ HDL-C và TG, cũng như có tác dụng rõ rệt hơn đối với chỉ số so sánh hội chứng xơ vữa động mạch và tỷ lệ tổng nồng độ C/HDL-C.

Thử nghiệm này cho thấy rằng tổ hợp NA và MD có ảnh hưởng có lợi cao hơn đáng kể lên mô hình hội chứng xơ vữa động mạch thử nghiệm so với NA hoặc NAMg và cao hơn tổ hợp được sử dụng trong lâm sàng gồm NA và SI.

Ví dụ 2

Hoạt tính của NA và MD khi dùng riêng biệt và kết hợp lên nồng độ lipit ở mô hình chuột cống hội chứng tăng lipit máu

Phương pháp

Chứng hội chứng tăng lipit máu/chứng tăng cholesterol máu mạn tính thử nghiệm được gây ra bởi TR bằng cách sử dụng phương pháp được Levine và Saltzman mô tả (Levine S, Saltzman A, *J Pharmacol Toxicol Meth* 2007; 55: 224-226). Các chuột thử nghiệm được sử dụng 250mg/kg dung dịch TR qua tĩnh mạch đuôi ba lần mỗi tuần trong 3 tuần. Các dung dịch chứa các dược chất thử nghiệm để sử dụng cho các nhóm thử nghiệm hoặc nước để sử dụng cho nhóm đối chứng được đưa vào qua đường miệng mỗi ngày một lần một giờ trước khi tiêm dung dịch TR hoặc lấy mẫu máu.

Chuột cống đực Wistar cân nặng 220-240g được chia thành 8 nhóm sau đây (nhóm, n chuột cống):

1. Nhóm đối chứng	10
2. TR (TR 250mg/kg)	14
3. NA (TR 250mg/kg + NA 50mg/kg/d)	14
4. MD (TR 250mg/kg + MD 150mg/kg/d)	14
5. NA+MD (Triton 250mg/kg + NA 50+MD 150mg/kg/d)	14
6. SI10 (TR 250mg/kg + SI 10mg/kg/d)	12
7. NA+SI2 (TR 250mg/kg + SI 2 + NA 50mg/kg/d)	12
8. NA+SI2+MD (TR 250mg/kg + SI 2 + NA 50 + MD 150mg/kg/d)	12

Máu để phân tích hóa sinh được lấy sau 1, 2 và 3 tuần (vào ngày tiếp theo sau khi tiêm TR) bằng cách hút thẳng từ tim trong điều kiện gây mê bằng ete. Huyết thanh được tách riêng bằng cách ly tâm và phân tích nồng độ C tổng số, HDL-C, LDL-C và TG bằng các kit định lượng có bán trên thị trường.

Thống kê

Dữ liệu thu được được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel và kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trị số trung bình này (SEM). Kết quả trung bình của các nhóm khác nhau được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều và phép kiểm định t Student. Mức độ khác biệt của kết quả được xem là có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$.

Kết quả

Việc tiêm TR lặp lại đã tạo ra chứng tăng cholesterol máu và hội chứng tăng lipit máu rõ rệt và ổn định, được đặc trưng bởi mức tăng đáng kể nồng độ C tổng số, LDL-C và TG so với nhóm đối chứng. Việc xử lý bằng NA, tốt hơn nếu ở tuần đầu tiên, làm giảm chế sự gia tăng nồng độ C tổng số, LDL-C và TG, nhưng làm tăng đáng kể nồng độ HDL-C chỉ ở tuần thứ 2 và 3. MD có hoạt tính kém hơn một chút đối với việc làm giảm nồng độ C tổng số, LDL-C và làm tăng nồng độ HDL-C, nhưng nó không phòng ngừa gia tăng nồng độ TG. Đáng ngạc nhiên là việc sử dụng kết hợp NA+MD hữu hiệu hơn từng hợp phần riêng biệt để làm giảm nồng độ LDL-C và TG và làm gia tăng hơn nữa nồng độ HDL-C. Hơn nữa, việc sử dụng NA+MD lâu hơn (2 hoặc 3 tuần trong thử nghiệm của tác giả sáng chế) đã chứng tỏ việc làm giảm nồng độ LDL-C và TG và làm tăng HDL-C về cơ bản rõ rệt hơn nhiều so với sử dụng NA+SI (xem phần dưới đây). Do đó, tổ hợp NA+MD được mong đợi là hữu hiệu trong lâm sàng để phòng ngừa và/hoặc điều trị chứng tăng cholesterol máu và hội chứng tăng lipit máu.

Việc sử dụng SI với liều 10mg/kg làm giảm đáng kể sự gia tăng tổng nồng độ C và LDL-C do TR gây ra, nhưng chỉ ảnh hưởng một chút đến nồng độ HDL-C và TG. Việc sử dụng kết hợp SI và NA ở tỷ lệ chấp nhận được trong lâm sàng đã chứng tỏ hoạt tính bảo vệ đáng kể chống lại sự gia tăng nồng độ C tổng số, LDL-C và TG trong huyết thanh và nồng độ HDL-C gia tăng. Bất ngờ là, việc sử dụng kết hợp NA, SI và MD đã chứng tỏ tổ hợp này có tác dụng bảo vệ đối với những thay đổi do TR gây ra tốt hơn nếu tác dụng của mỗi hợp phần riêng biệt và tốt hơn đáng kể tổ hợp NA+SI trong việc làm giảm nồng độ TG và LDL-C. Nhận thấy điều đặc biệt quan trọng đối với thực hành lâm sàng là ở chỗ tổ hợp chứa NA, SI và MD làm tăng nồng độ HDL-C về cơ bản nhiều hơn khi dùng SI hoặc NA riêng biệt. Do đó, tổ hợp chứa NA+MD và NA+SI+MD được mong

đội là hữu hiệu trong lâm sàng để phòng ngừa và/hoặc điều trị chứng tăng cholesterol máu và hội chứng tăng lipid máu.

Bảng 7

Hoạt tính của NA, SI và MD khi dùng riêng biệt và kết hợp lên nồng độ lipid ở mô hình chuột cống hội chứng tăng lipid máu; n = 9-14; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Tổng nồng độ C sau 1, 2 và 3 tuần, mg/dL		
	C1	C2	C3
Nhóm đối chứng	77,6 $\pm$ 4,9 ^{***}	75,1 $\pm$ 5,1 ^{***}	72,7 $\pm$ 2,5 ^{***}
TR	487,6 $\pm$ 25,4	501 $\pm$ 16,7	513 $\pm$ 41,1
NA	345 $\pm$ 15,7 ^{***}	401,1 $\pm$ 25,1 ^{**}	405,5 $\pm$ 25,9 [*]
MD	412 $\pm$ 24,7	414,7 $\pm$ 23,2 [*]	401 $\pm$ 22,8 [*]
NA+MD	340,5 $\pm$ 19,5 ^{***&}	360 $\pm$ 21,7 ^{***}	346,4 $\pm$ 32,8 ^{**}
SI	314 $\pm$ 29,6 ^{***}	329,5 $\pm$ 36,2 ^{**}	335,7 $\pm$ 31,6 ^{**}
NA+SI	345,9 $\pm$ 27,5 ^{**}	388,7 $\pm$ 32,3 [*]	384,5 $\pm$ 33,9 [*]
NA+SI+MD	333,5 $\pm$ 26,2 ^{***&}	376,4 $\pm$ 23,1 ^{***}	333,4 $\pm$ 19,3 ^{***&\$}
Nhóm	HDL-C sau 1, 2 và 3 tuần, mg/dL		
	HDL-C1	HDL-C2	HDL-C3
Nhóm đối chứng	54,6 $\pm$ 1,9 [*]	54,1 $\pm$ 1,3	53,7 $\pm$ 1,0 [*]
TR	76,3 $\pm$ 6,9	76,2 $\pm$ 11,4	77 $\pm$ 10,2
NA	111,3 $\pm$ 9,1 [*]	144,7 $\pm$ 13,5 ^{**}	127,3 $\pm$ 10,9 ^{**}
MD	107,3 $\pm$ 8,4 [*]	118,6 $\pm$ 10,3 [*]	115,9 $\pm$ 9,6 [*]
NA+MD	126,2 $\pm$ 11,1 ^{**}	150,4 $\pm$ 11,2 ^{***&#}	136,9 $\pm$ 18,1 [*]
SI	84,5 $\pm$ 12,5	98,5 $\pm$ 20,5	94,4 $\pm$ 10,2
NA+SI	99 $\pm$ 12,9	116,2 $\pm$ 11,7 [*]	114,9 $\pm$ 11,9 [*]
NA+SI+MD	124,8 $\pm$ 18,2 [*]	157,3 $\pm$ 15 ^{***&#}	143,2 $\pm$ 9,7 ^{***}
Nhóm	LDL-C sau 1, 2 và 3 tuần, mg/dL		
	LDL-C1	LDL-C2	LDL-C3
Nhóm đối chứng	18,7 $\pm$ 3,8 ^{***}	19,7 $\pm$ 4,4 ^{***}	16,3 $\pm$ 2,0 ^{***}
TR	388,7 $\pm$ 26,7	402,1 $\pm$ 19,2	405,1 $\pm$ 41,7
NA	216,3 $\pm$ 14,0 ^{***}	250,3 $\pm$ 20,6 ^{***}	265,1 $\pm$ 18,4 [*]
MD	290,8 $\pm$ 21 [*]	275 $\pm$ 22,3 ^{**}	270 $\pm$ 16,9 [*]
NA+MD	209,6 $\pm$ 16,7 ^{***&}	197,6 $\pm$ 15,4 ^{***&\$#}	203,3 $\pm$ 20,3 ^{***&\$#}
SI	212 $\pm$ 24,1 ^{***}	228,9 $\pm$ 20,6 ^{***}	232,7 $\pm$ 22,8 ^{**}
NA+SI	227,2 $\pm$ 26,1 ^{***}	272,5 $\pm$ 21,3 ^{**}	268 $\pm$ 23,2 [*]
NA+SI+MD	193,2 $\pm$ 16,5 ^{***&}	216,6 $\pm$ 17 ^{***&\$#}	197,1 $\pm$ 16,6 ^{***&\$#}
Nhóm	TG sau 1, 2 và 3 tuần, mg/dL		
	TG1	TG2	TG3
Nhóm đối chứng	38 $\pm$ 2,9 ^{***}	37 $\pm$ 3,2 ^{***}	38 $\pm$ 4,4 ^{***}
TR	1240 $\pm$ 80,1	1297 $\pm$ 78,3	1234 $\pm$ 114,1
NA	734 $\pm$ 81,6 ^{***}	860 $\pm$ 73,8 ^{**}	828 $\pm$ 44,7 [*]
MD	1040 $\pm$ 91	1081 $\pm$ 63,2	1010 $\pm$ 72,5
NA+MD	785 $\pm$ 62,9 ^{***&}	792 $\pm$ 73,8 ^{***&}	774 $\pm$ 39,2 ^{***&#}
SI	849 $\pm$ 96,8 [*]	879 $\pm$ 72,1 ^{**}	891 $\pm$ 129,1
NA+SI	769 $\pm$ 69,2 ^{***}	868 $\pm$ 36,1 ^{***}	879 $\pm$ 31 [*]
NA+SI+MD	734,4 $\pm$ 95,7 ^{***&}	763 $\pm$ 36 ^{***&\$#}	692 $\pm$ 45 ^{***&\$#}

*P<0,05 so với TR
 **P<0,005 so với TR
 ***P<0,0005 so với TR
 \$P<0,05 so với NA
 &P<0,05 so với MD
 #P<0,05 so với NA+SI

Ví dụ 3. Đánh giá hoạt tính bảo vệ tim

Phương pháp

Chuột cống đực Wistar được chia thành 6 nhóm (12 đến 16 chuột mỗi nhóm):

1. Nhóm đối chứng được sử dụng qua đường miệng nước muối 0,9%;
2. Nhóm NA50 được sử dụng NA qua đường miệng với liều 50mg/kg/ngày;
3. Nhóm MD50 được sử dụng MD qua đường miệng với liều 50mg/kg/ngày;
4. Nhóm NA50+MD50 được sử dụng qua đường miệng NA với liều 50mg/kg/ngày và MD với liều 50mg/kg;
5. Nhóm MD150 được sử dụng MD qua đường miệng với liều 150mg/kg/ngày;
6. Nhóm NA50+MD150 được sử dụng qua đường miệng NA với liều 50mg/kg/ngày và MD với liều 150mg/kg/ngày.

Các chuột cống thuộc các nhóm thử nghiệm được sử dụng các chất thử nghiệm dưới dạng dung dịch nước nhờ ống thông dạ dày 48, 24 và 1 giờ trước khi thử nghiệm. Các chuột thuộc nhóm đối chứng được sử dụng nước muối với cùng thể tích. Các chuột thử nghiệm được gây mê bằng cách tiêm màng bụng pentobarbital natri ở liều bằng 60mg/kg trong điều kiện thông khí cơ học được tạo ra để chặn động mạch vành trái. Chứng nhồi máu thử nghiệm được gây ra do tình trạng tắc động mạch vành kéo dài trong 45 phút với tái đồ bồng mặt 2 giờ sau đó. Dữ liệu sau đây được ghi lại: số lượng chuột cống với VT, VF, khả năng gây chết, huyết áp trung bình của động mạch, RPP đặc trưng cho trạng thái đang làm việc của cơ tim, phản ánh quá trình sản xuất ATP ở cơ tim và là chỉ số so sánh được sử dụng rộng rãi trong phân tích dữ liệu lâm sàng và thử nghiệm (Broderick TL, *Drugs R D* 2008; 9 (2): 83-91). Sau thử nghiệm, vùng thiếu máu cục bộ và hoại tử được phát hiện bằng phương pháp nhuộm ngấm bằng riphenyltetrazolium-Evans xanh da trời. Tâm thất trái được cắt ra và cân và tiêu chí hình thái được tính toán: tỷ lệ phần trăm của vùng thiếu máu cục bộ thuộc tâm thất trái, tỷ lệ phần trăm của vùng

hoại tử ở tâm thất trái và tỷ lệ giữa vùng hoại tử và vùng thiếu máu cục bộ (chỉ số hoại tử).

Thông kê

Kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn đối với mỗi nhóm. Phân tích thống kê trong các nhóm được thực hiện bằng phép kiểm định t-Student. Dữ liệu dựa trên huyết áp và nhịp tim đã ghi được tính toán từ các chuột cống thử nghiệm sống sót trong thử nghiệm thiếu máu cục bộ-tái đồ bằng mặt. Tỷ lệ mắc phải chứng loạn nhịp tim (VT và VF) và khả năng gây chết được tính toán ở toàn bộ các chuột cống thử nghiệm. Mức độ khác biệt giữa mỗi nhóm thử nghiệm được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều với phép so sánh lặp lại (phép kiểm định Tukey). $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Bệnh thiếu máu cục bộ tim có kèm theo tái đồ bằng mặt gây ra sự rối loạn nhịp tim một cách nghiêm trọng ở nhóm đối chứng với khả năng gây chết 7 trong nhóm gồm 16 chuột cống thử nghiệm. Nhóm NA không khác đáng kể so với nhóm đối chứng về sự rối loạn nhịp tim. Các nhóm MD và NA+MD có rối loạn nhịp tim gây chết thấp hơn rõ rệt (VF và VT) so với nhóm đối chứng, nhưng khả năng gây chết chỉ thấp hơn đáng kể ở các nhóm NA50+MD50 và NA50+MD150 (Bảng 8).

Bảng 8

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm lên rối loạn nhịp tim và khả năng gây chết trong quá trình tắc động mạch vành và tái đồ bằng mặt

Nhóm	n	Chứng tâm thất đập nhanh		Xơ hóa tâm thất		Khả năng gây chết	
		n	%	n	%	n	%
Nhóm đối chứng I/R	16	16	100	13	81,3	7	43,8
NA50	12	12	100	8	66,7	3	25
MD50	12	11	91,7	7	58,3	3	25
MD150	12	10	83	7	58,3	2	17
NA50+MD50	12	10	83	6	50	1*	8,3
NA50+MD150	12	9	75	5	42	0*	0
* $P < 0,05$ so với nhóm đối chứng I/R							

Áp suất động mạch và nhịp tim trung bình là tương tự nhau ở toàn bộ các nhóm, nhưng sự giảm sút RPP, quan sát được ở nhóm đối chứng, chỉ được phòng ngừa ở mức có ý nghĩa thống kê ở các nhóm NA50+MD50 và NA50+MD150 trong quá trình tái đồ

bùng mặt (Bảng 9). Điều này cho thấy tác dụng bảo vệ đáng kể chống lại chứng nhồi máu do sự suy giảm chức năng ngay sau khi điều trị sơ bộ trong khoảng thời gian ngắn (3 ngày) bằng tổ hợp theo sáng chế.

Bảng 9

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm lên tỷ lệ áp suất-sản phẩm (RPP) trong quá trình tắc động mạch vành và tái đồ bùng mặt; n = 9-12; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Ban đầu	Tắc 45 phút	Tái đồ bùng mặt 120 phút
Nhóm đối chứng I/R	44,2 $\pm$ 3,0	39,7 $\pm$ 2,3 ^{&}	34,2 $\pm$ 2,1 [#]
NA	43,1 $\pm$ 2,8	40,4 $\pm$ 2,7	36,0 $\pm$ 1,3 ^{&}
MD50	44,8 $\pm$ 1,7	41,5 $\pm$ 2,9	37,6 $\pm$ 1,9 ^{&}
MD150	44,3 $\pm$ 1,8	40,3 $\pm$ 2,5	37,9 $\pm$ 1,8
NA50+MD50	42,7 $\pm$ 3,1	40,5 $\pm$ 1,9	38,6 $\pm$ 1,8*
NA50+MD150	43,9 $\pm$ 2,7	41,2 $\pm$ 1,8	40,1 $\pm$ 1,6**
*P<0,05 so với nhóm đối chứng I/R **P<0,005 so với nhóm đối chứng I/R &P<0,05 so với ban đầu #P<0,01 so với ban đầu			

Sự giảm đáng kể về mặt thống kê vùng hoại tử tính theo tỷ lệ phần trăm so với tâm thất trái và so với vùng thiếu máu cục bộ (Bảng 10) đối với tổ hợp, chứa NA+MD ở toàn bộ các tổ hợp liều cũng được xác nhận.

Bảng 10

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm lên hình thái tim của chuột cống bị tắc động mạch vành và tái đồ bùng mặt; n = 9-12; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Tâm thất trái, mg	Vùng thiếu máu cục bộ/tâm thất trái, %	Vùng hoại tử/tâm thất trái, %	Chỉ số hoại tử, %
nhóm đối chứng I/R	872,9 $\pm$ 25,1	48,4 $\pm$ 2,4	34,4 $\pm$ 2,8	70,9 $\pm$ 3,7
NA	880,4 $\pm$ 25,2	47,0 $\pm$ 1,4	29,8 $\pm$ 2,4	63,0 $\pm$ 3,9
MD50	878,9 $\pm$ 48,1	48,4 $\pm$ 1,5	28,4 $\pm$ 3,1	58,4 $\pm$ 4,3
MD150	873,2 $\pm$ 41,8	48,1 $\pm$ 1,9	28,1 $\pm$ 1,8*	58,2 $\pm$ 2,9*
NA50+MD50	887,6 $\pm$ 22,3	46,8 $\pm$ 1,6	22,8 $\pm$ 1,9** ^{\$}	49,1 $\pm$ 2,1** ^{\$&}
NA50+MD150	867,0 $\pm$ 31,5	47,7 $\pm$ 2,1	21,5 $\pm$ 1,3** ^{\$&}	45,6 $\pm$ 2,6 ^{#&}
*P<0,05 so với nhóm đối chứng I/R **P<0,005 so với nhóm đối chứng I/R #P<0,0005 so với nhóm đối chứng I/R &P<0,05 so với MD ở cùng liều lượng \$P<0,05 so với NA Chỉ số hoại tử = Vùng hoại tử/vùng thiếu máu cục bộ x 100				

Do đó, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện thấy rằng tổ hợp gồm NA và MD có tác dụng hiệp đồng có hoạt tính bảo vệ ở mức cao chống lại sự phát triển chứng nhồi

máu cơ tim. Tổ hợp NA+MD bảo toàn đáng kể chức năng của cơ tim, làm gia tăng tỷ lệ sống sót của các chuột cống thử nghiệm (Bảng 8, 9) và bảo vệ cơ tim khỏi bị hoại tử do bệnh thiếu máu cục bộ và tái đỏ bừng mặt gây ra tốt hơn nhiều so với trường hợp chỉ sử dụng NA và MD riêng biệt (Bảng 10).

Ví dụ 4

Đánh giá tác dụng chống giảm oxy máu và chống thiếu máu cục bộ lên não

Các thử nghiệm tiếp theo được thực hiện để xác định tác dụng của tổ hợp NA và MD trong mô hình thiếu máu cục bộ CNS, giảm oxy máu và đột quỵ so với tác dụng của mỗi hợp phần riêng biệt.

4.1. Mô hình giảm oxy máu tuần hoàn não ở chuột nhắt

Phương pháp

Chúng giảm oxy máu tuần hoàn thử nghiệm được gây ra bằng cách tiêm $MgCl_2$ (Berga P et al, *Arzneimittelforschung* 1986;36(9):1314-1320) ($MgCl_2$ 2%, liều lượng 200mg/kg) vào tĩnh mạch đuôi của chuột nhắt đực ICR trong 3 giây. Các chuột thử nghiệm được sử dụng được chất thử nghiệm dưới dạng liều đơn hoặc cùng một liều một lần mỗi ngày trong 7 ngày. Các được chất thử nghiệm được đưa vào qua ống thông dạ dày. Các chuột thử nghiệm được chia ngẫu nhiên thành 7 nhóm (mỗi nhóm từ 6 đến 10 chuột nhắt):

1. Nhóm đối chứng được sử dụng nước với liều 0,01mL/g.
2. Nhóm PI500 (nhóm đối chứng có hoạt tính) được sử dụng piracetam với liều 500mg/kg.
3. Nhóm NA50 được sử dụng NA với liều 50mg/kg.
4. Nhóm MD50 được sử dụng MD với liều 50mg/kg.
5. Nhóm MD150 được sử dụng MD với liều 150mg/kg.
6. Nhóm NA50+MD50 được sử dụng NA với liều 50mg/kg và MD với liều 50mg/kg.
7. Nhóm NA50+MD150 được sử dụng NA với liều 50mg/kg và MD với liều 150mg/kg.

Liều được chất thử nghiệm cuối cùng được sử dụng 1 giờ sau thử nghiệm. Khoảng thời gian tính từ lúc tiêm $MgCl_2$ xong và thời điểm ngừng thở được gọi là thời gian sống sót.

Thông kê

Kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn đối với mỗi nhóm. Phân tích thống kê trong các nhóm được thực hiện bằng phép kiểm định t-Student. Mức độ khác biệt giữa mỗi nhóm thử nghiệm được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều với phép so sánh lặp lại (phép kiểm định Tukey). $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Kết quả được thể hiện trong Bảng 11. Khi được đưa vào theo cách lặp lại, tác dụng bảo vệ chống giảm oxy máu được thấy ở cả được chất được sử dụng trong lâm sàng PI và MD (Bảng 11). Bất ngờ là, tổ hợp NA+MD có tác dụng bảo vệ đáng kể ngay sau một lần dùng, đặc biệt là ở liều lượng NA50 + MD150, trong đó tác dụng này cao hơn tác dụng của mỗi chất riêng biệt. Việc dùng lặp lại tổ hợp này cũng có tác dụng rõ rệt hơn. Kết quả thu được trong thử nghiệm này cho thấy có thể sử dụng tổ hợp NA+MD để điều trị các tình trạng giảm oxy máu trong lâm sàng.

Bảng 11

Hoạt tính của các được chất thử nghiệm ở mô hình giảm oxy máu tuần hoàn não chuột nhắt; $n = 6-10$; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm thử nghiệm	Thời gian sống sót, giây	
	Liều đơn	7 ngày điều trị
Nhóm đối chứng	25,75 $\pm$ 1,01	25,4 $\pm$ 1,07
PI500	28,5 $\pm$ 1,04	29,8 $\pm$ 1,32*
NA50	27,3 $\pm$ 0,68	27,8 $\pm$ 0,86
MD50	26,5 $\pm$ 1,07	28,9 $\pm$ 1,20*
MD150	27,0 $\pm$ 0,93	29,8 $\pm$ 1,19*
NA50+MD50	30,8 $\pm$ 1,44* ^{\$}	32,6 $\pm$ 1,18 ^{#&\$}
NA50+MD150	31,1 $\pm$ 1,33* ^{\$&}	34,4 $\pm$ 1,50 ^{@\$D}
* $P < 0,05$ so với nhóm đối chứng # $P < 0,005$ so với nhóm đối chứng @ $P < 0,0005$ so với nhóm đối chứng \$ $P < 0,05$ so với MD ở cùng liều lượng & $P < 0,05$ so với NA D $P < 0,005$ so với NA		

4.2. Mô hình tắc động mạch não giữa

Phương pháp

Chuột nhắt đực ICR có trọng lượng nằm trong khoảng từ 21 đến 25g được sử dụng. Động mạch não giữa (Middle cerebral artery - MCA) được gây tắc bằng kỹ thuật sợi gian miệng ống theo phương pháp đã biết (Longa EZ et al, *Stroke* 1989; 20: 84-91) được làm thích nghi đối với chuột nhắt bởi Zhang Q et al (*Behavioural Brain Research* 2006; 169: 66-74). Quy trình phòng ngừa (một lần mỗi ngày trong 7 ngày, đối với mô hình tắc MCA mãn tính) và quy trình điều trị (bắt đầu điều trị 1 giờ sau khi tắc MCA cục bộ) được sử dụng.

Các chuột nhắt đực ICR ở nhóm đối chứng chỉ được sử dụng nước muối. Thử nghiệm này là mô hình tốt của trạng thái chấn thương não thực tế và đột quỵ lâm sàng, trong đó tắc động mạch não giữa thường xuyên xảy ra. Ngoài ra, thử nghiệm này được tiếp tục theo 2 quy trình. Ở quy trình thứ nhất, tình trạng tắc này là thường trực. Ở quy trình thứ hai, tình trạng tắc bởi sợi gian miệng ống là tạm thời và sợi được loại bỏ sau 2 giờ và được đưa vào tái đồ bồng mắt. Trạng thái thần kinh của toàn bộ các chuột thử nghiệm được đánh giá sau 24 giờ gây tắc. Trạng thái này được đánh giá bởi một thang điểm, trong đó các điểm 0 được gán cho các chuột thử nghiệm không mắc bệnh, các điểm 4 được gán cho các chuột thử nghiệm không có khả năng chuyển động tự phát (Longa EZ et al, *Stroke* 1989; 20: 84-91). Sau khi đánh giá khiếm khuyết về mặt thần kinh, các chuột thử nghiệm được sử dụng natri pentobarbital quá liều, não được phân lập và cắt lát thành 6 lớp có độ dày khoảng 1,5mm. Các lát cắt được nhuộm bằng dung dịch triphenyltetrazolium natri 2% ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút và được chụp ảnh. Do thích hợp nhất để tính toán sự tổn thương do thiếu máu cục bộ ở não vì hoàn toàn được cung cấp máu từ động mạch não giữa, lát cắt thứ 3 từ mặt trước trên mức giao thoa dây thần kinh thị giác được lựa chọn.

Thống kê

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn của từ 7 đến 9 chuột riêng biệt. Mức độ khác biệt giữa mỗi nhóm thử nghiệm được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều với phép so sánh lặp lại (phép kiểm định Tukey). Mức độ khác biệt về điểm đánh giá trạng thái thần kinh giữa các nhóm được phân tích bằng phép kiểm định t-Student. $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Sau 24 giờ gây tắc, cả 8 chuột ở nhóm đối chứng đều có rối loạn thần kinh với điểm trung bình là 2,63 (Bảng 12).

Bảng 12

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm lên trạng thái thần kinh của các chuột bị tắc mãn tính; n = 7-9; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm thử nghiệm	Trạng thái thần kinh, điểm
Nhóm đối chứng	2,63 $\pm$ 0,38
Sham	0,14 $\pm$ 0,14 [#]
NA50 x 7	2,25 $\pm$ 0,25
MD150 x 7	1,63 $\pm$ 0,29
NA50+MD150 x 7	1,38 $\pm$ 0,26 ^{*&}
[*] P<0,05 so với nhóm đối chứng [#] P<0,0005 so với nhóm đối chứng ^{&} P<0,05 so với NA	

Ở nhóm sham chỉ có 1 chuột nhất thử nghiệm bị rối loạn nhẹ. Việc sử dụng lặp lại MD trong 7 ngày giúp phòng ngừa một phần khỏi sự hư tổn trạng thái thần kinh, do tình trạng tắc do MCA gây ra. Bất ngờ là, tổ hợp NA+MD có tác dụng bảo vệ đáng kể đối với các rối loạn thần kinh, tốt hơn tác dụng của NA (Bảng 12).

Tình trạng tắc động mạch não giữa gây ra tổn thương do thiếu máu não cục bộ, tổn thương này chiếm đến 22,2% mô não ở mức giao thoa dây thần kinh thị giác đối với nhóm đối chứng (Bảng 13). Tổ hợp NA+MD được sử dụng trong 7 ngày có tác dụng bảo vệ đáng kể chống lại sự tổn thương mô não, tác dụng này cũng tốt hơn tác dụng của một mình NA.

Bảng 13

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm trong 7 ngày lên diện tích vùng tổn thương do thiếu máu cục bộ - nhồi máu não của các chuột bị tắc mãn tính; n = 7-9; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm đối chứng	Vùng tổn thương do thiếu máu cục bộ, %
Nhóm đối chứng	22,2 $\pm$ 2,21
NA	19,0 $\pm$ 1,75
MD	16,9 $\pm$ 1,82
NA50+MD150	12,9 $\pm$ 1,54 ^{*&}
[*] P<0,005 so với nhóm đối chứng ^{&} P<0,05 so với NA	

Trong thử nghiệm tiếp theo, tình trạng tắc tạm thời động mạch não giữa trong 2 giờ có kèm theo tái đồ bùng mặt gây ra sự rối loạn chức năng não một cách nghiêm trọng ở nhóm đối chứng được kiểm tra sau 24 giờ (Bảng 14). Không nhóm nào trong số nhóm

NA25 (25mg/kg x 3) cũng như MD75 (75mg/kg x 3) trong đó các dược chất thử nghiệm được đưa vào 1, 3 và 6 giờ sau khi tắc là có tác dụng bảo vệ đáng kể. Bất ngờ là, chỉ nhóm NA25+MD75 (25mg/kg + 75mg/kg) trong đó tổ hợp thử nghiệm được đưa vào 3 lần sau khi tắc là có hoạt tính bảo vệ đáng kể chức năng não, tốt hơn đáng kể so với chỉ sử dụng một mình NA và MD (Bảng 14).

Bảng 14

Tác dụng điều trị của các dược chất thử nghiệm lên chức năng thần kinh sau khi tắc tạm thời; n = 7-9; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm thử nghiệm	Trạng thái thần kinh, điểm
Nhóm đối chứng	2,75 $\pm$ 0,31
Nhóm Sham	0,29 $\pm$ 0,18 [#]
NA25	2,25 $\pm$ 0,16
MD75	2,13 $\pm$ 0,23
NA25+MD75	1,44 $\pm$ 0,18 ^{*&\$}
[*] P<0,005 so với nhóm đối chứng [#] P<0,0005 so với nhóm đối chứng ^{\$} P<0,05 so với MD ^{&} P<0,05 so với NA	

Phân tích hình thái cho thấy NA hoặc MD khi được sử dụng riêng biệt không tạo ra tác dụng bảo vệ đáng kể đối với sự tổn thương mô não do tắc cấp tính và tái đồ bùng mặt của MCA gây ra (Bảng 15). Bất ngờ là, tổ hợp NA+MD (25mg/kg + 75mg/kg), với thời điểm bắt đầu điều trị là sau khi tắc, có tác dụng bảo vệ đáng kể đối với sự tổn thương mô não, cao hơn đáng kể so với tác dụng của NA và MD khi được sử dụng riêng biệt (Bảng 15).

Bảng 15

Tác dụng điều trị của các dược chất thử nghiệm lên diện tích vùng tổn thương do thiếu máu não cục bộ ở các chuột bị tắc cấp tính; n = 7-9; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm thử nghiệm	Vùng tổn thương do thiếu máu não cục bộ, %
Nhóm đối chứng	22,3 $\pm$ 1,3
NA25	18,9 $\pm$ 1,8
MD75	18,2 $\pm$ 1,3
NA25+MD75	13,3 $\pm$ 1,7 ^{#&\$}
[#] P<0,005 so với nhóm đối chứng ^{\$} P<0,05 so với MD ^{&} P<0,05 so với NA	

Do đó, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện thấy rằng tổ hợp chứa NA và MD cho tác dụng bảo vệ tốt hơn đáng kể chống lại sự tổn thương mô não về mặt chức năng và hình thái so với mỗi hợp phần riêng biệt khi được sử dụng để trị liệu trước hoặc sau khi

tắc động mạch não giữa MCA. Kết quả này chỉ ra rằng tổ hợp có thể có lợi trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các tình trạng thiếu máu não cục bộ - giảm oxy máu ở CNS bao gồm đột quỵ, do hoạt tính của chúng trong thử nghiệm ức chế kết tập tiểu cầu và huyết khối, như được chỉ ra dưới đây.

Hoạt tính chống kết tập tiểu cầu và chống huyết khối

Thử nghiệm: Tình trạng kết tập tiểu cầu *in vitro*; mô hình huyết khối ở chuột cống *in vivo*; thực hiện xác định sự thay đổi nhiệt độ da *in vivo*.

Ví dụ 5

Hoạt tính chống kết tập tiểu cầu của MD và NA

Phương pháp

Tình trạng kết tập tiểu cầu được nghiên cứu trong máu toàn phần thu được từ người tình nguyện B. khỏe mạnh (37 tuổi), người này chưa từng sử dụng ASA hoặc các chất kháng tiểu cầu khác, bằng cách sử dụng Multiplate (Multiple Platelet Function Analyzer, Dynabyte Medical, Germany) theo phương pháp đã biết (Toth O et al, *Thromb Haemost*, 2006; 96: 781-788. Velik-Salchner C et al, *Anesth Analg* 2008; 107: 1798-1806). Các mẫu máu được thu nhận vào các ống làm bằng vật liệu dẻo được phủ bằng hirudin (Dynabyte Medical, Germany) và sử dụng để xác định trong khoảng thời gian từ 30 phút đến 4 giờ sau khi thu nhận. Thực hiện xác định theo quy trình Dynabyte Medical cải biến. Dung dịch natri clorua đẳng trương (0,3ml, hoặc nước muối với được chất thử nghiệm (có nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10^{-6} đến 10^{-4} mmol/mL)) được gia nhiệt sơ bộ đến nhiệt độ 37°C, được hút vào tế bào thử nghiệm và 0,3ml mẫu máu toàn phần được chống đông bằng cách bổ sung hirudin. Sau 5 phút ủ và khuấy ở nhiệt độ 37°C, bắt đầu đo bằng cách bổ sung dung dịch chất chủ vận thích hợp (do Dynabyte Medical, Germany sản xuất): 1) Thử nghiệm adenosin diphosphat (ADP) - ADP. ADP kích thích sự hoạt hoá tiểu cầu bởi các thụ thể ADP (P2Y₁₂ và các thụ thể khác).

2) thử nghiệm ADP HS (prostaglandin E₁ cùng với ADP). Việc bổ sung chất ức chế nội sinh PGE₁ khiến cho thử nghiệm ADP HS nhạy hơn so với thử nghiệm ADP.

Đường cong tích lũy được ghi lại trong 6 phút và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Dynabyte Medical. Các tác giả sáng chế đã tính toán các thông số sau của tình trạng kết tập tiểu cầu:

1. Amax, trị số kết tập tiểu cầu cực đại được biểu thị bằng đơn vị bất kỳ (arbitrary unit - AU) của tình trạng kết tập tiểu cầu;

2. AUC, tổng diện tích dưới đường cong tích lũy (AU*min). Trị số này bị ảnh hưởng bởi chiều cao tổng của đường cong tích lũy cũng như bởi độ dốc của nó và thích hợp nhất để biểu hiện hoạt tính tiểu cầu nói chung.

Thống kê

Kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình và sai số chuẩn của trị số trung bình này (Trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn). Để ước lượng mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê, phương pháp ANOVA một chiều được sử dụng. Nếu giả thiết vô hiệu bị bác bỏ, thì sử dụng phép kiểm định post-hoc Student-Newman-Keuls.

Kết quả

Thử nghiệm thứ nhất được lập ra để đánh giá hoạt tính của các chất ở các nồng độ khác nhau. Kết quả được thể hiện trong Bảng 16 cho thấy MD với khoảng nồng độ rộng bảo vệ đáng kể chống lại tình trạng kết tập tiểu cầu do ADP+PGE₁ gây ra. Amax giảm từ 100% ở nhóm đối chứng xuống đến 55-58% ở các nhóm MD 10⁻⁵ và 10⁻⁴. NA (ở nhóm 10⁻⁴ và 10⁻³ mmol/mL) cũng làm giảm tình trạng kết tập tiểu cầu do ADP gây ra. Hoạt tính kết hợp của cả hai chất làm giảm tình trạng kết tập tiểu cầu rõ rệt và cao hơn đáng kể tình trạng kết tập tiểu cầu do ADP hoặc ADP+PGE₁ gây ra, được biểu thị ở cả dữ liệu AUC và Amax.

Bảng 16

MD, NA và ảnh hưởng kết hợp lên tình trạng kết tập tiểu cầu do ADP và PGE₁+ADP gây ra; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn; N = 5-8.

Nhóm	ADP			PGE ₁ + ADP		
	AUC (AU*min)	Amax		AUC (AU*min)	Amax	
		AU	%		AU	%
Nhóm đối chứng	942 $\pm$ 43,7	169,3 $\pm$ 6,4	100	1005 $\pm$ 46,5	175,3 $\pm$ 8,9	100
MD 10 ⁻⁶	897 $\pm$ 23,4	159,5 $\pm$ 4,4	94	874 $\pm$ 31,0	151,8 $\pm$ 5,2	87
MD 10 ⁻⁵	882 $\pm$ 26,0	157,7 $\pm$ 3,4	93	579 $\pm$ 48,4**	96,6 $\pm$ 48,3**	55
MD 10 ⁻⁴	869 $\pm$ 36,3	153,2 $\pm$ 6,1	90	587 $\pm$ 37,4**	101,4 $\pm$ 2,2**	58
NA 10 ⁻⁴	859 $\pm$ 62,5	148,0 $\pm$ 5,2*	87	862 $\pm$ 51,9	146,7 $\pm$ 8,6	84
MD10 ⁻⁴ +NA10 ⁻⁴	474 $\pm$ 34,9***##\$\$	81 $\pm$ 5,7***##\$\$	48	306 $\pm$ 35,5***##\$\$	54,5 $\pm$ 5,8***##\$\$	31
*P<0,05 so với nhóm đối chứng **P<0,005 so với nhóm đối chứng ***P<0,0005 so với nhóm đối chứng ****P<0,00005 so với nhóm đối chứng #P<0,005 so với MD 10 ⁻⁴						

^{##}P<0,0005 so với MD 10⁻⁴

^{\$}P<0,005 so với NA 10⁻⁴

^{\$\$}P<0,0005 so với NA 10⁻⁴

Ví dụ 6

Hoạt tính của MD và NA lên chứng huyết khối

Phương pháp

Các tác giả sáng chế chọn mô hình thử nghiệm dựa trên chứng huyết khối động mạch ở chuột cống do FeCl₃ gây ra (Kurz K et al, *Thromb Res* 1990; 60: 269-280. Wang X, Xu L, *Tromb Res* 2005; 115: 95-100). Sự tổn thương mô được khởi đầu bởi sự oxy hoá hóa học do sắt gây ra sự bám dính tiểu cầu và tình trạng kết tập tiểu cầu được theo sau bởi sự hoạt hoá đông tụ và sự lắng đọng fibrin. Chuột cống đực Wistar có khối lượng 350-420g được sử dụng trong các thử nghiệm. Chuột cống được chia ngẫu nhiên thành các nhóm thử nghiệm khác nhau, mỗi nhóm bao gồm không ít hơn bảy chuột cống thử nghiệm. Tả được hoặc hợp được chất thử nghiệm MD (25mg/kg), NA (25mg/kg) và tổ hợp MD+NA (25+25mg/kg) được sử dụng qua đường miệng 2 giờ trước khi khởi đầu chứng huyết khối.

Các chuột cống thử nghiệm được gây mê bằng pentobarbital natri 50mg/kg, tiêm qua màng bụng và được đặt lên bàn mổ có điều chỉnh nhiệt độ trong toàn bộ quá trình thử nghiệm để duy trì nhiệt độ cơ thể ở nhiệt độ 37°C. Một trong số động mạch cảnh được để lộ ra bằng vết rạch ở cổ, được tách khỏi mô bám dính, dây thần kinh phế vị, và cực dò lưu lượng (thiết bị đo lưu lượng máu bằng nam châm điện MFV 1200 Nikon Kohden, Japan) được đặt trên đoạn lộ ra của động mạch cảnh chung để ghi lại lưu lượng máu. Sau khoảng thời gian làm ổn định là 15 phút, chứng huyết khối được gây ra bằng cách đặt trực tiếp (tiếp xúc với bề mặt của mạch máu vỡ) hai miếng (2x1mm) giấy lọc Whatman, được ngâm trong dung dịch FeCl₃ 15%. Thời gian huyết khối của động mạch cảnh được ghi lại là thời gian để dòng máu ngừng chảy hoàn toàn và được báo cáo là thời gian cho đến khi tắc (time till occlusion - TTO).

Ngoài ra, trong toàn bộ thử nghiệm huyết khối, thời gian chảy máu ở đuôi chuột cống được đo. Đuôi được cắt ngang 5mm từ đầu cuối bằng dao mổ và đuôi này được ngâm ngay lập tức vào nước muối đẳng trương ấm 37°C cho đến khi ngừng chảy máu. Ngừng chảy máu được định nghĩa là thời gian ngừng chảy máu hoàn toàn mà không tái diễn chảy máu trong 30 giây tiếp theo.

Thống kê

Kết quả được phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel 2007. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn của từ 7 đến 8 chuột riêng biệt/lần đo. Mức độ khác biệt giữa mỗi nhóm thử nghiệm được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều với phép so sánh lặp lại (phép kiểm định Tukey). $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Thời gian trung bình để FeCl_3 gây ra chứng huyết khối mạch và làm cho động mạch ngừng chảy ở nhóm đối chứng là 24,4 phút (Bảng 17).

Bảng 17

MD, NA và ảnh hưởng kết hợp lên chứng huyết khối do FeCl_3 gây ra. Trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn; N = 7-8

Nhóm	Thời gian cho đến lúc tắc (TTO)		Thời gian chảy máu đuôi	
	Cực tiểu	%	Cực tiểu	%
Nhóm đối chứng	24,4 $\pm$ 1,45	100	8,9 $\pm$ 1,28	100
MD 25mg/kg	29,8 $\pm$ 2,29	122	10,5 $\pm$ 1,01	118
NA 25mg/kg	30,3 $\pm$ 3,12	124	11,5 $\pm$ 1,39	129
MD+NA (25+25 mg/kg)	34,0 $\pm$ 2,78*	139	11,4 $\pm$ 1,42	128
*P<0,05 so với nhóm đối chứng				

MD ở liều lượng 25mg/kg không tạo ra sự gia tăng đáng kể về TTO. NA gây ra sự gia tăng một chút TTO, mức tăng này là không đáng kể. Hoạt tính của NA lên thời gian chảy máu đuôi là tương tự. Bất ngờ là, việc sử dụng kết hợp MD và NA gây ra sự gia tăng TTO có nghĩa đáng kể (39%) mà không kèm theo sự tăng có nghĩa về thời gian chảy máu đuôi.

Khi xem xét ảnh hưởng tích cực của tổ hợp MD và NA lên tình trạng kết tập tiểu cầu *in vitro* và sự mở rộng TTO *in vivo*, tổ hợp này có thể sử dụng để làm giảm nguy cơ huyết khối ở các bệnh nhân mắc chứng hội chứng xơ vữa động mạch rõ rệt, có thể nhồi máu và chấn thương cơ tim, cũng như trong khoảng thời gian sau phẫu thuật. Tổ hợp MD và NA không kéo dài thời gian chảy máu cho thấy tổ hợp này có thể sử dụng cho các bệnh nhân có nguy cơ chảy máu gia tăng trong khoảng thời gian trước và sau phẫu thuật.

Ví dụ 7

Nghiên cứu so sánh việc sử dụng kết hợp MD/NA và LA/NA để làm giảm hiện

tượng đỏ bừng mặt

Axit nicotinic (niacin, NA) làm giảm hữu hiệu mức cholesterol, LDL và triglycerit, trong khi làm tăng mức HDL trong huyết thanh. Tuy nhiên, việc hạn chế ảnh hưởng bất lợi ở các bệnh nhân sử dụng niacin giải phóng tức thì hoặc kéo dài khiến cho hơi ẩm của da và sự giãn mạch tăng lên nhanh chóng, còn được gọi là “hiện tượng đỏ bừng mặt” đôi khi dẫn đến đứt mạch (Gupta EK, Ito MK, *Heart Dis* 2002; 4: 124-137). Laropiprant (MK-0524) được đề xuất là một trong các chất có hoạt tính và có triển vọng để làm giảm hiện tượng đỏ bừng mặt do niacin gây ra (Cheng K et al, *PNAS* 2006; 103: 6682-6687). Mục đích của nghiên cứu này của các tác giả sáng chế là so sánh hoạt tính của MD và LA lên hiện tượng đỏ bừng mặt (sự thay đổi nhiệt độ da và lưu lượng máu) do NA gây ra trong thử nghiệm.

7.1.1. Xác định sự giãn mạch da

Mô hình

Chuột cống đực Wistar được gây mê bằng natri pentobarbital (50mg/kg tiêm qua màng bụng) và giữ trong trạng thái mê bằng các liều lượng bổ sung (10mg/kg) mỗi giờ. Huyết áp được đo trong động mạch cảnh trái, ECG được ghi bằng chì II tiêu chuẩn. Lưu lượng máu ở động mạch tai phải được đo bằng thiết bị đo lưu lượng bằng tia laze Doppler (OXYFLOW 2000, USA). Lưu lượng máu, ECG và áp suất động mạch được ghi lại bằng hệ thống ADInstruments PowerLab và lưu trong máy tính để xử lý sau. Sau khi chạy đường nền 10 phút, các dược chất thử nghiệm được tiêm dưới da vào vùng giữa hai bả vai và được chạy tiếp trong 30 phút. Dữ liệu lưu lượng máu trung bình của mỗi các chuột thử nghiệm được tính toán dựa trên huyết áp trung bình và được so với dữ liệu ban đầu và nhóm đối chứng. Kết quả được tính toán từ 5 đến 8 thử nghiệm riêng biệt và được biểu thị dưới dạng tỷ lệ % của thay đổi cực đại về lưu lượng máu so với đường nền [Carballo-Jane E et al, *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007; 56 (3): 308-316].

Thông kê

Kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn đối với mỗi nhóm. Phân tích thống kê trong các nhóm được thực hiện bằng phép kiểm định t-Student cho dữ liệu chưa cặp đôi và phép kiểm định Chi bình phương. Mức độ khác biệt giữa mỗi nhóm thử nghiệm được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều với phép so sánh lặp lại (phép kiểm định Tukey). $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Kết quả được thể hiện trên Bảng 18 cho thấy NA ở liều lượng 15mg/kg làm gia tăng đáng kể lưu lượng máu ở động mạch tai ở mô hình chuột cống thử nghiệm này. Tương tự với nhóm đối chứng, MD gây ra sự thay đổi không đáng kể về lưu lượng máu. NA cùng với MD gây ra sự gia tăng chậm (tăng chậm) và hoàn toàn không có ý nghĩa thống kê về lưu lượng máu so với chỉ sử dụng một mình NA (Bảng 18). Khả năng MD chống lại sự giãn mạch ngoại biên do NA gây ra có thể có tác dụng có lợi trong lâm sàng để làm giảm tác dụng trên da (hiện tượng đỏ bừng mặt) của niacin, do đó được chất này được nghiên cứu cụ thể hơn (xem phần dưới đây).

Bảng 18

Hoạt tính của các chất thử nghiệm lên sự giãn mạch da; n = 5-8; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Sự thay đổi về lưu lượng máu, %
Nhóm đối chứng/dung môi	2,15 $\pm$ 4,29
NA (15mg/kg)	46,1 $\pm$ 7,52 [#]
MD (45mg/kg)	7,15 $\pm$ 3,72
NA+MD (15+45mg/kg)	19,33 $\pm$ 6,44 ^{\$}
[#] P<0,01 so với nhóm đối chứng	
^{\$} P<0,05 so với NA	

7.1.2. Xác định sự giãn mạch da

Vật liệu và phương pháp. Xem phần 7.1.

Thiết kế thử nghiệm

Nhóm	Điều trị	Số lượng chuột thử nghiệm
Dung môi cho NA và MD		5
NA	NA 15mg/kg	7
Dung môi cho LA		5
LA	LA 0,3mg/kg	6
LA+NA [0]	LA 0,3mg/kg+NA 15mg/kg	6
LA+NA [30]	LA 0,3mg/kg+NA 15mg/kg	7
MD	MD 45mg/kg	6
NA+MD [0]	NA 15mg/kg+MD 45mg/kg	6

Thống kê

Kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn đối với mỗi nhóm. Phân tích thống kê trong các nhóm được thực hiện bằng phép kiểm định t-Student. Mức độ khác biệt giữa mỗi nhóm thử nghiệm được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều với phép so sánh lặp lại (phép kiểm định Tukey). $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

MD khi được sử dụng một mình, tương tự với LA, chỉ gây ra sự thay đổi không đáng kể về lưu lượng máu. Khi NA được sử dụng đồng thời với MD (thời gian dùng trước = 0), việc gia tăng lưu lượng máu là chậm hơn và kém rõ rệt hơn trong trường hợp sử dụng đồng thời NA và LA (LA+NA [0], xem Bảng 19). Không có mức độ khác biệt đáng kể về lưu lượng máu tại giữa MD+NA [0] (khi MD được bổ sung cùng với NA) và MD+NA [30] (xử lý sơ bộ 30 phút dùng trước NA và MD 45mg/kg). Trong thử nghiệm của các tác giả sáng chế, chỉ xử lý sơ bộ bằng LA 30 phút trước NA (NA+LA [30]) làm giảm đáng kể sự gia tăng lưu lượng máu do NA gây ra ở mạch tai chuột cống (Bảng 19).

Bảng 19

Hoạt tính của MD và LA lên sự giãn mạch da do NA gây ra; N = 5-7; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Sự thay đổi về lưu lượng máu, %
Dung môi cho NA và MD	2,12 $\pm$ 1,66 ^{ss}
NA	52,27 $\pm$ 8,5**
MD	6,04 $\pm$ 2,02 ^s
NA+MD [0]	25,11 $\pm$ 5,25* ^s
NA+MD [30]	28,07 $\pm$ 5,74* ^s
Dung môi cho LA	7,31 $\pm$ 1,93 ^{ss}
LA	9,87 $\pm$ 2,60 ^s
NA+LA [0]	29,34 $\pm$ 7,82*
NA+LA [30]	16,32 $\pm$ 6,21 ^s
*P<0,05 so với dung môi **P<0,005 so với dung môi ^s P<0,05 so với NA ^{ss} P<0,005 so với NA	

Khả năng chống lại sự giãn mạch ngoại biên do NA gây ra của MD có thể có tác dụng có lợi trong lâm sàng để làm giảm tác dụng lên da (hiện tượng đỏ bừng mặt) của NA. Trong các thử nghiệm của các tác giả sáng chế, các tác giả sáng chế không thể

chứng minh được lợi thế bất kỳ của việc sử dụng đồng thời NA và LA so với sử dụng đồng thời NA và MD.

7.2. Đánh giá sự thay đổi nhiệt độ da do niacin gây ra

Vật liệu và phương pháp

Để ghi lại sự thay đổi nhiệt độ da của chuột cống nguyên vẹn, phương pháp đo nhiệt độ không tiếp xúc được sử dụng (Papaliodis D et al, *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1382-1387). Việc đo nhiệt độ được thực hiện bằng nhiệt kế hồng ngoại cầm tay (Model Proscan 510, TFA-Dostman). Các chuột thử nghiệm được tập cho quen cầm nắm và quen với cực dò hồng ngoại trong 3 ngày trước khi sử dụng. Ba lần đọc nhiệt độ từ mặt lưng của mỗi tai được ghi lại mà không gây mê tức thời trước khi các chuột thử nghiệm được tiêm dưới da bằng NA (vùng giữa hai bả vai) hoặc dung môi/hộp được chất thử nghiệm (vùng đuôi). Tiếp theo, nhiệt độ tai được đo 5 phút một lần trong khoảng thời gian lên tới 60 phút. Các chuột thử nghiệm được cho quay trở lại chuồng giữa mỗi lần đo. Sáu số đo nhiệt độ từ tai (ba số từ mỗi tai) được tính trung bình tại mỗi thời điểm. Trước tiên, Laropiprant [MK 0524, Cayman Chemicals] (LA) được hòa tan trong DMSO và sau đó pha loãng lại bằng 0,9% NaCl vào mỗi ngày thử nghiệm. Tỷ lệ kết hợp giữa NA và LA dựa trên Tóm tắt về đặc tính sản phẩm đối với viên nén giải phóng biến đổi Tredaptive™ (axit nicotinic/laropiprant) 1000mg/20mg.

Kế hoạch thử nghiệm

I. Thử nghiệm hoạt tính của thời gian và dung môi lên nhiệt độ của da

Nhóm	Điều trị	Số lượng chuột thử nghiệm
SolvLA	Dung môi cho LA	6
SolvNA	Dung môi cho NA	6
NA	NA 15mg/kg tiêm dưới da	6

II. Nghiên cứu hoạt tính của tổ hợp NA/LA và NA/MD lên nhiệt độ da

LA được sử dụng đồng thời với NA dưới dạng NA+LA [0] hoặc dùng trước NA 30 phút dưới dạng NA+LA [30], MD được sử dụng đồng thời với NA dưới dạng NA+MD [0] hoặc dùng trước NA 30 phút dưới dạng NA+MD [30]; hoạt tính của LA và MD khi được sử dụng riêng biệt lên nhiệt độ da cũng được kiểm tra.

Nhóm	Điều trị	Số lượng chuột thử nghiệm
Nhóm đối chứng/dung môi		6
NA	NA 15mg/kg	6
LA	LA 0,3mg/kg	6
NA+LA	NA 15mg/kg+LA 0,3 mg/kg	6*
MD	MD 45mg/kg	6
NA+MD	NA 15mg/kg+MD 45 mg/kg	6*

*ở mỗi nhóm thời gian

Thống kê

Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel và kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn. Kết quả trung bình của các nhóm khác nhau được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều và phép kiểm định t-Student. $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Nhiệt độ tai trung bình đường nền nằm trong khoảng từ $28,1^{\circ}\text{C}$ đến $30,2^{\circ}\text{C}$ được ghi ở thời điểm từ 10 giờ sáng đến 2 giờ chiều. Nghiên cứu đáp ứng thời gian đối với NA (15mg/kg tiêm dưới da) cho thấy sự tăng nhiệt độ cực đại $2,32 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$ so với đường nền và $2,57 \pm 0,43^{\circ}\text{C}$ so với nhóm dung môi ($P < 0,005$) ở 10 phút (dưới đây). Đã xác minh được rằng hoạt tính của dung môi LA lên nhiệt độ tai về cơ bản khác với hoạt tính của dung môi NA và MD khi được sử dụng riêng biệt trong 5 phút đầu sau khi tiêm, do đó chỉ một nhóm đối chứng được sử dụng.

Tiêm MD hoặc LA dưới da không gây ra thay đổi đáng kể ở nhiệt độ da tai chuột cống (Bảng 21). Sử dụng đồng thời NA và MD (nhóm NA+MD [0]; thời gian dùng trước = 0) gây ra sự giảm hiện tượng đỏ bừng mặt do NA, tác dụng này tương tự với tác dụng do sử dụng đồng thời NA và LA gây ra. Sự tăng nhiệt độ do NA gây ra giảm tương ứng là 69% và 67% (Bảng 21). Không có mức độ khác biệt đáng kể về nhiệt độ giữa nhóm MD+NA [0] (khi MD được bổ sung cùng với NA) và MD+NA [30] (xử lý sơ bộ trước bằng MD 45mg/kg). Trong thử nghiệm của các tác giả sáng chế, chỉ xử lý sơ bộ bằng

LA, khi được sử dụng bằng cách tiêm dưới da ở liều lượng 0,3mg/kg 30 phút trước khi tiêm NA, tạo ra sự bảo vệ đáng kể đối với sự tăng nhiệt độ da, do NA gây ra (Bảng 21).

Bảng 21

Hoạt tính của LA và MD lên sự tăng nhiệt độ da do NA gây ra; N = 6, trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Nhiệt độ ban đầu, °C	Nhiệt độ cực đại, °C	Mức tăng, %
Nhóm đối chứng/dung môi	29,5 $\pm$ 0,29	29,62 $\pm$ 0,25 ^{\$\$\$}	-
NA	29,61 $\pm$ 0,4	32,2 $\pm$ 0,42***	100
LA	29,43 $\pm$ 0,27	29,5 $\pm$ 0,35 ^{\$\$\$}	-
NA+LA [0]	29,72 $\pm$ 0,31	31,45 $\pm$ 0,40**	67
NA+LA [30]	29,51 $\pm$ 0,32	30,73 $\pm$ 0,34* ^{\$}	47
MD	29,42 $\pm$ 0,38	29,7 $\pm$ 0,31 ^{\$\$\$}	-
NA+MD [0]	29,53 $\pm$ 0,29	31,33 $\pm$ 0,48*	69
NA+MD [30]	29,68 $\pm$ 0,26	31,40 $\pm$ 0,39*	65
*P<0,05 so với nhóm đối chứng **P<0,005 so với nhóm đối chứng ***P<0,0005 so với nhóm đối chứng ^{\$} P<0,05 so với NA ^{\$\$\$} P<0,0005 so với NA			

Do đó, các tác giả sáng chế đã xác minh được rằng tổ hợp chứa NA và MD không chỉ có hoạt tính kháng tiêu cầu hiệp đồng bất ngờ, mà còn có tác dụng không mong muốn - hiện tượng đỏ bừng mặt là giảm.

Ví dụ 8

Đánh giá ảnh hưởng lên nồng độ đường trong máu

Đã biết rằng ngay cả khi sử dụng một liều NA lớn duy nhất qua đường miệng cũng làm tăng nồng độ GL trong máu của động vật (Thornton JH, Schultz LH, *J Dairy Sci* 1980; 63, 262-268) và khi sử dụng NA để điều trị cho các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường cần phải kiểm soát nồng độ đường (Goldberg RB, Jacobson TA, *Mayo Clin Proc* 2008; 83 (4): 470-8).

Phương pháp

Chuột cống đực trưởng thành Wistar được sử dụng trong các thử nghiệm. Các chuột thử nghiệm được cho nhịn ăn từ tối trước thử nghiệm để làm ổn định nồng độ đường trong máu. Nồng độ GL trong tĩnh mạch máu được xác định trước thử nghiệm và 45 phút sau khi dùng mẫu trắng hoặc được chất thử nghiệm qua đường miệng. Nồng độ GL được xác định bằng kit định lượng có bán trên thị trường (*Optium, Abbott Diabetes Care Ltd, USA*). Đã biết là NA khi được sử dụng với liều cao (300mg/kg qua đường

miệng) sẽ làm tăng nồng độ GL trong máu theo cách ổn định và lâu dài. Liều dùng tương tự của MD (300mg/kg) được sử dụng.

Các chuột thử nghiệm được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm (n = 8):

1. Nhóm đối chứng (dùng dung dịch NaCl 1%, liều dùng 2ml/kg)
2. Nhóm NA (dùng NA, liều dùng 300mg/kg)
3. Nhóm MD (dùng MD, liều dùng 300mg/kg)
4. Nhóm NA+MD (dùng 300mg/kg NA và 300mg/kg MD).

Thông kê

Kết quả được biểu thị dưới dạng trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn đối với mỗi nhóm. Phân tích thống kê trong các nhóm được thực hiện bằng phép kiểm định t-Student. Mức độ khác biệt giữa mỗi nhóm thử nghiệm được so sánh bằng phương pháp ANOVA một chiều với phép so sánh lặp lại (phép kiểm định Tukey). $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

NA làm tăng nồng độ GL có ý nghĩa thống kê so với đường nền và nhóm đối chứng (Bảng 21). MD làm giảm không đáng kể nồng độ GL, điều này không khác với nhóm đối chứng. Tổ hợp chứa NA và MD làm cho sự gia tăng rõ rệt nồng độ GL giảm đi trông thấy (thay đổi so với đường nền là 27,5%, trong khi thay đổi do NA gây ra so với đường nền là 61,1%). Tác dụng tích cực này chỉ ra rằng tổ hợp NA+MD có thể làm giảm rõ rệt các tác dụng không mong muốn ở các bệnh nhân có khả năng điều chỉnh nồng độ glucoza trong máu không ổn định hoặc bị xáo trộn.

Bảng 21

Hoạt tính của các dược chất thử nghiệm lên nồng độ GL trong máu chuột cống; n = 8; trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn

Nhóm	Đường nền	Thử nghiệm	Thay đổi so với đường nền (%)	% so với nhóm đối chứng
Nhóm đối chứng (Nước muối)	3,84 $\pm$ 0,51	3,9 $\pm$ 0,53	+1,6	0
NA	3,8 $\pm$ 0,344	6,12 $\pm$ 0,42* ^{&}	+61,1	+56,9
MD	3,92 $\pm$ 0,34	3,72 $\pm$ 0,31	-5,1	-4,6
NA + MD	4,03 $\pm$ 0,349	5,14 $\pm$ 0,56	+27,5	+31,8
*P<0,05 so với nhóm đối chứng &P<0,01 so với đường nền				

Kết luận

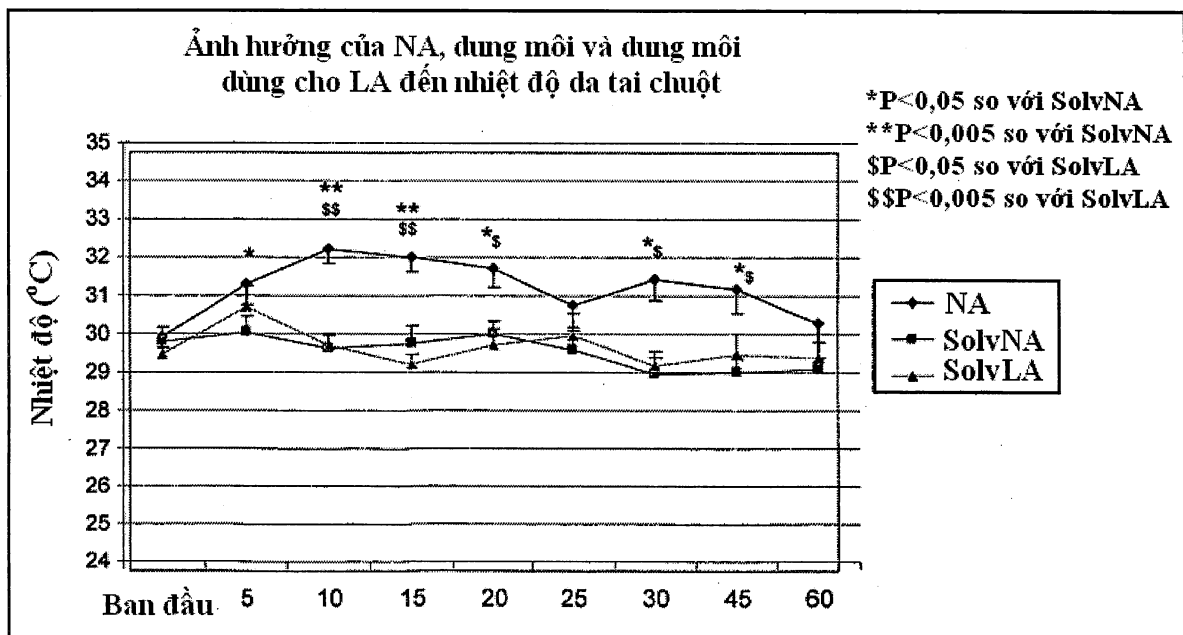
Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện thấy rằng tổ hợp chứa NA và MD tăng cường tác dụng chữa bệnh của NA lên các rối loạn, bao gồm rối loạn chuyển hóa lipid, hội chứng tăng lipid máu, hội chứng xơ vữa động mạch, bệnh mạch vành tim được chọn từ nhóm bao gồm chứng đau thắt ngực và nhồi máu cơ tim, thiếu máu não cục bộ tạm thời và thường trực bao gồm tai biến mạch máu não và đột quỵ và bệnh tắc nghẽn động mạch ngoại biên, cải thiện tình trạng bệnh tim và não trong điều kiện thiếu máu não cục bộ-giảm oxy máu. Tổ hợp này cũng cải thiện sự giãn mạch ngoại biên do NA gây ra. Do đó, mong đợi là tổ hợp mới có hoạt tính được cải thiện so với NA trong điều trị rối loạn liên quan đến chuyển hóa, cho phép làm giảm liều dùng hằng ngày của NA, và có các tác dụng không mong muốn giảm rõ rệt.

Thuật ngữ “tổ hợp” được sử dụng trong sáng chế nghĩa là sử dụng đồng thời, liên tiếp hoặc riêng biệt hợp phần của tổ hợp này. Do đó, sáng chế đề cập đến tổ hợp chứa NA và MD hoặc muối được dụng của nó để sử dụng đồng thời, liên tiếp hoặc riêng biệt để phòng ngừa tình trạng kết tập tiểu cầu. Tổ hợp theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng dược phẩm. Theo khía cạnh này, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa NA hoặc muối được dụng của nó và MD hoặc muối được dụng của nó kết hợp với tá dược pha loãng hoặc chất mang được dụng. Dược phẩm theo sáng chế còn chứa các chế phẩm riêng biệt chứa được chất thứ nhất là NA hoặc muối được dụng của nó và tá dược pha loãng hoặc chất mang được dụng, và được chất thứ hai là MD hoặc muối được dụng của nó và tá dược pha loãng hoặc chất mang được dụng. Tổ hợp như vậy được bào chế để sử dụng liên tiếp hoặc dùng riêng biệt. Do việc điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn liên quan đến chuyển hóa được cho là sử dụng được phẩm trong thời gian dài, phương thức thích hợp nhất để thực hiện sáng chế được đưa ra là dạng thích hợp để sử dụng qua đường miệng, như viên nén hoặc viên nang. Lượng mỗi được chất của tổ hợp theo sáng chế trong dược phẩm sẽ thay đổi tùy thuộc vào tình trạng bệnh được điều trị. Chuyên gia trong lĩnh vực điều trị cho các bệnh nhân bị mắc các rối loạn liên quan đến chuyển hóa có thể dễ dàng chọn lựa được những lượng thích hợp của mỗi được chất và chế độ liều thích hợp. Tỷ lệ thích hợp của các được chất NA và MD hoặc muối của nó nằm trong khoảng từ 3:1 đến 1:3.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng tổ hợp hoặc dược phẩm nêu trên, để sản xuất thuốc để sử dụng đồng thời, liên tiếp hoặc riêng biệt để phòng ngừa tình trạng kết tập tiểu cầu/chứng huyết khối.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa axit nicotinic hoặc muối được dụng của nó với liều hữu hiệu và meldonium hoặc muối được dụng của nó với liều hữu hiệu kết hợp với tá dược hoặc chất mang được dụng.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó axit nicotinic hoặc muối được dụng của nó được bào chế ở dạng chế phẩm giải phóng tức thì, giải phóng duy trì hoặc giải phóng kéo dài.
3. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó meldonium hoặc muối được dụng của nó được bào chế ở dạng chế phẩm giải phóng tức thì, giải phóng duy trì hoặc giải phóng kéo dài.
4. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa axit nicotinic hoặc muối được dụng của nó với liều nằm trong khoảng từ 50mg đến 500mg và meldonium hoặc muối được dụng của nó với liều nằm trong khoảng từ 50mg đến 500mg.
5. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này còn chứa statin được chọn từ nhóm bao gồm atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin và simvastatin.

**Fig.1**