

ÖZET

HÜCRE BÜYÜMESİNİ ARTTIRMAK İÇİN TEDAVİ

- 5 Merkezi veya periferik sinir sisteminin dokularında nöronların nöronal büyümesini teşvik etmek için bir bileşimin kullanımı açıklanmaktadır. Ayrıca, proliferasyonun veya farklılaşan nöronal hücrelerinin indüklenmesi için bir yöntem açıklanmaktadır.

İSTEMLER

1. Bir bileşim olup, özelliği; yatkın deneklerde veya inme veya nörodejenerasyon riski taşıyan deneklerde inme veya nörodejenerasyonun etkilerini azaltmak için bir yöntemde kullanılmak için aşağıdaki bileşenlerden en az üçünü içermesidir:
- 5 Ligusticum Chuanxiong rizom (Chuan Xiong),
radix angelicae sinensis (Çin Anjelika veya Dang Gui'nin kökü),
Radix Astragali (Membranöz geven veya Huang Qi'nin kökü),
10 Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae (Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan Shen),
Radix Paeoniae Rubra (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lactiflora Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao),
Carthamus Tinctorius çiçeği (Aspir veya HongHua),
15 Prunus Persica (Şeftali tohumu veya Taoren),
Radix Polygalae (ince yapraklı süt otu kökü, Polygala tenuifolia Willd., Polygala sibirica L. veya Yuanzhi) ve
Rhizoma acori Tatarinowii (çimen yaprağı eğir kökü ya da Shichangpu rizomu).
- 20
2. İstem 1'e göre bileşim olup, özelliği; ayrıca bir veya daha fazla:
- Buthus martensii (kurutulmuş akrep gövdesi veya Quanxie),
Eupolyphaga Seu Setelephaga (kurutulmuş öğütülmüş böcek gövdesi,
25 Eupolyphaga sinensis Walker, Steleophaga plancyi veya Tubiechong),
Calculus Bovis Artifactus (Doğal veya Yapay İnek bezoar veya Rengong Niu Huang),
Cornu Saigae Tataricae (Antilop Boynuzu veya Lingyangjiao) ve
30 sülüklerin kurutulmuş gövdesi (Hirudo, Whitmania pigra Whitman, Hirudo nipponica Whitman, Whitmania acranulata Whitman veya Shuizhi) içermesidir.

3. İstem 1 veya istem 2'ye göre kullanım için bir bileşim olup, özelliği; bileşimin, bileşenlerin 3 ila 14'ünü içermesidir.
- 5 4. İstem 1 veya istem 2'ye göre kullanım için bir bileşim olup, özelliği; bileşimin, bileşenlerin 4'ünü içermesidir.
5. İstem 1 veya istem 2'ye göre kullanım için bir bileşim olup, özelliği; bileşimin, bileşenlerin 9'unu içermesidir.
- 10 6. İstem 1 ila 5'ten herhangi birine göre kullanım için bir bileşim olup, özelliği; ayrıca Batı tıbbında kullanılan bir madde içermesidir.
- 15 7. İstem 6'ya göre kullanım için bir bileşim olup, özelliği; bileşimin ve Batı tıbbının, ilaç olarak bir insana sırayla veya ayrı ayrı kombinasyon halinde verilmesi için uygun olmasıdır.
- 20 8. İstem 1'e göre kullanım için bir bileşim olup, özelliği; bileşimin, aşağıdaki bileşenleri içermesidir:
Ligusticum Chuanxiong rizom (Chuan Xiong),
radix angelicae sinensis (Çin Anjelika veya Dang Gui'nin kökü),
Radix Astragali (Membranöz geven veya Huang Qi'nin kökü),
Radix et Salviae Miltiorrhizae (Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan
25 Shen),
Radix Paeoniae Rubra (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lactiflora
Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao),
Carthamus Tinctorius çiçeği (Aspir veya HongHua),
Prunus Persica (Şeftali tohumu veya Taoren),
30 Radix Polygalae (ince yapraklı süt otu kökü, Polygala tenuifolia
Willd., Polygala sibirica L. veya Yuanzhi) ve

Rhizoma acori Tatarinowii (çimen yaprağı eğıir kökü ya da Shichangpu rizomu).

9. İstem 1'e göre kullanım için bir bileşim olup, özelliğı;
5 bileşimin, aşağıdaki bileşenleri içermesidir:
Ligusticum Chuanxiong rizom (Chuan Xiong),
radix angelicae sinensis (Çin Anjelika veya Dang Gui'nin kökü),
Radix Astragali (Membranöz geven veya Huang Qi'nin kökü),
Radix et Salviae Miltiorrhizae (Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan
10 Shen),
Radix Paeoniae Rubra (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lactiflora
Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao),
Carthamus Tinctorius çiçeğı (Aspir veya HongHua),
Prunus Persica (Şeftali tohumu veya Taoren),
15 Radix Polygalae (ince yapraklı süt otu kökü, Polygala tenuifolia
Willd., Polygala sibirica L. veya Yuanzhi) ve
Rhizoma acori Tatarinowii (çimen yaprağı eğıir kökü ya da
Shichangpu rizomu),
Buthus martensii (kurutulmuş akrep gövdesi veya Quanxie),
20 Eupolyphaga Seu Setelephaga (kurutulmuş öğütölmüş böcek gövdesi,
Eupolyphaga sinensis Walker, Steleophaga plancyi veya
Tubiechong),
Calculus Bovis Artificatus (Doğal veya Yapay İnek bezoar veya
Rengong Niuhuang),
25 Cornu Saigae Tataricae (Antilop Boynuzu veya Lingyangjiao) ve
sülüklerin kurutulmuş gövdesi (Hirudo, Whitmania pigra Whitman,
Hirudo nipponica Whitman, Whitmania acranulata Whitman veya
Shuizhi).

TARİFNAME

HÜCRE BÜYÜMESİNİ ARTTIRMAK İÇİN TEDAVİ

5 Teknik Alan

Mevcut buluş genellikle, nöronal büyümeyi ve çoğalmayı desteklemek için yöntemler ve bileşimlerle ilgilidir. Mevcut buluş ayrıca hücre büyümesini teşvik etmek için in vitro bir yöntem ile de ilgilidir.

Önceki Teknik

Sinir sistemi yaralanmaları her yıl sayısız insanı etkilemektedir. Bu yüksek nörolojik yaralanma insidansının bir sonucu olarak, sinir rejenerasyonu ve onarımı, yaralanma sonrası sinir işlevselliğini geri kazanmanın yeni yollarının keşfedilmesi için hızla büyüyen bir alan haline gelmektedir. Bununla birlikte, şimdiye kadar, merkezi sinir sistemi (CNS) lezyonlarının klinik olarak onarılması ve sinir sistemi yaralanmalarından muzdarip hastalar için nörolojik fonksiyonların geri kazanılması sorunlu olmuştur. Bu nedenle, amiotrofik lateral skleroz (ALS) ve yaşlılık demansı gibi çeşitli sinir sistemi hastalıkları olan hastalara, doktorları tarafından her zaman nörolojik fonksiyonlarını kurtarmanın zor olacağı söylenmiştir.

Nöronların nöritleri (aksonlar ve dendritler gibi) uzatma kabiliyeti, gelişim sırasında nöronal bağlantıların kurulmasında büyük öneme sahiptir. Nörorejenerasyon sırasında ayrıca bir lezyon sonucu tahrip olmuş bağlantıları tekrar kurmak gerekir. Bununla birlikte, merkezi sinir sistemindeki aksonlar, bir lezyondan sonra yeniden büyümek için çok sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Bu nedenle, ilerleyici bir nöronal hücre dejenerasyonu

olan senil demans gibi hastalıklar için, nöronal hücre büyümesini ve çoğalmasını uyarannöral onarım ve nörolojik fonksiyonların restore edilmesine odaklanan terapötik ajanların veya moleküllerin araştırılması yeni bir terapötik strateji açacaktır.

5 Sayfa 2A'dan itibaren metin ekleme Sinir sistemi yaralanmalarını ve nörolojik hastalıkları tedavi etme yöntemlerinin iyileştirilmesine ihtiyaç vardır. Daha spesifik olarak, hasarlı veya hastalık sinirlerinin tekrar işlev görmesini sağlamak için nöronal büyümeyi ve nöronların çoğalmasını teşvik edebilen

10 rejeneratif tedavilerin sağlanmasına ihtiyaç vardır.

Buluşun Kısa Açıklaması

WO 2007/043796 sayılı belge, beta-amiloid agregasyonunu, toksisiteyi ve hücre apoptosisini inhibe edebilen ve bu nedenle bilişsel fonksiyon bozukluklarının tedavisinde ve önlenmesinde kullanılabilen *Salviae miltiorrhizae* Bunge BGE'nin dietil eterde çözünür bir fraksiyonu ile ilgilidir. CN 102091166 A, nöromusküler rejenerasyonu teşvik etmek için *codonopsis pilosula*, *astragalus* ve kırmızı köklü *salvia* kökü gibi geleneksel Çin ilaçlarıyla ilgilidir. WO 2007/106049 A1, inme, nörodejeneratif hastalıklar, beyin veya sinir sistemi travması veya nöroplastisite arasından seçilen koşulları tedavi etmek için *Radix Astragali*, *Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* kökü ve *Radix Paeoniae Rubra* gibi bileşimler ve yöntemler sunar. WO 2010/053456, NeuroAid gibi geleneksel Çin tıbbı kullanarak inme hastalarının tedavisi için bileşimler ve yöntemler sunar. Siow C., Eur Neurol (2008) 60: 264-266, inme iyileşmesinde NeuroAid ile ilgilidir.

25

30 Birinci yönüne göre, aşağıdaki bileşenlerden en az üçünü içeren bir bileşim sağlanmıştır: *Radix Astragali* (Membranöz Milkvetch veya Huang Qi'nin kökü), *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae*

(Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan Shen), Radix Paeoniae Rubrası (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lagtiflora Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao) (Chuan Xiong), radix angelicae sinensis (Çin Angelica veya Dang Gui kökü), Kartaç Tinctorius (Aspir veya HongHua çiçeği), Prunus Persica (Şeftali çekirdeği veya Taoren), Radix Polygalae (thinleaf milkwort, Polygala tenuifolia kökü) Willd., Polygala sibirica L. veya Yuanzhi) ve Rhizoma acori Tatarinowii (ot yapraklı tatlı kurbağası veya Şichangpu köksapı), önceden belirlenmiş kişilerde veya inme veya nörodejenerasyon riski altındaki deneklerde inme veya nörodejenerasyonun etkilerini azaltmak için bir yöntemde kullanılır.

Bazı yapılanmalarda, bileşim ayrıca bir veya daha fazlasını içerir: Buthus martensii (kurutulmuş akrep ya da Quanxie gövdesi), Eupolyphaga Seu Setelephaga (kuru toprak böceği gövdesi, Eupolyphaga sinensis Walker, Steleophaga plancyi ya da Tubiechong) (Antilop Boynuzu veya Lingyangjiao) ve kurutulmuş sülük gövdesi (Hirudo, Whitmania pigra Whitman, Hirudo nipponica Whitman, Whitmania acranulata Whitman veya Shuizhi).

Bazı yapılanmalarda, bileşim bileşenlerin 3 ila 14'ünü içerir. Bazı yapılanmalarda, bileşim bileşenlerden 4'ünü içerir. Bazı yapılanmalarda, bileşim bileşenlerden 9'unu içerir.

Bazı yapılanmalarda, bileşim ayrıca Batı tıbbında kullanılan bir madde içerir. Bazı yapılanmalarda, bileşim ve Batı tıbbı insanlara ilaç olarak verilmek üzere, sırayla veya ayrı ayrı olarak verilise uygundur.

Bazı yapılanmalarda, bileşim aşağıdaki bileşenleri içerir: Ligusticum Chuanxiong (Chuan Xiong) köksapı, radix angelicae sinensis kökü (Çince Angelica veya Dang Gui Radix Astragali kökü (Membranöz Milkvetch kökü veya Huang Qi kökü), Radix et Salviae Miltiorrhizae (Red Sage) kök veya Dan Shen), Radix Paeoniae Rubra (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lactiflora Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao), Kartaç Tinctorius Çiçeği (Aspir veya

HongHua), Prunus Persica (Şeftali çekirdeği veya Taoren), Radix Polygalae İnce yapraklı süt suyunun kökü, Polygala tenuifolia Willd., Polygala sibirica L. veya Yuanzhi) ve Rhizoma acori Tatarinowii (çimen yaprağı tatlı kanola veya Schangpu köksapı).

- 5 Bazı yapılanmalarda, bileşim aşağıdaki bileşenleri içerir: Ligusticum Chuanxiong (Chuan Xiong) köksapı, radix angelicae sinensis (Çin Angelica veya Dang Gui'nin kökü), Radix Astragali (Membranous Milkvetch veya Huang Qi'nin kökü), Radix et Salviae Miltiorrhizae (Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan Shen), Radix
- 10 Paeoniae Rubra (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lactiflora Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao), Kartaç Tinctorius'un Çiçeği (Aspir veya HongHua), Prunus Persica (Şeftali Tohumu veya Taoren), Radix Polygalae (İnce Yapraklı Siska Milkwort, Polygala tenuifolia Willd., Polygala sibirica L. veya Yuanzhi), Rhizoma
- 15 Taizarizani (RW) çimen yaprağı tatlı kurbağası veya Shichangpu), Buthus martensii (kuru akrep veya Quanxie gövdesi), Eupolyphaga Seu Setelephaga (öğütülmüş böceğin kurutulmuş gövdesi, Eupolyphaga sinensis Walker, Steleophaga plancyi veya Tubiechong), Calculus Bovis Art veya Acac İnek Niuhuang), Cornu
- 20 Saigae Tataricae (Antilop Boynuzu veya Lingyangjiao) ve sülüklerin kurutulmuş gövdesi (Hirudo, Whitmania pigra Whitman, Hirudo nipponica Whitman, Whitmania acranulata Whitman veya Shuizhi).

25 TERİMLER SÖZLÜĞÜ

Bu bölüm, aşağıda belirtilen kelimelerin ve cümlelerin yorumlanmasında rehberlik etmeyi amaçlamaktadır (ve uygun olan yerlerde gramer değişkenleri).

- 30 Tarifnamede "nöronal genişleme" terimi, aksonların ve dendritlerin genel yönlü dışa doğru büyümesiyle ilgilidir. Sinir oluşumu veya gelişiminde nöronal büyüme önemlidir.

Aksi belirtilmediği sürece, "içeren" ve "içerir" terimlerinin ve bunların gramer değişkenlerinin, "açık" veya "kapsayıcı" bir dili temsil etmesi amaçlanmıştır; böylece anılan unsurları içerir ancak aynı zamanda ilave, benzeri olmayan unsurların dahil edilmesine de izin verir.

Burada kullanıldığı gibi, sayısal bir değerle ilişkili olarak kullanıldığı şekliyle "yaklaşık" terimi, örneğin, sayısal değer $\%+ 50$ 'si veya $\%+30$ 'u, tercihen $\%+ 20$ 'si, daha tercihen $\%+ 10$ 'u, daha tercihen hala $+5$ 'i ifade eder ve en çok tercih edilen durumda $\%+ 1$ 'dir. "Yaklaşık" terimi gerekli görüldüğü takdirde buluşun tanımından çıkartılabilir.

"Tedavi" terimi, bir hastalığın durumunu veya semptomlarını gideren, hastalığın oluşumunu önleyen veya herhangi bir şekilde herhangi bir şekilde hastalığın veya diğer istenmeyen semptomların ilerlemesini önleyen, engelleyen, geciktiren veya tersine çeviren her türlü kullanımı kapsar. Dolayısıyla, "tedavi" profilaktik ve terapötik tedaviyi içerir.

Bu açıklama boyunca, bazı yapılanmalar bir aralık formatında açıklanabilir. Aralık içinde yapılan açıklamanın yalnızca kolaylık sağlanmasına ve konunun kısa tutulmasına yönelik olduğu ve buluş kapsamına dayalı olarak esnek olmayan sınırlama olarak yorumlanmaması gerektiği anlaşılmalıdır. Buna göre, bir aralığın açıklamasının söz konusu aralığın mümkün olan tüm alt aralıklarını ve ayrıca söz konusu aralıktaki münferit nümerik değerleri spesifik olarak açıkladığı değerlendirilmelidir. Örneğin 1 ila 6 gibi bir aralığa ilişkin açıklamanın, spesifik olarak 1 ila 3, 1 ila 4, 1 ila 5, 2 ila 4, 2 ila 6, 3 ila 6 gibi alt aralıkları ve söz konusu aralıkta bulunan 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 gibi münferit rakamları içerdiği anlaşılmalıdır. Bu, aralık genişliğinden bağımsız olarak geçerlidir.

DETAYLI AÇIKLAMA

Mevcut açıklama, aşağıdaki bileşenlerden en az üçünü içeren bir bileşimin kullanımını sağlar: Radix Astragali (Membranöz Milkvetch veya Huang Qi'nin kökü), Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae (Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan Shen), Radix Paeoniae Rubrası (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lagtiflora Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao) (Chuan Xiong), radix angelicae sinensis (Çin Angelica veya Dang Gui kökü), Kartaç Tinctorius (Aspir veya HongHua çiçeği), Prunus Persica (Şeftali çekirdeği veya Taoren), Radix Polygalae (thinleaf milkwort, Polygala tenuifolia kökü) Willd., Polygala sibirica L. veya Yuanzhi) ve Rhizoma acori Tatarinowii (ot yapraklı tatlı kurbağası veya Şichangpu köksapı), önceden belirlenmiş kişilerde veya inme veya nörodejenerasyon riski altındaki deneklerde inme veya nörodejenerasyonun etkilerini azaltmak için bir yöntemde kullanılır.

Bileşim ayrıca Buthus martensii (kurutulmuş akrep veya Quanxie gövdesi), kurutulmuş sülük gövdesi (Hirudo, Whitmania pigra Whitman, Hirudo nipponica Whitman, Whitmania acranulata Whitman veya Shuulihi), Eupolyphaga Seu, Seteleophaga (kurutulmuş zemin tozu, Eupolyphaga sinensis Walker, Steleophaga plancyi veya Tubiechong), Calculus Bovis Artifactus (Doğal veya Yapay inek-bezoar veya Rengong Niuhuang) ve Cornu Saigae Tataricae'dan oluşan gruptan seçilen bir bileşeni içerebilir (Antilop Boynuzu veya Lingyangjiao).

Bileşim, bileşenlerin en az 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 veya 14'ünü içerebilir.

İlaç, aşağıdaki hastalıklardan herhangi birine sahip hastalarda meydana gelebilecek yaralı veya hastalıklı dokularda nöronal büyümeyi ve nöronların veya kök hücrelerin çoğalmasını teşvik edebilir: amyotrofik lateral skleroz (ALS), beyin apsesi, beyin iskemisi, diyabetle ilişkili beyin atrofisi, beyin otosomalisi subkortikal enfarktüs ve lökoensefalopati (KHDASIL) dominant

arteriyopati, serebrovasküler bozukluklar, kortiko-bazal ganglionik dejenerasyon (CBGD), kronik iskemi, Creutzfeldt-Jakob Sendromu, Dandy-Walker Sendromu, Duchenne Muskuler Distrofi, Dine-Sinon Demans Diye Sendromu, Duchenne Musküler Distrofi
5 AIDS), ensefalomiyelit, esansiyel tremor, friedreich ataksi, gerstmann straussler-scheinker hastalığı, Huntington hastalığı, hidrosefali, hipoksi, ölümcül ailesel uykusuzluk, geçici iskemik atak, kuru, Landau-Kleffner Sendromu, Lewy vücut hastalığı, Machado-Joseph hastalığı viral menenjit, migren bozuklukları,
10 miyelit, olivopotocerebellar atr ofiyoller, pantotenat kinaz ile ilişkili nörodejenerasyon, poliomyelit, postpoliomyelit sendromu, prion hastalıkları, psödötümör serebri, utangaç drager sendromu, infantil spazmlar, progresif supranuclear palsi, Steinert hastalığı, syringomyelia, talamik tansiyon, Tic.bozuklukları,
15 Tourette sendromu ve Uveomeningoensefalitik sendrom.
Bileşim ayrıca, anksiyete bozuklukları, şizofreni, depresyon ve doğum sonrası depresyon, doğal yaşlanma, travmatik beyin hücresi ölümü ve amnezi, sırt ağrısı, vertigo, bilinç kaybı, hayalet bacak, koku alma bozuklukları, boyun ağrısı, baş ağrısı, migren,
20 spazm ve konuşma bozuklukları gibi diğer nörolojik belirtiler gibi psikiyatrik endikasyonlar grubundan seçilen bir durumu olan hastaları tedavi etmek için kullanılabilir. Bileşim, önceden belirlenmiş deneklerden veya inme veya nörodejenerasyon riski taşıyan deneklerden inme veya nörodejenerasyonun etkisini
25 azaltabilir. Nörodejenerasyon, Alzheimer hastalığı, amyotrofik lateral skleroz (ALS), beyin apsesi, beyin iskemisi, diyabetle ilişkili beyin atrofisi, subkortikal infarktlı serebral otozomal dominant arteriyopati, serebral arter, serebral arter, serebral arter, serebral arter hastalığı, serebral, hastalığın neden
30 olduğu hastalıklardan kaynaklanabilir kortikobazal ganglionik dejenerasyon (CBGD), kronik iskemi, Creutzfeldt-Jakob Sendromu, Dandy-Walker Sendromu, Duchenne Muskuler Distrofi, senil demans,

Kazanılmış İmmün Yetmezlik sendromu (AIDS), ensefalomiyelit, esansiyel tremor gürnürre begner serseri sineği , Huntington hastalığı, hidrosefali, hipoksi, ölümcül ailesel uykusuzluk, geçici iskemik atak, kuru, Landau-Kleffner Sendromu, Lewy vücut hastalığı, Machado-Joseph hastalığı, bakteriyel ve viral menenjit, migren hastalıkları, miyelit, olivopotocerebellar atrofi, pantoenatin , Parkinson hastalığı, polio miyelit, postpolio miyelit sendromu, prion hastalıkları, psödotümör serebri, shy drager sendromu, Steinert hastalığı, infantil spazmlar, progresif supranükleer palsi, siringomiyelya, talamik hastalıklar, Tic. hastalıkları, Tourette sendromu, Uveomeningoensefalik sendromu ve diğer deneklerde global ve fokal iskemi ve kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle oluşabilir.

NeuroAid™ veya NeuroAid™ benzeri bir bileşimin (örneğin aşağıda tarif edilen bir bileşim), isteğe bağlı olarak, nöronların genel iyiliği için veya çeşitli sinir sistemi hastalıklarının ve diğer dejeneratif hastalıkların tedavisi için faydalı olabilecek mevcut tamamlayıcı ajanlarla kombinasyon halinde kullanılması öngörülmektedir. Ek ajanlar vitaminler, mineral takviyeleri, bitkisel takviyeler, balık yağları ve Batı tıbbi olabilir. Tipik olarak, NeuroAid™ veya NeuroAid™ benzeri bileşim ile kombinasyon halinde kullanılan ilave ajan, NeuroAid™ veya NeuroAid™ benzeri bileşimden farklı bir mekanizmayı hedefleyen bir ajandır. Örneğin, Batı tıbbi dejeneratif hastalıkları olan hastalarda iyileşme potansiyelinin iyileştirilmesinde tipik olarak kullanılan büyüme faktörleri olabilir. Batı tıbbında kullanılan uygun ajan örnekleri arasında Kalsiyum Kanal Blokerleri (D-600, Diltiazem, Nitrendipin, Ni-modipin, Nifedipin) bulunur. , Flunarizin, Fluspirilen, Isradipirin, Nicardipin, PY 108-068, Verapamil ve Triapamil), Kalsiyum şelatörü (DP-b99), serbest radikal temizleyiciler (Ebselen, Tirilazad, NXY-059), GABA reseptörü agonistleri (Diazepam, NXY-059), Baklofen), AMPA

agonistleri (ZK 200775/MPQX), rekabetçi NMDA antagonistleri (aplikanel/cerestat, CP 101,606, dekstrofan, MK 801/dizosilin, remasemid), glisin bölgesi antagonistleri (GV 150526, ACEA 1021), poliamin bölgesi antagonistler (eliprodil), büyüme faktörleri (bFGF), Sodyum kanal blokerleri (fosfenitoin, 619C89), potasyum kanal açıcı (BMS 204352, cromakalim, levcromakalim, aprikalim, pinasidil, diazoksit, nikrandil, minoksidil, pilatin) illin), gangliositler GM (NMDA antagonisti olmayan), presinaptik glutamat salma inhibitörleri, clazosentan, desmoteplaz, viprin-ex (ancrod), tenekteplaz (TNKase; Metalyse), bazik, siklik nitronlar, TWEAK (TNF benzeri zayıf apoptoz indükleyici) reseptörü, trombolitik tedavileri (ürokinaz, streptokinaz, t-PA / doku plazminojen aktivatörü veya rekombinant ürokinaz), anistreplaz, riluzol, sodyum ve disenton 059), kandesartan, AX-200 (G-CSF, Fligrastim), kafeinol (kafein + etanol), enesadin, mikroplazmin, sonoliz + tPA, V-10153, HTUPA, solulin, piklozotan, S-0139, S-18986, AEOL -10150, AL-208, KN-38-7271, fridoxal 5-fosfat, Neu-2000KL, ONO-2231, PGX-100, RVX-208, SUN-N4057, SUN-N8075, TAT-NR2B9c, GLP-1- Kök hücre tedavisi, Msc-1 (SA-4503, AGY-94806), NH-02D, S-0139 259, doku koruyucu sitokinler (Lu-AA24493), V10153 270 (BB-10153, TAPgen); statinler ve diğer kolesterol düşürücü ilaçlar, eritropoietin, serebrolizin ve CDP-kolin (sitidin-5'-difosfokolin) bulunur.

Açıklama, hücrelerin çoğalmasını veya farklılaşmasını indüklemeye yönelik bir yöntem sunar, adı geçen hücrelerin aşağıdaki bileşenlerden en az birinin etkili bir miktarı ile temas ettirilmesini içerir: Radix Astragali (Membranöz Milkvetch veya Huang Qi'nin kökü), Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae (Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan Shen), Radix Paeoniae Rubrası (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lactiflora Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao) cum Chuanxiong (Chuan Xiong), radix angelicae sinensis (Çin Anjelika veya Dang Gui kökü), Carthamus

Tinctorius'un Çiçeği (Aspir veya HongHua), Prunus Persica (Şeftali çekirdeği veya Taoren), Radix Polygalae (ince yapraklı milkwort, Polygala tenu Willa, Polygala sibirica L. veya Yuanzhi), Buthus martensii (akrep veya Quaxie kurutulmuş gövdesi), Rhizoma acori Tatarinowii (ot yaprağı tatlı küfesi veya köksapı köksapı), sülüklerin kurutulmuş gövdesi (Hirudo, Whitmania pigra Whitman, Hirudo nipu, pika) Whitmania acranulata Whitman veya Shuhihi, Eupolyphaga Seu Seteleophaga (kurutulmuş zemin tozu, Eupolyphaga sinensis Walker, Steeophaga plancyi veya Tubiechong), Calculus Bovis Artefaktus (Doğal veya Yapay inek-bezoar veya Rengong Niuu ng) ve Cornu Saigae Tataricae (Antilop Boynuzu veya Lingyangjiao).

Bileşim, hücre büyümesini teşvik edebilir veya hücre sağkalımı, doku mühendisliği veya ex vivo terapötik kullanımlar için kullanılabilecek çeşitli hücrelerin in vitro kültürünü kolaylaştırabilir. Kültürlenmiş hücreleri alan hastaya, NeuroAid™ ile de uygulanabilir.

NeuroAid™ ve benzeri bileşimler

Yukarıda ortaya konan bileşenler, bileşim içinde nispeten ham bir formda (örneğin işlenmemiş veya ezilmiş otlar) veya daha rafine bir formda (örneğin saflaştırılmış özütler) bulunabilir.

Bazı durumlarda, Moleac Pte Ltd'den NeuroAid™ kullanılır. NeuroAid™, 9 bitkisel bileşen ve 5 hayvansal bileşen içeren kapsül şeklinde bir CMT ürünüdür. NeuroAid™ Radix Astragali (Membranöz Milkvetch veya Huang Qi'nin kökü), Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae (Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan Shen), Radix Paeoniae Rubrası (Kırmızı Şakayık kökü, Paeonia lactiflora Pall, Paeonia veitchii Lynch veya Chi Shao) cum Chuanxiong (Chuan Xiong), radix angelicae sinensis (Çin Angelica veya Dang Gui'nin kökü), Carthamus Tinctorius'un Çiçeği (Aspir veya HongHua), Prunus Persica (Şeftali çekirdeği veya Taoren), Radix Polygalae (ince yapraklı milkwort, Polygala tenu Willa., Polygala sibirica

- L. veya Yuanzhi), *Buthus martensii* (akrep veya Quanxie kurutulmuş gövdesi), *Buthus martensii* (kurutulmuş akrep veya Quanxie gövdesi), sülüklerin kurutulmuş gövdesi (*Hirudo*, *Whitmania pigra* Whitman, *Hirudo nipponica* Whitman, *Whitmania acranulata* Whitman veya Shuizhi), *Eupolyphaga* Seu *Seteleophaga* (öğütülmüş böceğin gövdesi, *Eupolyphaga* Seu *Seteleophaga plancyi* veya Tubiechong), *Calculus Bovis Artificatus* (Doğal veya Yapay inek-bezoar veya Rengong Niu Huang) ve *Cornu Saigae Tataricae* (Antilop Boynuzu veya Lingyangjiao) içerir.
- Diğer durumlarda NeuroAid II, *Radix Astragali* (Membranöz Milkvetch veya Huang Qi kökü), *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* (Kırmızı Adaçayı kökü veya Dan Shen), *Radix Paeoniae Rubra* (Kırmızı Şakayık kökü, *Paeonia laktiflora* Pall, *Paeonia veitchii* veya Chi) 'den oluşur. Shao), *Ligusticum* Chuanxiong (Chuan Xiong) köksapı, *radix angelicae sinensis* (Çin Angelica veya Dang Gui'nin kökü), *Carthamus Tinctorius* (Aspir veya HongHua) kökü, *Prunus Persica* (Şeftali çekirdeği veya Taoren), *Radix Polygalae* (çiçek tozu) milkwort, *Polygala tenuifolia* Willd., *Polygala sibirica* L. veya Yuanzhi) ve *Rhizoma acori Tatarinowii* (çimen yaprağı tatlı küfür veya Şichangpu köksapı) .NeuroAid ™, farklı ülkelerde farklı isimler altında tescil edilebilir (örneğin, Güney Afrika'da Strocaid olarak pazarlanmaktadır. ™ veya Danqi Piantan Jiaonang ™) Çin Halk Cumhuriyeti'nde Tianjin Shitian Pharmaceutical Group Co., Ltd'den (Jianwenin Sanayi Bölgesi, Wangwen Zhuang şehri, Xiqing bölgesi, Tianjin Şehrinde, Çin; Posta Kodu 300381;)) üretilmekte ve ticari olarak satılmaktadır. Ayrıca, Çin Halk Cumhuriyeti'nin (11 Biopolis Way, Helios # 09-08 Singapore 138667) ana lisansı olan Moleac Pte Ltd'den (daha önce Moleküler Akupunktur Pte Ltd) temin edilebilir.
- Şüpheden kaçınmak için NeuroAid™, Nuronid™'i şu anda pazarlandığı formda NeuroAid™'i içerir ancak aynı zamanda örneğin Tianjin

Shitian Pharmaceutical Group Co., Ltd veya Moleac Pte Ltd tarafından pazarlanabilecek gelecekteki NeuroAid™ formülasyonlarını da içerir. Bu tür gelecekteki formülasyonlar, örneğin dozaj miktarlarına veya aktif bileşenlerinin konsantrasyonuna vs. göre değişebilir. NeuroAid™, MLC 601 olarak da bilinir ve "NeuroAid™" ve "MLC 601" terimleri, birbirlerinin yerine kullanılabilir. Benzer şekilde NeuroAid II, MLC 901 olarak da bilinir ve "NeuroAid II" ve "MLC 901" terimleri, birbirlerinin yerine kullanılabilir.

10 Nöro-koruyucular

Nörokoruyucular, çeşitli mekanizmaları kullanarak, nörodejenerasyona olumsuz neden olan hastalıklar sırasında ölme riski altında bulunan nöronal dokuyu koruyan bileşiklerdir. Bazı nöroprotektan ajanlar arasında antioksidanlar (örneğin selenyum, 30 E vitamini, C vitamini, glutatyon, sistein, flavinoidler, kinolinler, enzim; azaltma aktivitesi, vb.), N-metil-D-aspartat Reseptör Antagonistleri (Dekstrofan, Selfotel, Magnezyum), Narkotik Reseptör antagonisti (Nalmefen (Cerven), Ca-kanal blokerleri, Na-kanal modülatörleri (Lubelulu), Alfa-aminobütirik 20 asit agonisti (Clometiazol), glutamat reseptörü modülatörleri, serotonin reseptörü agonistleri (repinotan), fosfolipid kazıyıcı, serbest ağavistleri (repinotan) (Tirilazad ve NXY-059), astrosit aktivasyon inhibitörü (ONO 2506), anti-ICAM-1 (Enlimomab), İnsan anti-lökositik antikoru, Hu23F2G, membran stabilizasyon ajanı 25 CDP-kolin (Citicholine), Fibroblast büyümesi gibi monoklonal antikorlar faktör (Fiblast), doymamış ve çoklu doymamış yağ asitleri, östrojenler ve seçici östrojen reseptörü modülatörleri (SEAMS), progestinler, tiroid hormonu ve tiroid hormonu taklit eden bileşikler, siklosporin A ve türevleri, talidomid e ve 30 türevleri, metilksantinler, Mono-Amin-Oksidaz inhibitörleri (IMAO), serotonin-, noradrenalin ve dopamin alım blokerleri,

dopamin I agonistleri, L-DOPA, nikotin ve türevleri ve NO sentaz modölatörleri bulunur.

Büyüme faktörleri

- 5 Büyüme faktörleri, çeşitli mekanizmaları kullanarak, belirli hücrelerin farklılaşmasını veya çoğalmasını teşvik eden bileşiklerdir. Bazı büyüme faktörleri arasında kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), epidermal büyüme faktörü (EGF), eritropoietin (EPO), fibroblast büyüme faktörü (FGF), granülosit-
- 10 koloni uyarıcı faktör (G-CSF), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-) bulunur. BOS), hepatosit büyüme faktörleri (HGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), myostatin (GDF-8), sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofinler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), trombopoietin (TPO), Dönüşüm büyüme faktörü alfa
- 15 (TGF- α), Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), İnterleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-21, IL-33, M-CSF, Noggin, İnterferonlar (IFN) - α , IFN- β ve IFN- γ bulunmaktadır.

Potasyum kanallarının aktifleştirilmesi için bileşikler TREK-1

- 20 Batı tıbbında kullanılan diğer uygun ajanlar, TREK-1 potasyum kanallarını aktive edebilen bileşikleri içerir. TREK-1'in aktivasyonunun, önceden belirlenmiş deneklerde veya inme veya nörodejenerasyon riski taşıyan deneklerde inme veya nörodejenerasyonun etkilerini azalttığı bulunmuştur. Ek olarak,
- 25 TREK-1'in merkezi veya periferik sinir sisteminin hastalıklı veya yaralanmış dokularına sahip hastaları ve depresyon, psikiyatrik endikasyonları, doğal yaşlanma ve travmatik beyin hücre ölümünden muzdarip hastaları tedavi etmede rol oynadığı gösterilmiştir. NeuroAid®, TREK 1 potasyum kanallarını aktive etmediğinden, TREK-
- 30 1 potasyum kanallarını aktive edebilen bileşikler, inme veya nörodejenerasyonun etkilerini azaltmak ve hasta veya yaralı hastaları tedavi etmek için NeuroAid™ (MLC 601) ile kombinasyon

halinde merkezi veya periferik sinir sisteminin dokuları ve depresyon, psikiyatrik endikasyonlar, doğal yaşlanma ve travmatik beyin hücre ölümünden muzdarip hastalarda kullanılabilir.

TREK-1 potasyum kanallarını aktive edebilen bir bileşiğin bir
5 örneği Poli-doymamış yağ asitleridir (PUFA'lar). Çoklu doymamış yağ asitleri, birden fazla çift bağ içeren yağ asitleridir. PUFA'lar, metilen ile kesilmiş Polenler veya Konjuge yağ asitleri olarak sınıflandırılabilir.

Metilen ile Kesilmiş Polenler, birbirlerinden tek bir metilen
10 grubu ile ayrılan iki veya daha fazla cis çift bağına sahip olan yağ asitleridir. Esansiyel yağ asitlerinin tümü omega-3 ve -6 metilen ile kesilmiş yağ asitleridir. Omega-3 yağ asitlerinin örnekleri sınırlandırma olmaksızın aşağıdakileri içerir: Alfa-linolenik asit (ALA), Stearidonik asit (STD), Eicosatrienoik asit
15 (ETE), Eicosatetraenoik asit (ETA), Eicosapentaenoik asit (EPA), Docosapentaenoik asit, DPA), Docohexaenoik asit (DHA), Tetrakonik asit veya Nisinik asit. Omega-6 yağ asitlerinin örnekleri sınırlandırma olmaksızın aşağıdakileri içerir: Linoleik asit (LIN), Gama-linolenik asit (GLA), Eicosadienoik asit,
20 Dihomo-gama-linolenik asit (DGLA), Arakidonik asit (AA), Docosadienoik asit, Adrenik asit, Docosapentaenoik asit veya Osbond asidi. Omega-9 yağ asitleri ayrıca metilen ile kesilmiş polenlerdir ve tekli doymamış veya çok doymamış olabilir. Omega-9 yağ asitlerinin örnekleri sınırlandırma olmaksızın aşağıdakileri
25 içerir: Oleik asit, Eikozik asit, Mead asit, Erusik asit veya Nervonik asit.

Konjuge yağ asitleri, iki veya daha fazla konjuge çift bağ içeren yağ asitleridir. Konjuge yağ asitlerinin örnekleri sınırlandırma olmaksızın aşağıdakileri içerir: Remenik asit, a-Calendic asit,
30 β -Calendic asit, Jacarik asit, a- Eleostearik asit, β -Eleostearik asit, Katalik asit, Punicic asit, Rumelenik asit, α -Parinarik asit, β -Parinarik asit, Bosseopentaenoik asit.

Metilen ile kesilmiş Polyenes veya Konjuge yağ olarak düzenlenmemiş diğer bazı PUFA'lar sınırlama olmaksızın şunları içerir: Pinolenik asit ve podokarpik asit.

TREK-1 potasyum kanallarını aktive edebilen diğer bileşikler arasında ilaç Riluzol (Rilutek®), Lisofosforitler (LPL'ler), Kafeik Asit esterleri ve Xenon bulunur. Bu bileşikler inme veya nörodejenerasyonun etkilerini azaltmak ve hasta veya yaralı hastaları tedavi etmek için NeuroAid™ (MLC 601) ile kombinasyon halinde merkezi veya periferik sinir sisteminin dokuları ve depresyon, psikiyatrik endikasyonlar, doğal yaşlanma ve travmatik beyin hücre ölümünden muzdarip hastalarda kullanılabilir.

Uygulama Yolları

Bu bileşikler, inme veya nörodejenerasyonun etkilerini azaltmak ve merkezi veya periferik sinir sisteminin hastalıklı veya yaralı dokularına sahip hastaları ve depresyon, psikiyatrik endikasyonları, doğal yaşlanma ve travmatik beyin hücre ölümünden muzdarip hastaları tedavi etmek için NeuroAid™ (MLC 601) ile birlikte kullanılabilir. NeuroAid™ (MLC 601) oral yoldan verildiğinde, günde 3 kez alınan dört 0.4 g kapsül olarak uygulanabilir. Yutma güçlüğü çeken hastalar için, kapsüller açılabilir ve bu şekilde içilebilen veya bir gastrik tüp aracılığıyla enjekte edilebilen suda seyreltilmiş toz olabilir. Bu nedenle, yaklaşık 4.8 g'lık bir günlük doz öngörülmektedir. Bir düzenekte hastanın günlük NeuroAid™ dozu (MLC 601) yaklaşık 1g ila 8g; 2 g ila 8 g; 3g ila 7g; 4 ila 6 g; 4.25g ila 5.75g; 4.5g ila 5.25g; 4.5g ila 5g; 4.6g ila 4.10g; veya 4.7 g ila 4.9 g'dır. Bir "günlük doz", belirli bir günde alınacak tek bir tablet veya kapsül vs. veya çoklu tabletler veya kapsüller vs. olabilir.

NeuroAid™ (MLC 601) tedavisinin her kürü yaklaşık 4 hafta sürebilir. Tipik olarak, en çok arka arkaya 3 kez uygulanır. Hiçbir terapötik uygulama gerekli değildir, ancak birkaç günlük

tedavinin kesilmesinden sonra bile ilave uygulamalar eklenebilir. Dolayısıyla, bir yapılanamda her NeuroAid™ (MLC 601) tedavisi yaklaşık 12 hafta sürer. Başka bir yapılanmada, NeuroAid™'in (MLC 601) tedavi süresi yaklaşık 4 ila 24 hafta; 7 ila 16 hafta; 9 ila 15 hafta; 10 ila 14 hafta; veya 11 ila 13 haftadır.

NeuroAid™ (MLC 601) ayrıca kronik hastalığı ele almak için kronik bir tedavi olarak veya önleyici bir tedbir olarak kullanılabilir. NeuroAid™ (MLC 601), hücre büyümesini destekleyen batı tıbbi ile kombinasyon tedavisinin bir parçası olarak kullanılabilir.

NeuroAid™ 'in (MLC 601) ve hücre büyüme faktörünün kombinasyon ortakları, tek bir formülasyonda mevcut olabilir veya ayrı formülasyonlar halinde mevcut olabilir. Bir yapılanmada sinerjik bir etki olabilir.

Kombinasyon ortakları NeuroAid™ (MLC 601) ve hücre büyüme faktörü hastaya aynı anda (örneğin aynı anda) veya farklı zamanlarda (örneğin sırayla) ve birbirinden ayrı olabilen veya çakışan farklı zaman aralıklarında uygulanabilir.

Kombinasyon ortakları NeuroAid™ (MLC 601) ve hücre büyüme faktörü herhangi bir sırayla uygulanabilir.

Hücre büyüme faktörü kullanıldığında ve uygun uygulama yolu ve doz seviyesi teknikte uzman kişilerce bilinecektir veya teknikte uzman bir kişi tarafından kolayca belirlenebilir. Genellikle, tıp alanında iyi bilindiği gibi, herhangi bir hasta için dozajlar, hastanın büyüklüğü, vücut yüzey alanı, yaşı, uygulanacak özel bileşik, cinsiyet, uygulama zamanı ve yolu, genel sağlık ve aynı anda uygulanan diğer ilaçlar dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Bireysel ihtiyaçlar değişmekle birlikte, her bir bileşenin etkili miktarlarının optimal aralıklarının belirlenmesi, tekniğin uzmanlığı içerisindedir. Dozaj, madde NeuroAid™ (MLC 601) olmadan kullanıldığında uygulananlara benzer olacaktır.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1, NeuroAid™ (MLC 601) tedavisinin, 8., 10. ve 14. günlerde hücre canlılığı üzerindeki doz etkisinin çubuk grafiklerini gösterir. Üç konsantrasyonda NeuroAid™ (MLC 601) (0.1, 0.5, 1.0 µg/ml) kontrol ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 2, NeuroAid™ (MLC 601) tedavisinin 10. ve 14. günde LDH salınımı üzerindeki etkisinin çubuk grafiklerini göstermektedir. 1.0 µg/ml NeuroAid™ (MLC 601) konsantrasyonu kontrol ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 3, NeuroAid™ (MLC 601) tedavisinin, 3. ve 14. günde nöronal DCX ekspresyonu üzerindeki etkisinin konfokal görüntülerini göstermektedir. 1.0 µg/ml NeuroAid™ (MLC 601) konsantrasyonu kontrol ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 4, NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II (MLC 901) işlemlerinin, 8., 10., 12. ve 14. günlerde hücre canlılığı üzerindeki etkisinin çubuk grafiklerini gösterir. 1.0 µg/ml NeuroAid™ (MLC 601) ve 1.0 µg/ml NeuroAid II (MLC 901) konsantrasyonu kontrolle karşılaştırılmıştır.

Şekil 5, NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II (MLC 901) uygulamalarının 8., 10., 12. ve 14. günlerde LDH salınımı üzerindeki etkisinin bir çizgi grafiğini göstermektedir. 1.0 µg/ml NeuroAid™ (MLC 601) ve 1.0 µg/ml NeuroAid II (MLC 901) konsantrasyonu kontrolle karşılaştırılmıştır.

Şekil 6, NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II (MLC 901) işlemlerinin, 3. ve 14. günde DCX ekspresyonu üzerindeki etkisinin konfokal görüntülerini göstermektedir. 1.0 µg/ml NeuroAid™ (MLC 601) ve 1.0 µg/ml NeuroAid II (MLC 901) konsantrasyonu kontrolle karşılaştırılmıştır.

Şekil 7, felce karşı NeuroAid II (MLC 901) tedavileri için deneysel protokollerin şematik diyagramlarını göstermektedir. Şekil 7A, NeuroAid II (MLC 901) tedavisinin etkilerini araştıran

Örnek 4 için deney protokolünü göstermektedir; Şekil 7B, bir akut NeuroAid II (MLC 901) tedavisinin etkilerini araştıran Örnek 5 için deney protokolünü göstermektedir. Her iki çalışma da hayatta kalma oranını değerlendirmiştir ve ayrıca iskemiden 24 saat sonra enfarktüs hacmini belirlemiştir.

Şekil 8, iskemi sonrası 24 saat sonra NeuroAid II (MLC 901) ön işleminden sonra hayatta kalma oranının bir çubuk grafiğini göstermektedir.

Şekil 9, iskemi sonrası 24 saat sonra NeuroAid II (MLC 901) tedavi sonrasındaki hayatta kalma oranının (A) ve enfarktüs hacminin (B) bir çubuk grafiğini göstermektedir.

Şekil 10, NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis tedavilerinin (1 pcg/ml) kombine Rhinoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis işlemlerinin (1 pcg/ml) karşılaştırmalı etkileri üzerine çubuk grafiklerini göstermektedir. Şekil 10A, ilgili tedavilerin hücre canlılığı üzerindeki etkisini gösterir ve Şekil 10B, ilgili tedavilerin LDH salımı üzerindeki etkisini gösterir.

Şekil 11, NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve in vivo iskemik beyin hasarına karşı kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis ile yapılan uygulamanın karşılaştırmalı etkileri üzerine çubuk grafiklerini göstermektedir. Şekil 11A ve Şekil 11B, sırasıyla hayatta kalma oranını (A) ve enfarktüs hacmini (B) göstermektedir.

Şekil 12, in vivo iskemik beyin hasarına karşı NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong ve Radix angelicae sinensis ile ön muamelenin karşılaştırmalı etkileri üzerine çubuk grafiklerini göstermektedir. Şekil 12A ve Şekil 12B, sırasıyla hayatta kalma oranını (A) ve enfarktüs hacmini (B) göstermektedir.

Şekil 13, in vitro DCX immünoeklojik hücrelerde, NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine

Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis tedavisi (1 pg/ml) arasındaki karşılaştırmalı etkilerin tedavinin 12. Gününde temsili epifloresans mikroskopisi fotoğraflarını göstermektedir.

Şekil 14, epifloresans mikroskopisinde gözlemlenen immün boyanmış nöronlardaki DCX sinyal yoğunluğunun çubuk grafiklerini göstermektedir.

Şekil 15, işlemlerin fonksiyonunda toplam nörit uzunluğu (pm) olan epifloresans mikroskopisi üzerinde ölçülerek elde edilen nörit büyümesinin çubuk grafiklerini göstermektedir.

Örnekler

Materyaller

Kortikal örnekleme ortamı:

- HBSS/1

NaCl 8 g/l

H₂O içinde KCl 0.26 g/l MgSO₄ 0.2 g/l CaCl₂ 0.264 g/l NaH₂CO₃ 2.24 g/l NaH₂PO₄ 0.15 g/l in

HBSS +: 6 g glikoz ekleme

Hücre kültürü ortamı

Nörobasal (21103-049; Invitrogen, San Diego, CA)

B27 (n°17504; Invitrogen, San Diego, CA) Uridin (U3003; Sigma, St. Louis, MO, ABD) Floro-deoksi-Uridin (46875; Fluka-Chemika-Bio-chemika, Buchs, İsviçre)

Glutamax (35050; Gibco-BRL Yaşam Teknolojileri). GmbH, Karlsrahe,

Almanya)

Antibiyotikler (Penisilin-streptomisin) (Gibco-BRL Yaşam Teknolojileri). GmbH, Karlsrahe, Almanya)

Hayvanlar

Tüm deneyler, Avrupa Topluluğu mevzuatının laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı ile ilgili politikalara göre yapılmıştır. Yerel Etik Komitesi deneyleri onaylamıştır (NCA/2006/10-1 ve NCA/2006 / 10-2 protokol numaraları). Bu

çalışmada, 22 ila 26 g ağırlığındaki yetişkin erkek C57/B16 fareleri kullanılmıştır. Hayvanlar, ilaç tedavisi veya ameliyattan en az bir hafta önce 12 saatlik karanlık ışık döngüsü, $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve %60 ila %70 nem içeren kontrollü laboratuvar koşullarında bekletilmiştir. Fareler standart kemirgen diyetine ve musluk suyuna serbest erişime sahiptir.

NeuroAid II (MLC 901) içme çözeltisi

Bir kapsül NeuroAid II (MLC 901), bir karıştırıcı ile 37°C 'de bir saat karıştırılarak 66 ml su içinde çözölmüştür. Çözelti daha sonra 0.45 µm filtre ile süzölür.

Intraperitoneal enjeksiyonlar için NeuroAid II (MLC 901) kapsölünden 30 mg olan NeuroAid II (MLC 901), 60 dakika boyunca 37°C 'de 10 mg/ml'lik bir konsantrasyona (Stok çözeltisi) karşılık gelen 3 ml salin çözeltisi içinde seyreltilmiştir.

Deneyde kullanılan konsantrasyon 1 µg/ml'dir (enjeksiyon hacmi: 500 µl). 1 µg/ml'lik bir doz elde etmek için stok çözelti 100 ile seyreltilir. Seyreltme işleminden sonra, karışım iyi bir homojenleştirme elde etmek için vortekslenir ve 0.45 µm filtrede filtre edilir.

Yöntemler

A. KORTİKAL HÜCRE KÜLTÜRÜ

Gebe kalan (E14) C57BI6/J farelerine, izopentan ve ardından servikal dislokasyon uygulanmıştır. Fetusler alınmış ve soğuk (Hanks Balanced Salt Solution) HBSS + çözeltisine yerleştirilmiştir. Serebral korteks soğuk HBSS + çözeltisinde diseke edilmiş ve beyin zarları çıkarılmıştır. Kortikal örnekler küçük parçalar halinde kesilmiş ve 8 ml HBSS + çözeltisi içinde ateşle cilalanmış bir cam Pasteur pipeti ile hafifçe ezilmiştir. Karışım süzölmüş (40 µm filtre) ve 800 rpm'de 8 dakika santriföljenmiştir. Süpernatant çıkarılmış ve topak 2 ml kültür ortamında eritilmiştir. Hücreler, 1×10^6 hücre/duvarlık bir yoğunlukta cam lamelleri (12 mm çap; CML, Nemours, Fransa) olan

Polysine kaplı 12 oyuklu (24 mm ap; Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, Fransa) plakalar üzerine kaplanmıştır. B27, Glutamax ile takviye edilmiş Neurobasal'da nemlendirilmiş % 5 CO2 atmosfer inkübatöründe kültürler 37  C'de tutulmuş, 16 gün sonra deneyler için antibiyotikler kullanılmıştır. Glial büyüme, kültürün ikinci günü boyunca 5- Floro-2-deoksiüridin (2  M) ve Uridin (2  M) eklenerek bastırılmıştır.

B. NEUROAID   (MLC 601) TEDAVİSİ

Bir NeuroAid   (MLC 601) kapslnden 30 mg, 60 dakika süreyle 37 C'de 10 mg/ml'lik bir konsantrasyona (Stok zltisi) karşılık gelen 3 ml Neurobasal ortam içinde seyreltilmiştir. Deneylerde test edilen konsantrasyonlar: 1  g/ml veya 10 g/ml kültür ortamı. Her 24 mm'lik hazne plakasına 1 ml NeuroAid   (MLC 601) zltisi konmuştur.

1  g/ml'lik bir doz elde etmek için stok zlti 100 kez seyreltilmiştir: 0.1mg/ml (24 mm hazne/ml başına 10  I, 1 g/hazneye karşılık gelir).

10  g/ml'lik bir doz elde etmek için stok zlti 10 kez seyreltilmiştir: 1 mg/ml (24 mm hazne/ml başına 10  I, 10  g/hazneye karşılık gelir).

znme işleminden sonra, karışım homojenizasyon için iyi bir homojenleşme elde etmek üzere vortekslenmiş ve 0.45  m filtrede filtre edilmiştir.

Hücreler her gün kültürün 1. Gününden itibaren NeuroAid  (MLC 601), NeuroAid II (MLC 901) veya Neurobasal ortamı ile muamele edilmiştir.

C. LAKTAT DEHİDROJENİZ (LDH) ÖLÇÜMLERİ

Nöronal yaralanma, hücre kültürü ortamında inkübe edilmiş kltrlenmiş nöronlardan laktik dehidrojenaz (LDH) salınımının ölçümü ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. 1,5, 8,10,12,14 ve 16. günde,100  I hücre kültürü ortamı kültür haznelerinden 96 hazneli plakalara aktarılmış ve LDH tahlil kitine göre 100

reaksiyon çözeltisiyle karıştırılmıştır (Roche Diagnostic: Cytotoxicity Detection kit: ref 1644793, Indianapolis, ABD). Optik yoğunluk (OD), bir Labsystem Multiscan mikroparka okuyucusu (Labsystem Multiscan RC, Finlandiya) kullanılarak 492 nm'de 30 dakika sonra ölçülmüştür. 620'deki arkaplan absorbansı çıkarılır. LDH aktivitesi, 25µI orta hacimde mevcut aktivite olarak ifade edilir. Sonuçlar OD x 10³ olarak ifade edilir.

D. Hücre Canlılığı

1, 5, 8, 10, 12, 14 ve 16. günde, hücre kültürü ortamının toplamı çıkarılmış ve yerine 500 µI Nörobasal ortam Hücre Titeri 96 Aqueous One Solution kitiyle değiştirilmiştir: Cell Titer 96 (r) Aqueous One Solution Hücre Proliferasyonu Test Kiti. Nöronal canlılık, Hücre Titresi 96 (r) Sulu Bir Çözelti Hücre Proliferasyon Deneyi (Promega, Madison, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Proliferasyon Test Kiti protokolüne göre, hücreler nemlendirilmiş %5 CO₂ atmosfer inkübatöründe 4 saat 37°C'de inkübe edilir. Reaksiyon, %2 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile durdurulmuştur. Optik yoğunluk, 4 saat sonra bir Labsystem Multiscan mikroparka okuyucusu kullanılarak 490 nm'de ölçülmüştür. 620'deki arkaplan absorbansı çıkarılmıştır. Sonuçlar, canlı hücrelerin sayısını temsil eden OD x 10³ olarak ifade edilmektedir.

Hücre canlılığı ve LDH sonuçlarının istatistiksel analizi, bir faktör (varyans analizi) ANOVA testi ve ardından hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (P <0.05).

E. ÇİFT CORTİN (DCX) YAKITLARDA SINIRLI HÜCRESEL İMMÜNOHİSTOKİMYA

Kortikal hücre, fosfat tamponlu salin (PBS) içinde% 4 paraformaldehit içeren lamellere sabitlenir,% 0.3 polioksietilenensorbitan monolorat (Tween 20, Sigma) içinde 10 dakika geçirgenleştirilir ve oda sıcaklığında 2 saat PBS içinde %2.5 yedek serumu ile bloke edilir. Lameller bir keçi anti-çift-

akortin (DCX) antikoru (1: 200, SC-8066, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) ile gece boyunca %2 yedek serum/PBS içerisinde inkübe edilmiştir. PBS'de 3 yıkamadan sonra lameller, keçi karşıtı Alexa 488-eşleşmiş antikorlarda (FluoProbes, Interchim, Montluçon, Fransa) 2 saat boyunca %2 eşek serumunda inkübe edilmiş ve her biri 5 dakika boyunca üç kez PBS'de yıkanmıştır. Lameller daha sonra Hoechst çözeltisinde (10 ml'de 3;; Sigma-Aldrich Chimie, Saint Quentin Fallavier, Fransa) 10 dakika boyunca hücre çekirdeğini etiketlemek için inkübe edilir. PBS'de 2 yıkamadan ve su içinde 1 yıkamadan sonra lameller kurutulur ve Fluoroprep (75521; BioMerieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile cam slaytlara monte edilir. Epifloresans ve konfokal mikroskopi kullanılarak hücreler gözlenmiştir. Konfokal mikroskopi gözlemleri, bir DMIRBE ters mikroskobu ve her 10nm'de bir argon-kripton lazeri (lazer uyarma 488 nm) ile elde edilen bir argon-kripton lazeri ile donatılmış bir Lazer Tarama Konfokal Mikroskobu (TCS SP, Leica Microsystems Heidelberg GmbH,) kullanılarak gerçekleştirilir. Sinyal özgüllüğü, negatif kontrol lamellerinde, DCX proteinine karşı yönlendirilen primer antikorun çıkarılmasıyla değerlendirilmiştir. Görüntüler, tek transselüler optik bölümler olarak elde edilmiş ve çerçeve başına en az dört taramadan ortalaması alınmıştır. DCX-Alexa-488 antikor etiketlemesinin konfokal görüntüleri daha sonra otofloresans arkaplanının spektral düzeltilmesinden sonra elde edilmiştir.

F. NeuroAid II'nin (MLC 901) C57BI/6 farelerinde etkilerinin araştırılmasında kullanılan fizyolojik parametreler

Genel anestezi %3 izofran ile indüklenmiş ve her bir fare için açık bir yüz maskesi vasıtasıyla %1 izofluran ile korunmuştur. Farelerin kendiliğinden nefes almasına izin verilmiştir.

İskemiden önce, sırasında ve sonrasında ortalama arter kan basıncı (MABP), rektal sıcaklık, arter kan gazları ve pH gibi fizyolojik parametreler için bir grup hayvan (grup başına n = 5)

izlenmiştir. Sağ femoral arter PE-10 polietilen boru ile kateterlenmiş ve sürekli MABP (mm Hg) izlenmesi için bir kan basıncı dönüştürücüsüne (Harvard Apparatus, Massachusetts, ABD) bağlanmıştır. Daha sonra kateterize edilmiş femoral arterden
5 heparinize kan numunesi (75 was) elde edilmiş ve bir Asit Bazlı Laboratuvar sistemi (ABL 555, Radiometer) kullanılarak kan pO₂, pCO₂ ve pH ölçülmüştür. Çekirdek sıcaklığı sürekli olarak bir termometre (3 mm prob çapı; Harvard Apparatus, Massachusetts, ABD) ile izlenmiş, rektuma yerleştirilmiş ve termostatik olarak
10 kontrol edilen bir ısıtma battaniyesi (Harvard Apparatus, Massachusetts, ABD) kullanılarak fizyolojik sıcaklıklarda tutulmuştur. Çekirdek sıcaklığı, homeotermik battaniye kontrolünün bir kombinasyonu ile fizyolojik değerlerde tutulmuştur.

15 G. C57BI/6 farelerinde geçici fokal beyin iskemisinin indüksiyonu

Fokal iske mi, intralüminal filament tekniği kullanılarak sol orta serebral arterin (MCA) tıkanmasıyla indüklenmiştir (Heurteaux ve ark., 2006) Bir orta hat boyun insizyonu yapıldıktan sonra, sol
20 ortak ve dış karotid arterler izole edilmiş ve ipek bir 4-0 ipek dikişle (Ethicon) bağlanmıştır. Geçici kaargil anevrizma klipsi (BMH31, Aesculap, Tuttlingen, Almanya) geçici olarak iç karotid artere yerleştirilmiştir. Uçta açık bir ateşle körelmiş bir 6-0 kaplı filament (Doccol, Redlands, CA, ABD), ortak bir karotid
25 artere küçük bir kesiden ve orjin kökünün tıkanması için MCA karotid bifurkasyona 13 mm distalden sokulmuştur.

Hayvanlar bir saat 37 °C'de tutulduktan sonra, MCA bölgesinin tekrar akmasına izin vermek için iplik dikkatlice çekilmiştir. MCAO şiddetini kontrol etmek için bölgesel CBF (rCBF), iskemik
30 korteks (4 mm arkadan ve 6 mm lateral) üzerindeki sağlam kafatasına sabitlenmiş master probuna esnek bir 0.5 mm fiber optik uzatma kullanılarak lazer-Doppler akış ölçer (Perimed) ile

belirlenmiştir. MCA'yı tıkmak için ilerlemeden ipliği ortak karotid artere sokmak sureti ile ameliyat yapılmıştır. Hayvanların, kafese geri dönmeden önce bir ısıtma yastığı üzerinde tam bilinci kazanmalarına izin verilmiştir.

5 H. Enfarktüs hacminin belirlenmesi

Akut NeuroAid II (MLC 901) tedavi sonrası çalışmada (Örnek 5) enfarktüs hacmini değerlendirmek için, fareler reperfüzyondan 24 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Beyinleri çıkarıldı ve bir doku kıyıcı (Phymep, Fransa) kullanılarak altı 1 mm kalınlığında koronal dilime bölünmüştür. Koronal beyin dilimleri, karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika süreyle hemen % 2 2, 3, 5-Trifeniltetrazolyum klorür (TTC, Sigma, Fransa) içine batırılmış, daha sonra daha önce tarif edildiği gibi bir gece önce %4 paraformaldehit çözeltisine sabitlenmiştir (Ding-Zhou ve ark., 2002). Her bölümde bir bilgisayar görüntü analiz sistemi kullanılarak ölçülen striatal ve kortikal enfarktüs alanları ölçülmüş ve Golanov ve Reis'e göre beyin ödemi için düzeltilmiştir (Golanov and Reis, 1995). Mm3 olarak ifade edilen enfarktüs hacmi, düzeltilmiş lezyon alanlarının doğrusal bir entegrasyonu ile hesaplanmıştır.

Ek olarak, kresil menekşe, iskemik farelerde enfarktüs hacminin gelişimini doğrulamak için, uygulanabilir nöronların stellate somyasındaki Nissl gövdelerini lekeleyen bir boya kullanılmıştır. Beyin koronal donmuş bölümleri (10 µm-kalınlık) 3 dakika boyunca %0.25 asetik asit içinde %1 kresil menekşe solüsyonuna eklenmiş, durulanmış, kurutulmuş ve Enlan ile monte edilmiştir. Kesitler ışık mikroskobu altında analiz edilmiştir.

Örnek 1

NeuroAid [™] 'in (MLC 601) dozunun hücre canlılığı ve LDH salımı üzerindeki etkisi Yukarıda açıklanan usullerle hazırlanan Cortical hücreleri, dört NeuroAid[™] konsantrasyonuna (MLC 601) maruz bırakılmıştır: Kültürün 1. Gününden kadar 14. Güne kadar

0.1.0.5.1.0.10/g/ml. Hücre canlılığı 8, 10 ve 14. Günlerde yukarıda açıklanan yöntemlerle çalışılmış ve sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir.

NeuroAid™ (MLC 601) tedavisinin, kültürde zaman içinde kortikal hücrelerin nörodejenerasyonuna karşı etkisi, LDH salımı ile de analiz edilmiştir. Hücre ölümüne yol açan hücre acısının artması, LDH salınımının artmasıyla ilişkilidir. LDH salımı, yukarıda açıklanan yöntemlerle 10. ve 14. günde ölçülmüş ve sonuçlar, Şekil 2'de gösterilmiştir.

10 Bulgular

Şekil 1, 14. günde, 1 ug/ml konsantrasyonda bir NeuroAid™ (MLC 601) tedavisinin, nöronal sağkalımda kontrolle karşılaştırıldığında (** $P < 0.01$) önemli bir artışa (%35) neden olduğunu göstermektedir. 10. Güne kadar, NeuroAid™ (MLC 601) konsantrasyonlarında 0.1-0.5-1.0 pg/ml ile işlenen hücrelerde hücre canlılığı yüzdelerinde kontrol ($P > 0.05$) (n = deney grubu başına 10 hazne) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark yoktu. Şekil 2, 1/g/ml NeuroAid™ (MLC 601) konsantrasyonlarında 10. ve 14. Günlerde LDH salınımının/hücre canlılığının oranını göstermektedir. Kontrole kıyasla NeuroAid™ (MLC 601) tedavisi, 10 ve 14 günlük kültürden sonra LDH salımını önemli ölçüde azaltmıştır ($P < 0.01$) (deney grubu başına $n = 10$ hazne).

Örnek 1'deki deneysel verilere dayanarak, kültürdeki kortikal hücrelerde NeuroAid™ (MLC 601) ile yapılan tedavinin, hücre yaşayabilirliğinin bir artışını ve hücre sıkıntısının bir belirteci olan LDH salınımının azaldığını gösterdiği gösterilebilir. Örnek 1 ayrıca, NeuroAid™ 'in (MLC 601), merkezi ya da periferik sinir sistemlerinin hastalıklı ya da yaralanmış dokularına sahip hastaları tedavi etmek için, önceden belirlenmiş kişilerde ya da inme ya da nörodejenerasyon riski altındaki sujelerde inme ya da nörodejenerasyon etkisini azaltmak için veya

bir hücre kültürü reaktifi olarak kullanım için kullanılabileceğini göstermektedir.

Örnek 2

NeuroAid™ 'in (MLC 601) nöronal proliferasyon/nörojenez üzerindeki etkisi DCX, gelişmekte olan CNS'nin tüm göç eden öncüllerinde ve yetişkin beyinde sürekli nörojenez alanlarında özellikle eksprese edilen, oldukça hidrofilik bir mikrotubule bağlı bir proteindir. Nöronal proliferasyon, kültürde kortikal hücrelerde DCX ekspresyonundan yukarıda açıklanan yöntemlerle analiz edilmiştir. Yukarıda açıklanan yöntemlerle hazırlanan kortikal hücreler, kültürün 1. Gününden 14. Gününe kadar 1 g/ml NeuroAid™ (MLC 601) ile muamele edilmiştir. Hücreler daha sonra hazırlandı ve DCX ekspresyonunu belirlemek için yukarıdaki yöntemlerde tarif edildiği gibi epifloresans ve konfokal mikroskopisi kullanılarak gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil 3'de gösterilmiştir.

Bulgular

Şekil 3'te, DCX'e karşı bir antikora boyama, 3. Günde, DCX ifadesinde kontrol ve kortikal hücreler arasında 1 ug/ml NeuroAid™ (MLC 601) ile muamele edilmiş bir fark olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, 14. Günde, kontrolde DCX immünoreaktivitesi kaybolurken, NeuroAid™ (MLC 601) işlemiyle indüklenen DCX ifadesinde bir artış olmuş ve bu da önemli bir aksonal ve dendritik ağın gelişimini vurgulamıştır.

Nörojenik süreçlerle ilişkisi nedeniyle, DCX proteini şu anda nörojenez için bir marker olarak kullanılmaktadır. DCX, ekspresyonu fetal ve yetişkin beyindeki tüm göçmen nöronal öncülleriyle ilişkili olan mikrotubule bağlı bir proteindir. DCX, kortikal nöronların normal gelişimsel göçü için önemli gibi görünmektedir, çünkü insanlarda DCX'deki mutasyonlar, bu nöronların göçmen tutuklanması ile karakterize ve klinik olarak subkortikal laminar heterotopias, mental retardasyon ve nöbetler

ile ortaya çıkan sendromlara yol açmaktadır. DCX ayrıca yetişkin beynindeki bazı olgun nöronlarda da ifade edilir, burada aksonal büyüme ve sinaptogenezde yer alır.

Böylece, Örnek 2'nin deneysel verilerine dayanarak, NeuroAid™ (MLC 601) ile tedavinin kortikal hücrelerde DCX ekspresyonunda bir artışa yol açtığı gösterilebilir, bu da NeuroAid™ (MLC 601) ile tedavinin, nörolojik fonksiyonu (motor ve bilişsel gibi) geri yüklemek için gerekli olan nöroproliferasyonu, nörogenezi ve nöroferezi geliştirdiğini kuvvetle ortaya koyar. Örnek 2 ayrıca, NeuroAid™ 'in (MLC 601), merkezi veya periferik sinir sistemlerinin dokularındaki nöronal büyümeyi ve çoğalmasını teşvik etmek, hücre büyümesini teşvik etmek ve hücre sağkalımını, büyümesini, çoğalmasını veya büyümesini veya NeuroAid™ (MLC 601) kullanılarak hücrelerin farklılaşmasını teşvik etmek amacıyla bir yöntem için kullanılabileceğini gösterir.

Örnek 3

NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II (MLC 901) işlemlerinin hücre canlılığı, LDH salınımı ve nöronal proliferasyon üzerindeki etkisi Kortikal hücreler 1 µg / ml NeuroAid™ (MLC 601) veya NeuroAid II (MLC 901) konsantrasyonuna 1. Günden 14. Güne kadar maruz bırakılmıştır. 1 µg/ml'lik bu konsantrasyon, yukarıda anlatıldığı gibi hücre canlılığı ve LDH salınması üzerinde elde edilen en iyi sonuçlara karşılık gelir. Hücre canlılığı 8, 10, 12 ve 14. Günlerde çalışılmıştır. Zaman içindeki nöronal proliferasyon, 1 µg/ml NeuroAid™ (MLC 601) veya NeuroAid II (MLC 901) ile muamele edilen kültürdeki kortikal hücrelerde DCX ekspresyonunu gözlemleyerek analiz edilmiştir.

Bulgular

Şekil 4, 8. günde, 1/g/ml NeuroAid™ (MLC 601) ile veya NeuroAid II (MLC 901) ile muamele edilen kortikal hücrelerde nötral canlılıkta ilgili kontrole (** P<0.01; *** P<0.001) göre anlamlı bir artış gözlemlendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, her iki

tedavinin de en yüksek etkinliği 14. günde gözlemlendi ve hücrelerin hayatta kalması ~% 45 artmıştır (***) $P < 0.001$). Kültürün farklı aşamalarında (deney grubu başına $n = 10$ hazne) NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II (MLC 901) arasında anlamlı bir fark yoktur.

5 Şekil 5, NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II (MLC 901) muamelelerinin, Gündüz 8, 10, 12 ve 14'teki LDH salınım /hücre canlılığı oranı ile 1 ug/ml konsantrasyonlarındaki karşılaştırmasını göstermektedir. Kontrole kıyasla her iki tedavi de, 12 ve 14 günlük kültürden sonra LDH salınımı önemli ölçüde azaltmıştır (* $P < 0.05$ ve *** $P < 0.001$) (deney grubu başına $n = 10$ hazne). NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II (MLC 901) tedavileri arasında LDH salınımı açısından anlamlı bir farklılık yoktur.

Şekil 6, kontrole kıyasla, 1 ug/ml NeuroAid™ (MLC 601) veya 15 NeuroAid II (MLC 901) ile muamele edilen kortikal hücrelerin kültürde 3. Günden daha yoğun bir aksonal ve dendritik ağ geliştirdiğini göstermektedir. 14. günde, DCX immünoreaktivitesi, Kontrol'de kaybolmuş ve DCX proteininin etiketlenmesi, NeuroAid™ (MLC 601) ile işlenen kortikal hücreler ve NeuroAid II (MLC 901) 20 ile tedavi edilen kortikal hücreler arasında farklılaşmıştır. DCX proteini, NeuroAid™ (MLC 601) veya NeuroAid II (MLC 901) ile işlenen kortikal hücrelerin işlemlerinde her zaman eksprese edilmiştir. Bununla birlikte, NeuroAid II (MLC 901) ile tedavi edilen kortikal hücrelerde, bu hücrelerin sitoplazmasında da DCX 25 immünoreaktivitesinde güçlü bir artış olduğu ortaya çıkmıştır.

Hem NeuroAid™ (MLC 601) işlemleriyle (NeuroAid™ (MLC 601) hem de NeuroAid II (MLC 901)) elde edilen sonuçlar, hücrenin hayatta kalmasında, LDH salgısında bir artış ve kortikal hücrelerde DCX ekspresyonunda bir artış olduğunu göstermektedir. NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II (MLC 901) sonuçları arasında anlamlı fark 30 yoktur. Bu nedenle, deneysel verilere dayanarak, hem NeuroAid™ (MLC 601) işlemlerinin (NeuroAid™ (MLC 601) hem de NeuroAid II

(MLC 901)) nöroproliferasyon, nörogenez ve nöroörezi geliştirdiği ve nörolojik hastalıklar ve sinir sistemi yaralanmaları için gelişmiş bir tedavi şekli olabileceği gösterilmiştir.

Yukarıdaki deneysel sonuçlar ayrıca, her nöronal kültür türünün

- 5 bağlanabilirliğinin ve hayatta kalmasının iyileştirilmesi için NeuroAid™ (MLC 601) ve NeuroAid II'nin (MLC 901) özütlerinin kullanımını da destekler. Bu ekstreler, canlılığı, dendritik büyümeyi ve sinaptogenezi önemli ölçüde iyileştirmek için nöronal kültürler için klasik kültür ortamına sistematik olarak
- 10 eklenebilir. Örnek 3 ayrıca (NeuroAid™ (MLC601) ve NeuroAid II'nin (MLC 901), merkezi veya periferik sinir sistemlerinin dokularındaki nöronların nöron büyümesini ve çoğalmasını teşvik etmek için, bir durumdaki hastaların tedavisinde hücre büyümesini teşvik etmek için depresyon, psikiyatrik endikasyonlar, doğal
- 15 yaşlanma ve travmatik beyin hücre ölümlü grubundan seçilen, inme veya nörodejenerasyon riski olan deneklerde veya inme veya nörodejenerasyon riski olan deneklerde, hastalıklı veya yaralı dokuları olan hastaların tedavisinde promotin hücre büyümesinin etkisini azaltan merkezi veya periferik sinir sistemleri, bir
- 20 hücre kültürü reaktif olarak kullanım için ve hücrelerin hayatta kalmasını, büyümesini, çoğalmasını veya farklılaşmasını indüklemeye yönelik bir yöntem için kullanılır.

Örnek 4

- İskemi sonrası 24 saat sonra farelerde NeuroAid II (MLC 901) ön
- 25 işleminin etkisi Bu çalışmada, fareler (n = 11) altı hafta boyunca bir NeuroAid II (MLC 901) içme çözeltisi ile ön işleme tabi tutulmuş ve hayatta kalma oranı 24 saat iskemi sonrası analiz edilmiştir (Şekil 7A). Kontrol fareleri (n = 10) bir musluk suyu içme çözeltisi almıştır.

- 30 NeuroAid II'nin (MLC 901) ön muamelesinin iskemiye maruz bırakılan farelerin hayatta kalma oranını arttırıp arttırmadığını belirlemek için, hayvanlar iskemi indüksiyonundan altı hafta önce

NeuroAid II (MLC 901) ile tedavi edilmiştir. Şekil 8, içekte verilen altı haftalık bir NeuroAid II (MLC 901) ön işleminin, kontrol farelerine kıyasla NeuroAid II (MLC 901) ile tedavi edilen hayvanların ölüm oranlarında güçlü bir düşüşe neden olduğunu göstermektedir. NeuroAid II (MLC 901) altı hafta boyunca ön muamele, kontrol grubunda %40.0'a kıyasla %90.9 hayatta kalma oranına neden olmuştur.

Örnek 4, NeuroAid'in bir iskemik inmeden önce faydalı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar, NeuroAid'in iskemik farelerin enfarktüs boyutunu ve mortalite oranını klinik olarak alakalı bir inme modelinde avantajlı bir şekilde azalttığını göstermektedir.

Örnek 5

Iskemiden 24 saat sonra farelerde tedavi sonrası akut NeuroAid II'nin (MLC 901) etkisi Bu çalışmada, farelere (n = 10), başlangıcında verilen, akut tedavi sonrası intraperitoneal NeuroAid II (MLC 901) enjeksiyonu iske mi sonrası ve reperfüzyondan 6 saat sonra uygulanmıştır. Kontrol farelerine (n=10) salin çözeltisi enjekte edilmiştir. Hayatta kalma oranı ve enfarktüs hacimleri, 24 saat reperfüzyonda ölçülmüştür.

Akut NeuroAid II (MLC 901) uygulamasının iskemik inmeye karşı koruduğunu belirlemek için farelere (n=10) iskemiye tabi tutuldu ve tek doz 1 mg/ml NeuroAid II (MLC 901) çözeltisi ile iske mi başlangıcı ve reperfüzyondan 6 saat sonra ağızdan enjekte edilmiştir. NeuroAid II'nin (MLC 901) akut uygulaması, kontrol farelerinde gözlenen %38.8'e kıyasla %90.0 hayatta kalma oranını indüklemiştir (Şekil 9A). Bu NeuroAid II (MLC 901) tedavi sonrası, Şekil 9B'de gösterildiği gibi şiddetli bir şekilde beyin enfarktüsünü azaltmıştır. Tedavi sonrası NeuroAid, inme hacmini kontrol farelerine kıyasla %47,4 (P <0,001) azaltmıştır.

Bu çalışmalar, NeuroAid'in iskemik inmeden önce ve sonra faydalı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar, NeuroAid'in iskemik

farelerin enfarktüs boyutunu ve mortalite oranını klinik olarak alakalı bir inme modelinde avantajlı bir şekilde azalttığını göstermektedir.

Örnek 6 ila 8 için yöntemler

5 A. KORTİKAL HÜCRE KÜLTÜRÜ

Gebe kalan (E14) C57BI6/J farelerine, izopentan ve ardından servikal dislokasyon uygulanmıştır. Fetuslar alınmış ve soğuk (Hanks Balanced Salt Solution) HBSS + çözeltisine yerleştirilmiştir. Serebral korteks soğuk HBSS + çözeltisinde diseke edilmiş ve beyin zarları çıkarılmıştır. Kortikal örnekler küçük parçalar halinde kesilmiş ve 8 ml HBSS + çözeltisi içinde ateşle cilalanmış bir cam Pasteur pipeti ile hafifçe ezilmiştir. Karışım süzölmüş (40 µM filtre) ve 800 rpm'de 8 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant çıkarılmış ve topak 2 ml kültür ortamında eritilmiştir. Hücreler, 1 x 10⁶ hücre/duvarlık bir yoğunlukta cam lamelleri (12 mm çap; CML, Nemours, Fransa) olan Polysine kaplı 12 oyuklu (24 mm çap; Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, Fransa) plakalar üzerine kaplanmıştır. B27, Glutamax ile takviye edilmiş Neurobasal'da nemlendirilmiş % 5 CO₂ atmosfer inkübatöründe kültürler 37 °C'de tutulmuş, 16 gün sonra deneyler için antibiyotikler kullanılmıştır. Glial büyüme, kültürün ikinci günü boyunca 5- Floro-2-deoksiüridin (2 µM) ve Uridin (2 µM) eklenerek bastırılmıştır.

Deneyler, tedavi durumunu bilmeyen bir araştırmacı tarafından izlenmiştir (n = 3 kültür, deney grubu başına 36 hazne).

B. HÜCRE YARALANMA TESTİ HÜCRE YAŞAM VE LAKTİF DEHİDROJENASE (LDH) ÖLÇÜMLERİ

Hücre canlılığı, Hücre Titresi 96 (r) Sulu Bir Çözelti Hücre Proliferasyon Deneyi (Promega, Charbonnières-les-Bains, Fransa) (n = 3 kültür, deney grubu başına 36 hazne) kullanılarak Hücre Kültürünün 12. Gününde değerlendirilmiştir. Deney, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfffenil)-

2H-tetrazolyum iç tuzu (MTS), bir mitokondriyal aktivite belirteci ve bir elektron birleştirme reaktifi (fenazin etosülfat, PES). kullanımına dayanan bir kolorimetrik yöntemdir. MTS tetrazolyum bileşiği hücreler tarafından doku kültürü ortamında çözünür olan renkli bir formazan ürününe indirgenmiştir.

12. günde, hücre kültürü ortamının toplamı çıkarılmış ve yerine 500 Ne Nörobasal ortam + Hücre Titeri 96 Aqueous One Solution kiti kullanılmıştır: Cell Titer 96 (r) Aqueous One Solution Hücre Proliferasyonu Test Kiti. Proliferasyon Test Kiti protokolüne göre, hücreler nemlendirilmiş %5 CO₂ atmosfer inkübatöründe 4 saat 37°C'de inkübe edilir. Reaksiyon, %2 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile durdurulmuştur. Optik yoğunluk, 4 saat sonra bir Labsystem Multiscan mikropilaka okuyucu (Labsystem Multiscan RC, VWR International, Fontenay sous Bois, Fransa) kullanılarak 490 nm'de ölçülmüştür. 620'deki arkaplan absorbansı çıkarılmıştır. Sonuçlar, canlı hücrelerin sayısını temsil eden Optik Yoğunlukta (OD x 10⁻³) ifade edilmiştir.

Veriler, muamele edilen numunelerin absorbans değerinin her bir grup içindeki muamele edilmemiş kontrolünkiyle bölünmesiyle hesaplanan hücre canlılığının yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

Nöronal yaralanma, hücre kültürü medyasında 12. günde hücre kültürü içinde kuluçkalanmış kültürlenmiş nöronlardan laktik dehidrojenaz (LDH) salınımının ölçümü ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Koh ve Choi, 1987). LDH salma deneyi, sitoplazmik membran bütünlüğünün bir ölçüsünü sağlamıştır. 12. günde, 100 µl hücre kültürü ortamı kültür haznelerinden 96 hazneli plakalara aktarılmış ve LDH tahlil kitine göre 100 reaksiyon çözeltisiyle karıştırılmıştır (Roche Diagnostic: Cytotoxicity Detection kit: ref 1644793, Indianapolis, ABD). Optik yoğunluk (OD), 30 dakika sonra bir Labsystem Multiscan mikropilaka okuyucu (Labsystem Multiscan RC, VWR International,

Fontenay sous Bois, Fransa) kullanılarak 492 nm'de ölçülmüştür. 620'deki arkaplan absorbanı çıkarılır. Lizis çözeltisine maruz kalan nöronlar (%0.1 Triton X-100 içeren PBS) pozitif kontrol olarak kullanılmış ve %100 LDH salımı olarak belirlenmiştir.

5 Veriler, LDH akış/hücre canlılığının oranı olarak ifade edilmiştir.

Sonuçlar, üç kopya tespiti ile üç bağımsız deneyin ortalamasına karşılık gelmiştir. Hücre canlılığı ve LDH sonuçlarının istatistiksel analizi, bir faktör (varyans analizi) ANOVA testi ve ardından hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir (P <0.05).

C. FOKAL İSKEMİ

İskemik ameliyatı gerçekleştiren ve enfarktüs hacimlerini ölçen araştırmacılar, tedavi kodu ile ilgili olarak çift körleştirilmiştir.

15 Fokal Iskemi Modeli Fokal iskemi, yetişkin erkek C57/B16 farelerinde, 22 ila 26 g ağırlığında (7-9 haftalık), sol orta serebral arterin (MCA) bir intralüminal filaman tekniği (Huang ve ark.1994) kullanılarak tıkanmasıyla indüklenmiştir. Sol ortak ve dış karotid arterler izole edilmiş ve ipek 4-0 ipek dikişle
20 (Ethicon) bağlanmıştır. Geçici kaargil anevrizma klipsi (BMH31, Aesculap, Tuttlingen, Almanya) geçici olarak iç karotid artere yerleştirilmiştir. 6-0 kaplı bir filament (Doccol, Redlands, CA, ABD), ortak bir karotid artere küçük bir kesik yoluyla ve MCA'nın kökeninin tıkanması için karotid bifurkasyonunun 13 mm distalinde
25 sokulmuştur. Hayvanlar bir saat 37 °C'de tutulduktan sonra, MCA bölgesinin tekrar akmasına izin vermek için iplik dikkatlice çekilmiştir. MCAO şiddetini kontrol etmek için bölgesel CBF (rCBF), iskemik korteks (4 mm arkadan ve 6 mm lateral) üzerindeki sağlam kafatasına sabitlenmiş master probuna esnek bir 0.5 mm
30 fiber optik uzatma kullanılarak lazer-Doppler akış ölçer (Perimed) ile belirlenmiştir. MCA'yı tıkamak için ilerlemeden ipliği ortak karotid artere sokmak sureti ile ameliyat

yapılmıştır. Hayvanların, kafese geri dönmeden önce bir ısıtma yastığı üzerinde tam bilinci kazanmalarına izin verilmiştir.

İnfarkt hacminin belirlenmesi

- Reperfüzyondan 30 saat sonra, koronal donmuş beyin bölümlerinde
- 5 (10 pm-kalınlığında) kresil menekşe boyama, %0.25 asetik asit içinde %1 kresil menekşe çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve Entellan ile bağlanmıştır. Her bölümde bir bilgisayar görüntü analiz sistemi kullanılarak ölçülen striatal ve kortikal enfarktüs alanları ölçülmüş ve Golanov ve Reis'e göre beyin ödemi
- 10 için düzeltilmiştir (Golanov and Reis, 1995). Mm3 olarak ifade edilen infarkt hacmi, daha önce tarif edildiği gibi düzeltilmiş lezyon alanlarının doğrusal bir entegrasyonu ile hesaplanmıştır (Heurteaux ve ark., 2006a).

D. İLAÇ TEDAVİLERİ

- 15 Kullanılan NeuroAid II (MLC 901) bileşimi (kapsül başına 0.4 g) aşağıdaki gibidir:

0.57 g Radix astragali,
0.114 g Radix salvia miltiorrhizae,
0.114 g Radix paeoniae rubra,
20 0.114 g Rhizoma chuanxiong,
0.114 g Radix angelicae sinensis,
0.114 g Carthamus tinctorius,
0.114 g Prunus persica,
0.114 g Radix polygalae,
25 0.114 g Rhizoma acori tatarinowii,
0.0665 Hirudo.

- İn vitro deneyler için, NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis ile yapılan hücre tedavisi,
- 30 12 gün boyunca kültürün 3. Gününden itibaren 1 ug/ml konsantrasyonda idi (15 günlük kültüre karşılık gelir).

İşlem sonrası in vivo için, farelere peritoneal olarak tuzlu su içinde seyreltilmiş 2 mg/ml NeuroAid II (MLC 901) çözeltisi, 25 g, 3 ağırlığındaki toplam 500 UL/fare hacminde ve iskemi sonunu takip eden 24 saatte salin içinde seyreltilmiş olarak enjekte edilmiştir. İn vivo ön işlem için, NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis ön işleminde, içme suyunda 6 mg/ml konsantrasyonda iskemi indüksiyonundan 6 hafta önce içme suyu verilmiştir.

10 E. KÜLTÜRDEKİ KORTİKAL NÖRONLARDA İMMÜNOHİSTOKİMYA

Kortikal hücre, PBS içinde% 4 paraformaldehit içeren lamellere sabitlenir, %0.3 polioksietilenensorbitan monolurat (Tween 20, Sigma) içinde 10 dakika geçirgenleştirilir ve oda sıcaklığında 2 saat PBS içinde %2.5 yedek serumu ile bloke edilir. Hücreler, gece boyunca %2 yedek serum/fosfat tampon tuzlu su içinde bir keçi anti-doublecortin (DCX) antikoru (1: 200, SC-8066, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) ile inkübe edilmiştir (Heur-teaux ve ark. , 2006b). PBS'de 3 yıkamadan sonra hücreler, keçi karşıtı Alexa 488-eşleşmiş antikorlarda (FluoProbes, Interchim, Montluçon, Fransa) 2 saat boyunca %2 eşek serumunda inkübe edilmiş ve her biri 5 dakika boyunca üç kez PBS'de yıkanmıştır. Nöronlar daha sonra Hoechst çözeltisinde (10 ml'de 3;; Sigma-Aldrich Chimie, Saint Quentin Fallavier, Fransa) 10 dakika boyunca hücre çekirdeğini etiketlemek için inkübe edilir. PBS'de 2 yıkamadan ve su içinde 1 yıkamadan sonra lameller kurutulmuş ve Fluoroprep (75521; BioMerieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile cam slaytlara monte edilmiştir. Epifloresans mikroskopi kullanılarak hücreler gözlenmiştir.

Sinyal özgüllüğü, negatif kontrol lamellerinde, primer antikorun çıkarılmasıyla değerlendirilmiştir. Protein etiketlemenin epifloresan mikroskop görüntüleri, otofloresan arkaplanının spektral olarak düzeltilmesinden sonra aynı ekspresyon süresiyle

yakalanmıştır. Kültürdeki kortikal nöronların farklılaşmış nöritleri, tedavinin 12. gününde immün boyama ile DCX ile gözlenmiştir. Nörit büyümesi, bir hücre fotoğraf görüntüsü ve Nörit Tracer Image J yazılımı kullanılarak farklı muamele zamanlarında kültür yemeklerinde toplam nörit uzunluğu ölçülerek epifloresan mikroskopi üzerinde belirlenmiştir (Pool ve ark., 2008).

F. İstatistiksel Analizler

Veriler ortalama $\pm$ S.E.M olarak açıklanmıştır. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel analizi, eşleştirilmemiş t test cihazı ANOVA kullanılarak yapılmıştır. F oranlarının anlamlı olduğu yerlerde istatistiksel analizler genişletilmiş ve Tukey testi çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak post-hoc karşılaştırmalar yapılmıştır. Tüm analizlerde, anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

Örnek 6

NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong / Radixangelicae sinensis ile hücre yaşayabilirliği ve LDH salgılanması Kortikal hücrelerin arasındaki karşılaştırmalı etkiler yukarıda açıklanan usullerle hazırlanan şekilde 1 lg/ml konsantrasyonuna 12 gün boyunca NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis veya kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis maruz bırakılmıştır.

NeuroAid II'nin (MLC 901) Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis veya kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis tedavilerine olan etkileri kortikal hücrelerin nörodejenerasyonuna karşı kültürün 15. Gününde (tedavinin 12. günü) yukarıdaki yöntemlerde açıklandığı gibi hücre canlılığı ve LDH ölçümleri. Sonuçlar Şekil 10'da gösterilmiştir.

Bulgular

Şekil 10A, 1 ug/ml konsantrasyonunda, üç tedavinin nöronal canlılıkta kontrole kıyasla anlamlı bir artışa neden olduğunu göstermektedir (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001). Ancak NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong veya Radix angelicae sinensis tedavilerine kıyasla hücre sağkalımı üzerinde daha yüksek bir etkinlik göstermiştir. Şekil 10A'da gösterildiği gibi, bir NeuroAid II (MLC 901) muamelesi, kontrol ile karşılaştırıldığında yaklaşık %51 hücre artışı sağlamıştır (*** p <0.001), buna karşın Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis sırasıyla %37,%29.5 ve %35 idi. NeuroAid II (MLC 901) ile Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis tedavileri arasında anlamlı bir etkinlik farkı vardı (# P <0.1) (n = grup başına 36 hazne)

15 Hücre ölümüne yol açan hücre sıkıntısının artmasının Lactate Dehidrojenaz (LDH) salınımının artması ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Şekil 10B, kontrole kıyasla, üç tedavinin 12 günlük tedaviden sonra LDH salınımını/hücre canlılığını oranını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (* P <0.05 ve ** P <0.01). Şekil 10B ayrıca, NeuroAid II'nin (MLC 901) Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis tedavisi veya kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis ile karşılaştırıldığında LDH salınımı önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (grup başına n = 36 hazne).

25 Örnek 6'daki deneysel verilere dayanarak, NeuroAid II'nin (MLC 901) hücre canlılığını arttırmada ve LDH salınımını azaltmada kültürde Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis veya kombine Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis'ten daha güçlü olduğu gösterilebilir.

30 Örnek 7

NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong/Radixangelicaesinensis'in

in vivo iskemik beyin hasarına karşı karşılaştırmalı in vivo etkileri

Tedavi sonrası: NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong / Radix angelicae sinensis'in in vivo etkilerini karşılaştırmak için, her bir muamele bir fokal iske mi fare modelinde test edilmiştir.

İske mi, geçici orta serebral arter tıkanması (MCAO) ile 60 dakika boyunca uyarılmıştır (Huang ve ark., 1994). Farelere (n = 12) fokal iske mi ve 3 saat sonra intraperitoneal olarak enjekte edildi ve MCAO'dan sonra 24 saat sonra 1 ug NeuroAid II (MLC901), Rhizoma chuanxiong, Radixangelicae sinensis veya kombine Rhizoma chuanxiong/Radixangelicae sinensis veya kombine Rhizomachuanxiongionelicae sinangis sinonis çözeltisi uygulanmıştır.

Her tedavinin akut uygulaması, NeuroAid II (MLC 901) ile elde edilen daha iyi bir verimle, önemli bir hayatta kalma oranını indüklemiştir. Şekil 11A, sırasıyla iskemik vehikül-, rizom-chuanxiong-, radix angelicae- birleştirilmiş Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae ile muamele edilmiş sinensis farelerindeki %58.5, %64, %73 ve %75'lik bir hayatta kalma oranına kıyasla NeuroAid II (MLC 901) ile %89'luk bir hayatta kalma oranının elde edildiğini göstermektedir.

Şekil 11B'de gösterildiği gibi beyin infarktının şiddetli bir şekilde düşmesi, en iyi sonucun NeuroAid II (MLC 901) ile gözlendiğini doğrulamaktadır. Şekil 11B, NeuroAid II'nin (MLC 901), iskemiden 30 saat sonra kontrol edilen iskemik farelere kıyasla inme hacmini %48.4 (P <0.001) azalttığını göstermektedir. Rhizoma chuanxiong-, radix angelicae ile muamele edilmiş ve kombine edilmiş Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis farelerinde enfarktüs boyutu 30 saatlik reperfüzyondan sonra NeuroAid II (MLC 901) ile tedavi edilen hayvanlardan anlamlı

derecede daha büyüktür (Şekil 11B, # P <0.05, P <0.001, NeuroAid II (MLC 901) grubuna karşı).

Tedavi öncesi: İnmeye karşı korunmada MLC 901, Rhizoma chuanxiong ve Radix angelicae sinensis arasındaki in vivo etkilerin potansiyelini karşılaştırmak için her tedavi öncesi test edilmiştir.

Hayvanlar (n = 12), iskemi indüksiyonundan 6 hafta önce içme suyunda (6 mg/ml) tatbik edilen NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong veya Radix angelicae sinensis ile muamele edilmiştir.

Vehikül ve NeuroAid II (MLC 901) ile tedavi edilen gruplar arasında yiyecek ve içecek çözeltisi tüketiminde anlamlı bir fark yoktur. Şekil 12A, NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong ve Radix angelicae sinensis'in 6 haftalık bir ön muamelesinin, kontrol iskemik farelere kıyasla tedavi edilen hayvanların ölümünde bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

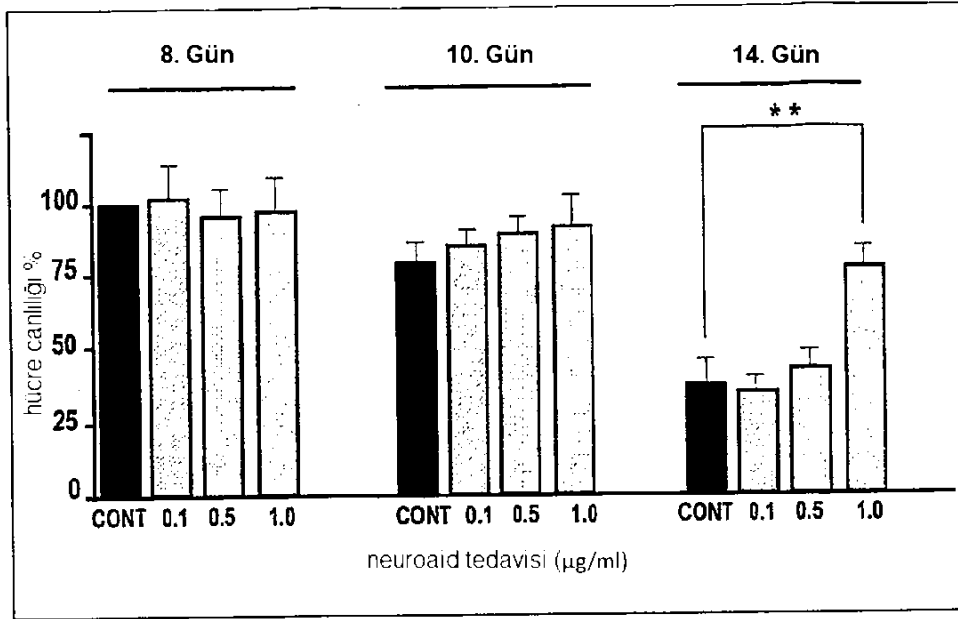
Ön muamele, kontrol grubunda %70.5 ile karşılaştırıldığında NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong ve Radix angelicae sinensis'te %92, %78 ve %70'lik bir hayatta kalma oranını sağlamıştır. İnme veya nörodejenerasyonun, önceden belirlenmiş deneklerde veya inme veya nörodejenerasyon riskindeki deneklerde etkilerini azaltmak için en iyi sonuç. NeuroAid II (MLC 901), infarkt hacmindeki belirgin bir azalma ile teyit edilmiştir; bu, Rhizoma chuanxiong ve Radix angelicae sinensis ile karşılaştırıldığında %39 ve %24.5 daha az önemlidir (Şekil 3B, P <0.01).

Örnek 7'deki bu çalışmalar, NeuroAid II'nin (MLC 901), fokal iskemi öncesi Rhizoma chuanxiong veya Radix angelicae sinensis'ten daha güçlü olduğunu ve NeuroAid II'nin (MLC 901) Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis veya fokal iskemi sonrası tedavide Rhizoma chuanxiong/Radix angelicae sinensis birleşiklerinden daha güçlü olduğunu göstermiştir.

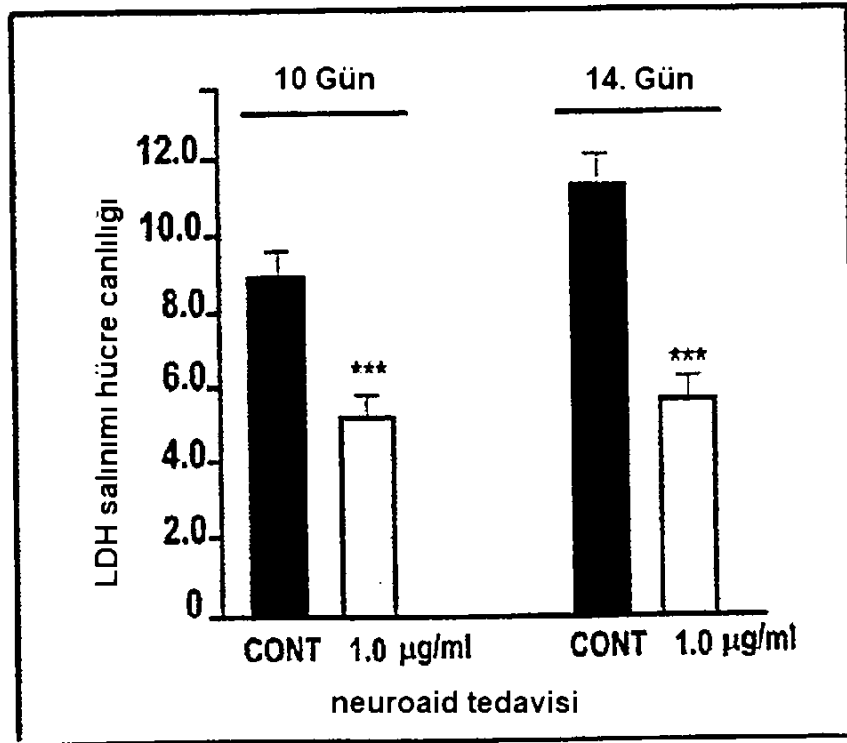
Örnek 8

NeuroAid II (MLC 901), Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis ve kombine Rhizoma chuanxiong/Radixangelicae sinensis'in nöroproliferasyon ve nörit büyümesi üzerindeki karşılaştırmalı etkileri

- 5 Açıklanan yöntemler, sinir sistemi hasarlarını ve nörolojik hastalıkları tedavi etmek için, hasarlı veya hastalıklı sinirlerin tekrar işlev görmesini sağlamak üzere nöral büyümeyi teşvik ederek rejeneratif tedaviler sunmaktadır. Açıklanan yöntemler, in vitro hücre büyümesini teşvik etmek için de
- 10 kullanılabilir. Avantajlı olarak, çeşitli hücrelerin in vitro kültürü, doku mühendisliği veya ex vivo terapötik kullanımlar için kullanılabilir.



Şekil 1

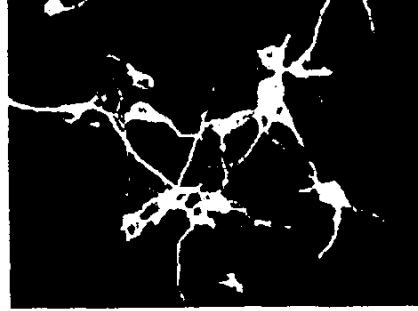


Şekil 2

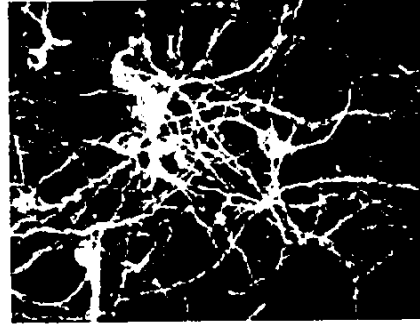
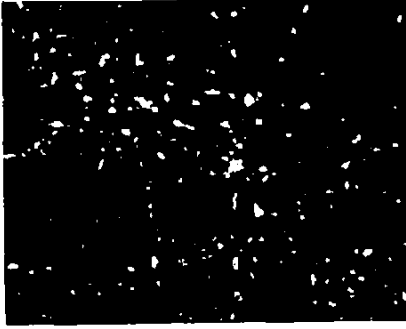
EPIFLORESANS
MİKROSKOP

Kontrol

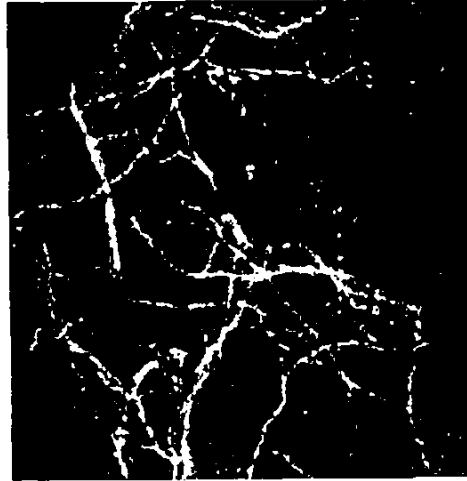
Nueroaid 1µg/ml



3. Gün



14. Gün

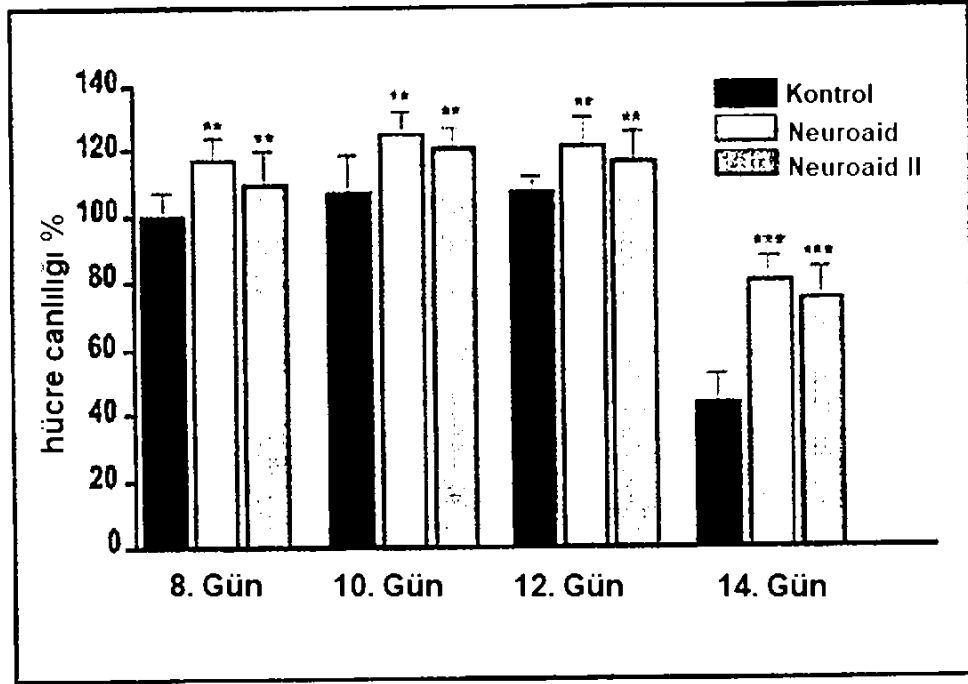


Eşodaklı Mikroskop

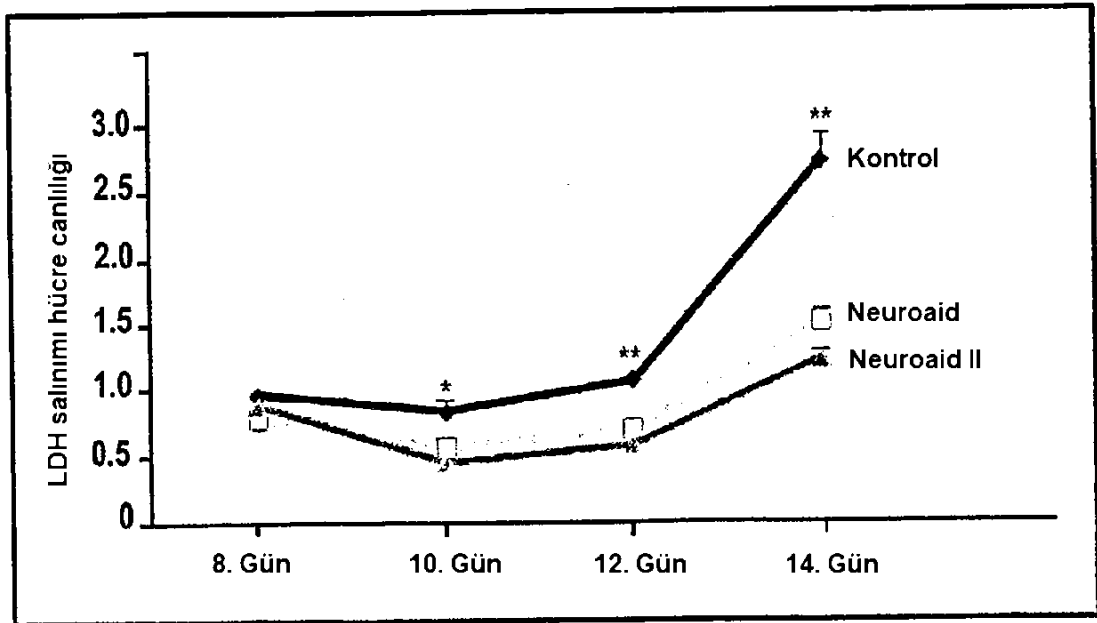
14. Gün

Nueroaid 1µg/ml

Şekil 3

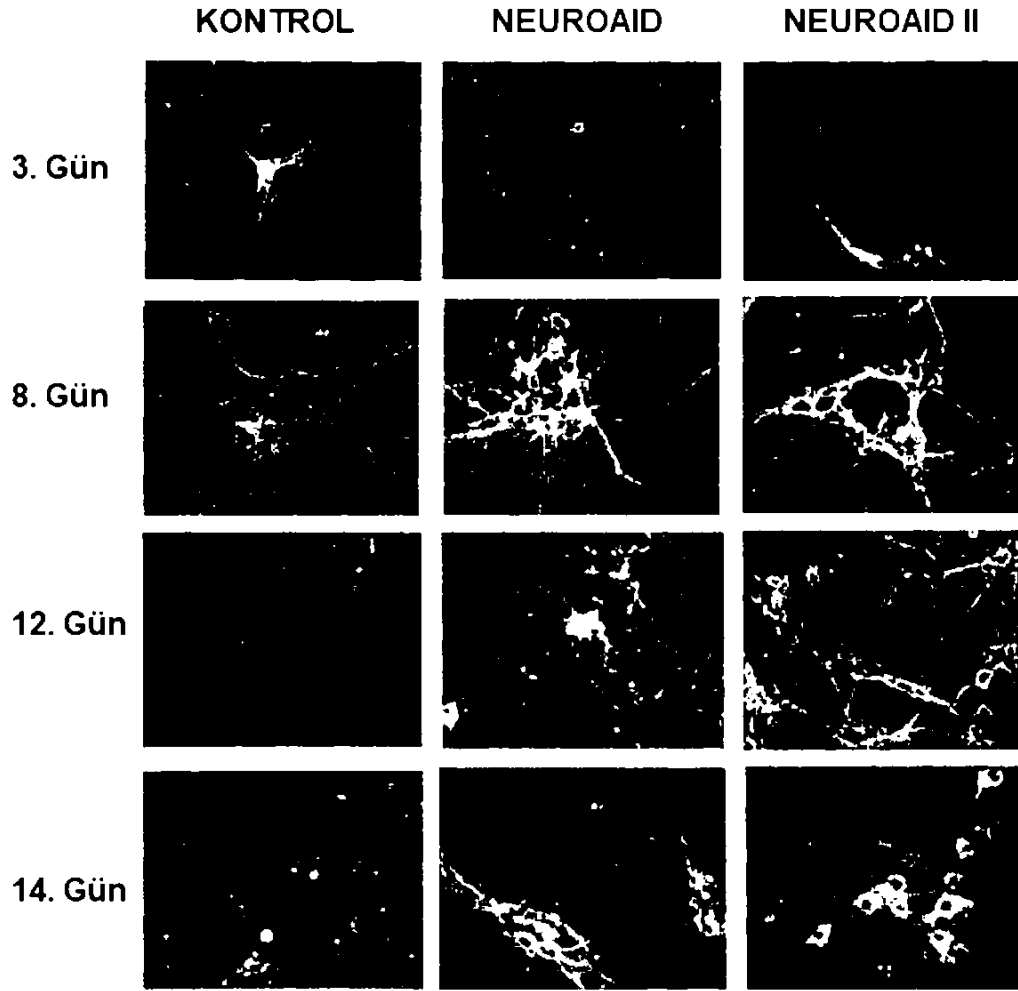


Şekil 4

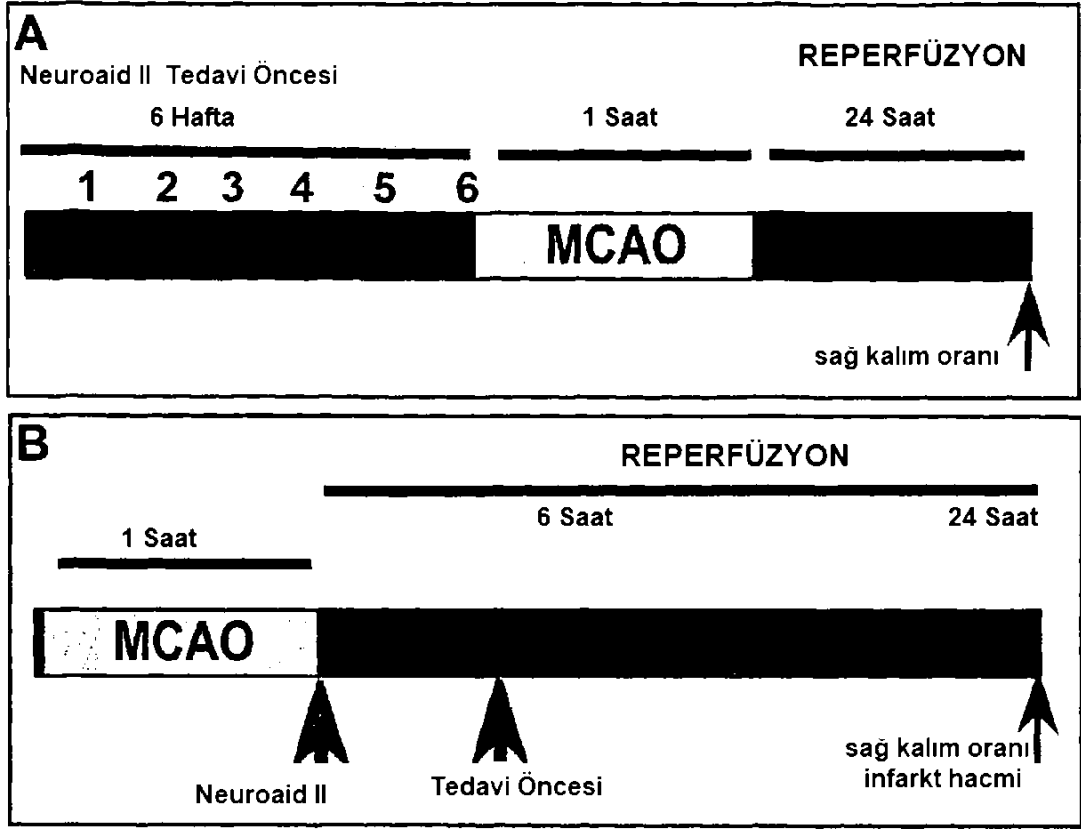


Şekil 5

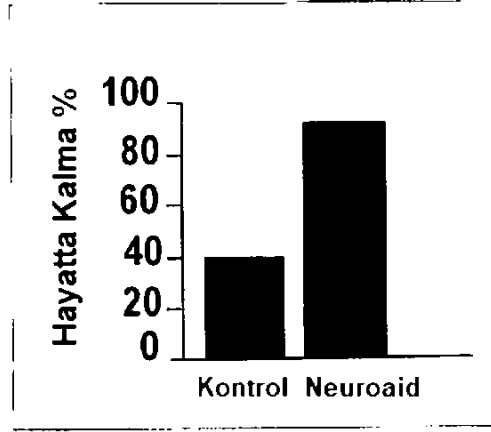
EPIFLORESANS MİKROSKOP



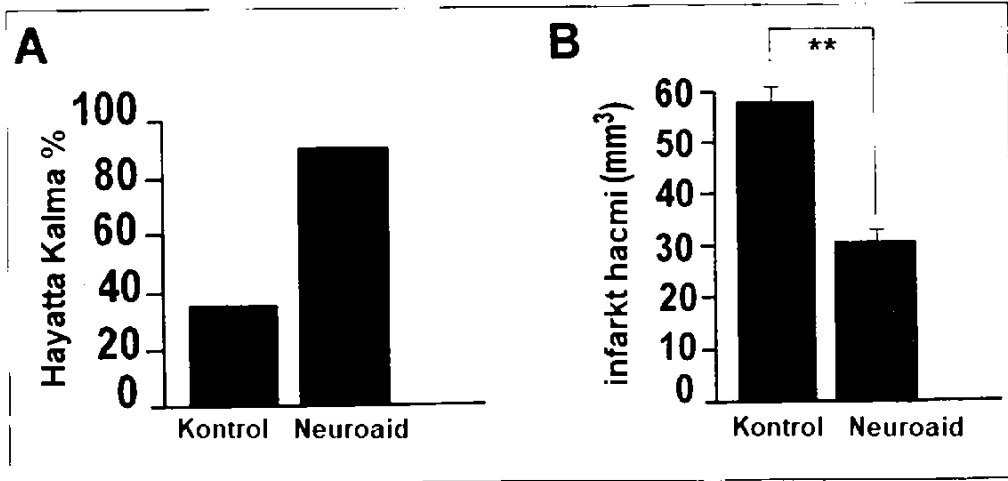
Şekil 6



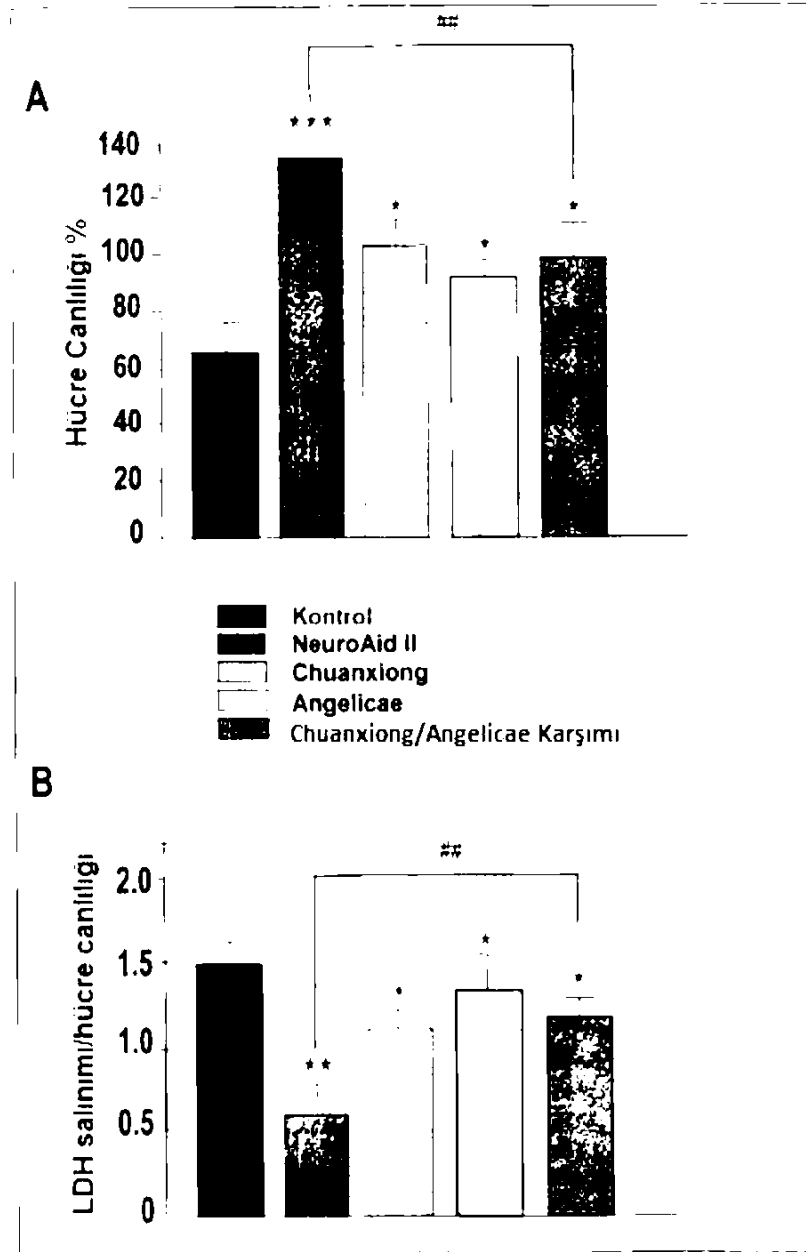
Şekil 7



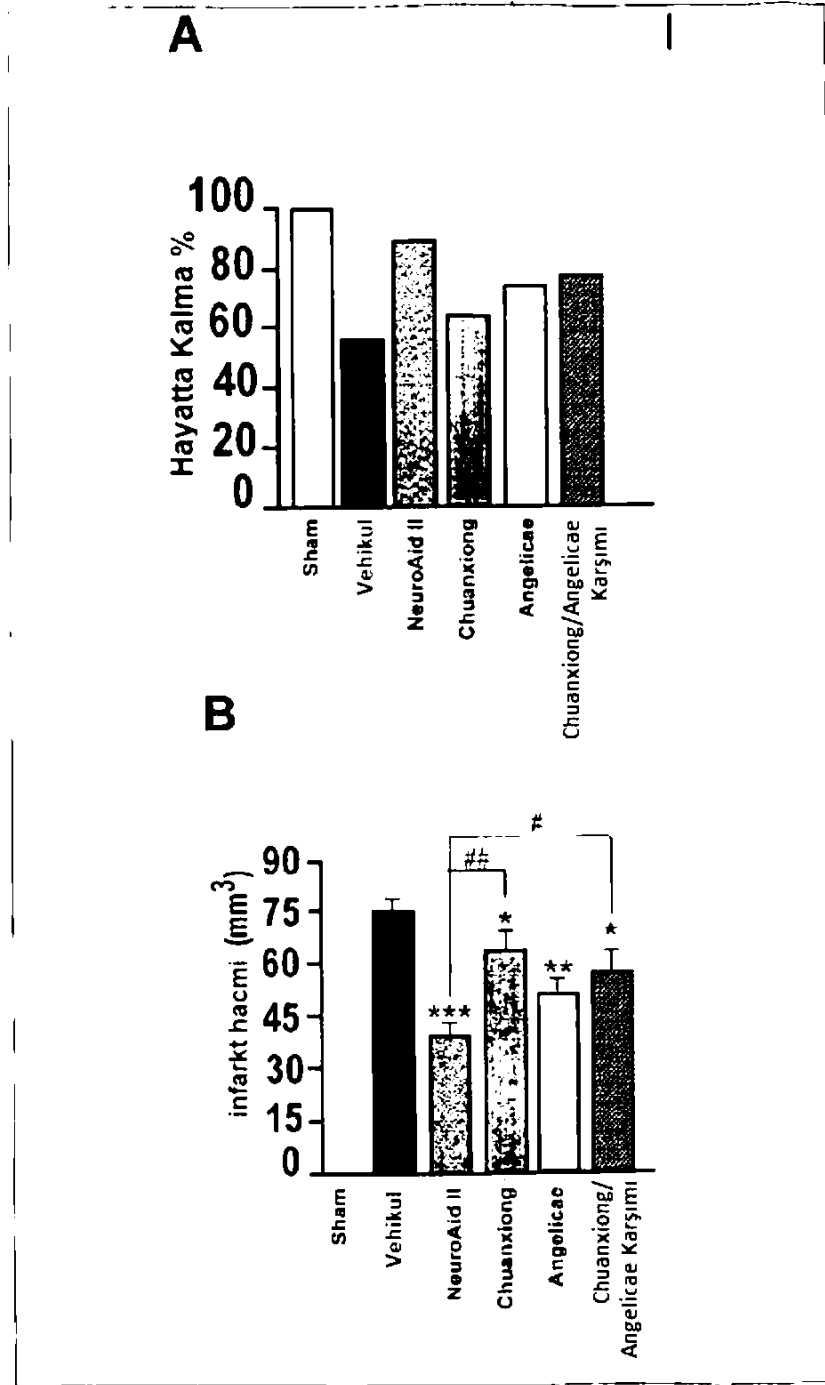
Şekil 8



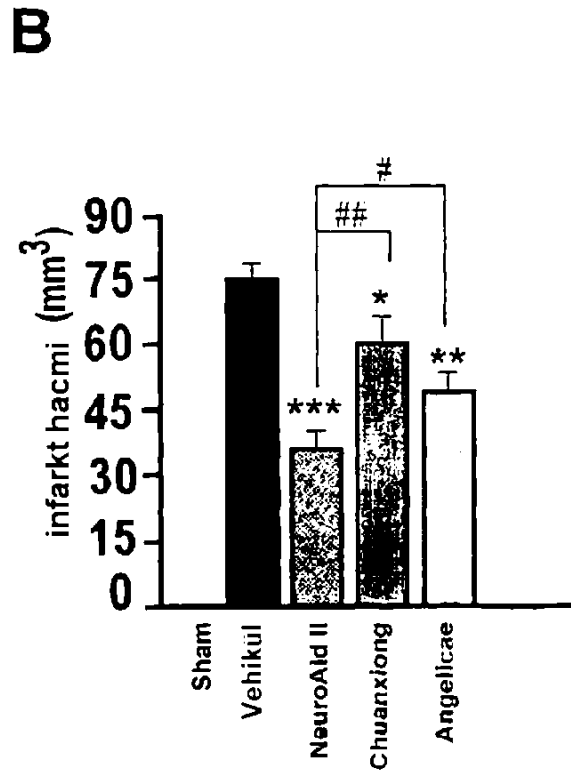
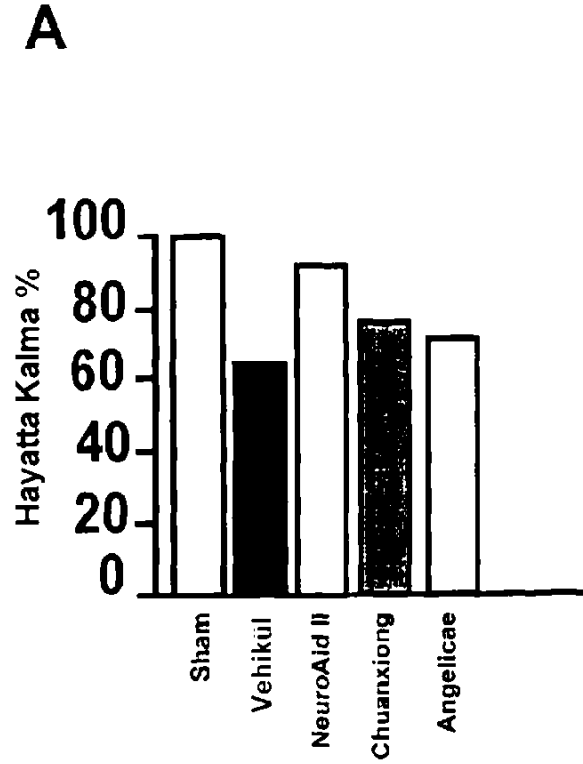
Şekil 9



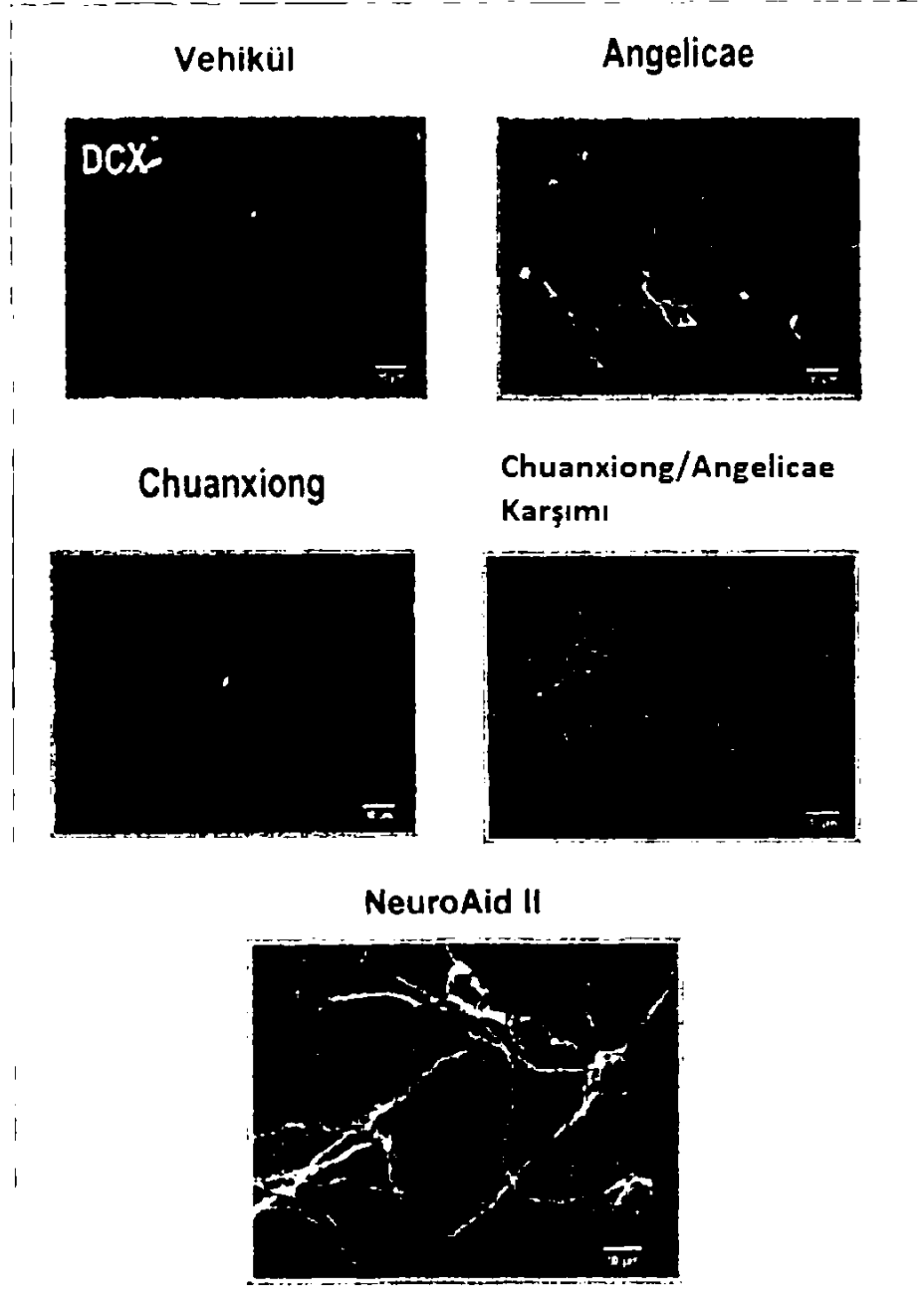
Şekil 10



Şekil 11



Şekil 12



Şekil 13

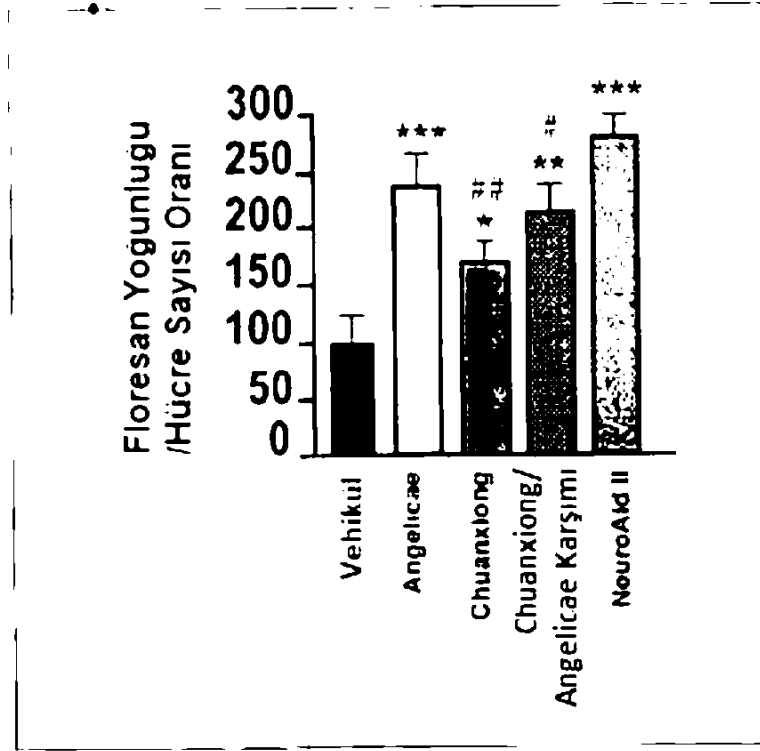
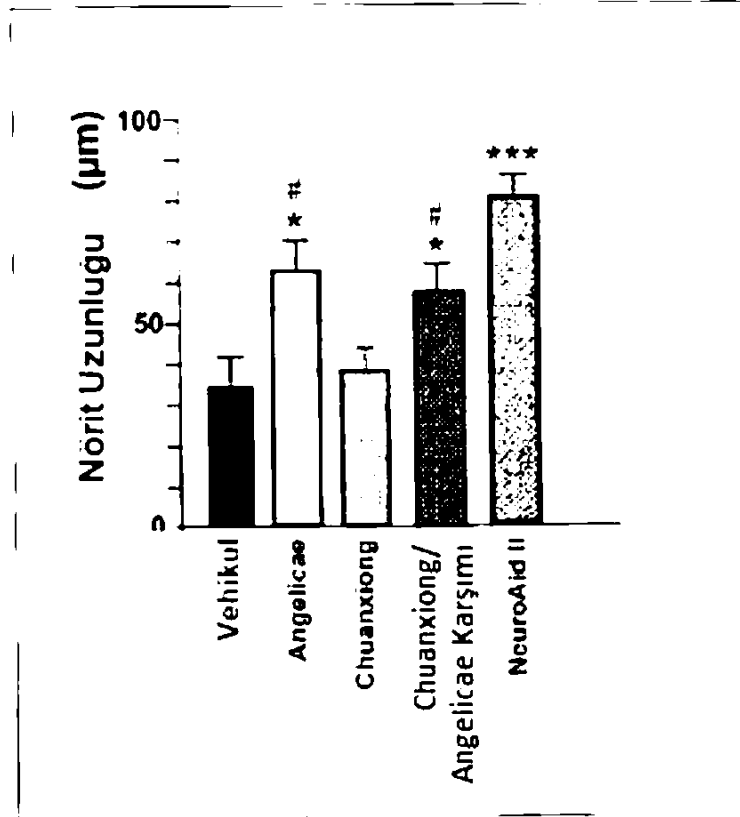


FIG. 14



Şekil 15