



(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)
A61K 31/433 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C07D 285/135 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G09B 23/28 (2019.05); *A61K 31/433* (2019.05); *A61P 25/00* (2019.05); *C07D 285/135* (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018132207, 10.09.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.09.2018

Дата регистрации:
31.07.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.09.2018

(45) Опубликовано: 31.07.2019 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победа, 85, НИУ "БелГУ", Цириковой Н.Д

(72) Автор(ы):

Мартынова Ольга Викторовна (RU),
 Гуреев Владимир Владимирович (RU),
 Покровский Михаил Владимирович (RU),
 Мартынов Михаил Алексеевич (RU),
 Бесхмельницына Евгения Александровна (RU),
 Костина Дарья Александровна (RU),
 Солгалова Анастасия Сергеевна (RU),
 Тимохина Алена Сергеевна (RU),
 Покровская Татьяна Григорьевна (RU),
 Нечаева Инна Николаевна (RU),
 Коротоножкин Алексей Викторович (RU),
 Скачилова София Яковлевна (RU),
 Желтухин Николай Константинович (RU),
 Садчикова Наталья Петровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Белгородский государственный
 национальный исследовательский
 университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2642961 C1, 29.01.2018. RU
 2657820 C1, 15.06.2018. RU 2651572 C2,
 23.04.2018. RU 2406488 C1, 20.12.2010. RU
 2377237 C1, 27.12.2009. BY 5820 C1, 30.12.2003.
 CA 2661495 C, 02.05.2017. US 20160101116 A1,
 14.04.2016. EP 2610244 A1, 03.07.2013. WO
 2006125805 A1, 30.11.2006.

(54) СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной фармакологии и неврологии, и может быть использовано для профилактики ишемии головного мозга. Воспроизводят четырехсосудистую модель патологии и вводят крысам-самцам линии Wistar 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицин

в дозе 50 мг/кг однократно за 60 минут до эксперимента внутривенно через зонд в качестве прекодиционирующего агента. Через 60 минут проводят моделирование церебральной ишемии путем коагуляции двух вертебральных артерий и временной окклюзии двух общих сонных артерий. Способ обеспечивает

выраженную коррекцию ишемии головного мозга в результате использования 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина, обладающего антиоксидантной и антигипоксической активностью и блокирующего активацию свободнорадикальных процессов, а также

перекисного окисления липидов клеточных мембран, имеющих место при развитии острого инфаркта миокарда, ишемического и геморрагического инсультов, острых нарушений регионального и общего кровообращения. 6 табл., 3 ил., 1 пр.

R U 2 6 9 6 2 0 3 C 1

R U 2 6 9 6 2 0 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G09B 23/28 (2006.01)
A61K 31/433 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C07D 285/135 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G09B 23/28 (2019.05); A61K 31/433 (2019.05); A61P 25/00 (2019.05); C07D 285/135 (2019.05)(21)(22) Application: **2018132207, 10.09.2018**(24) Effective date for property rights:
10.09.2018Registration date:
31.07.2019

Priority:

(22) Date of filing: **10.09.2018**(45) Date of publication: **31.07.2019** Bull. № 22

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobeda, 85, NIU "BelGU", Tsurikovoj N.D**

(72) Inventor(s):

**Martynova Olga Viktorovna (RU),
Gureev Vladimir Vladimirovich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Martynov Mikhail Alekseevich (RU),
Beskhmel'nitsyna Evgeniya Aleksandrovna (RU),
Kostina Darya Aleksandrovna (RU),
Solgalova Anastasiya Sergeevna (RU),
Timokhina Alena Sergeevna (RU),
Pokrovskaya Tatyana Grigorevna (RU),
Nechaeva Inna Nikolaevna (RU),
Korotonozhkin Aleksej Viktorovich (RU),
Skachilova Sofiya Yakovlevna (RU),
Zheltukhin Nikolaj Konstantinovich (RU),
Sadchikova Natalya Petrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) METHOD FOR PREVENTING CEREBRAL ISCHEMIA

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to experimental pharmacology and neurology, and can be used for prevention of cerebral ischemia. A four-vessel model of the pathology is reproduced, and Wistar 2-amino-5-ethyl-1,3,4-thiadiazolium glycyglycine is injected into male rats at dose of 50 mg/kg once 60 minutes before the experiment by the intragastric probe as a preconditioning agent. After 60 minutes, cerebral ischemia is simulated by coagulation of two vertebral arteries and temporary occlusion of two common carotid

arteries.

EFFECT: method provides pronounced cerebral ischemia correction by using 2-amino-5-ethyl-1,3,4-thiadiazolium glycyglycine, having antioxidant and antihypoxic activity and blocking activation of free radical processes, as well as peroxide oxidation of lipids of cell membranes, occurring in developing acute myocardial infarction, ischemic and haemorrhagic strokes, acute disorders of regional and general blood circulation.

1 cl, 6 tbl, 3 dwg, 1 ex

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии.

В настоящее время количество пациентов с цереброваскулярными заболеваниями неуклонно растет. Все чаще нарушение мозгового кровообращения (НМК) происходит у трудоспособных и социально активных лиц среднего возраста. За последние годы
5 изучения различных аспектов цереброваскулярной патологии значительно активизировалось, что привело к существенному прогрессу в области профилактики, лечения и восстановления после перенесенного инсульта, а также к снижению смертности от этого заболевания (Спасов А. А., Федорчук В. Ю., Гурова Н. А. и др. Методологический подход для изучения нейропротекторной активности в эксперименте
10 [Текст]. Вестник научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2014; 4: 39-45).

Профилактику и коррекцию ишемии головного мозга теоретически возможно осуществить с помощью фармакологического прекодиционирования, суть которого состоит в активации эндогенных защитных механизмов, снижающих степень
15 повреждения при последующем длительном ишемическом эпизоде (Должикова, И. Н. Дистантное и фармакологическое прекодиционирование с использованием эритропоэтина и тадалафила при экспериментальной ишемии почек: диссертация кандидата биологических наук: 14.03.06 / И.Н. Должикова. – Белгород).

Перспективным для изучения церебропротекторного действия при ишемическом
20 инсульте является 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицин. Производные этилтиадиазола обладают широким спектром фармакологической активности, в том числе и нейропротективными эффектами (Neuroprotective activity of 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivative 4BrABT-an in vitro study / M. Juszczak, K. Walczak, E. Langner, et al. // Ann Agric Environ Med.- 2013.- Vol.20(3).-P.575-9; Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazolebased compound / W. Rzeski, J.
25 Matysiak, M. Kandefér-Szerszeń // Bioorg Med Chem.- 2007.- Vol.15(9).-P.3201-7). Среди них имеется большое число соединений с противовоспалительным, антимикробным, противосудорожным, гипотензивным, антиоксидантным, противоопухолевым действием (3-Arylsulphonyl-5-arylamino-1,3,4-thiadiazol-2(3H)ones as Anti-inflammatory and Analgesic
30 Agents [Text] / S. Schenone, O. Bruno, A. Ranise [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2001. – Vol. 9. – P. 2149–2153.212). Выраженная биологическая активность данных соединений обусловлена их химическим строением, ведь, тиадиазолы являются гетероциклическими соединениями, в основе которых лежит кольцевой пятичленный гетероцикл, содержащий два атома азота и атом серы.

Известно техническое решение «Способ профилактики церебральной ишемии»
35 (Черторицкий Е.А., Овчинников И.В.). Средство содержит фармацевтическую композицию, включающую в качестве активных компонентов метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин и холина альфосцерат. Технический результат достигается за счет того, что фармацевтическая композиция, обладающая
40 нейропротекторной, противогипоксической и антиамнестической активностью и повышающая физическую работоспособность. Осуществляется на белых нелинейных крысах-самцах массой 220-280 г, содержащихся в виварных условиях, у которых моделировали ишемический инсульт. Исследовали нейропротекторное действие композиции метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролина и
45 холина альфосцерата у крыс с экспериментальной ишемией головного мозга. Ишемию головного мозга у крыс воспроизводили путем одномоментной перевязки (под эфирным наркозом) обеих общих сонных артерий. В подопытных группах животным вводили внутрибрюшинно различные вещества (метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-

пролил-глицил-пролина и холина альфосцерат по отдельности и композицию их содержащую) 1 раз в сутки в течение 7 суток; в первые сутки - через 1 и 3 часа после операции. Животных после операции наблюдали в течение 2 недель с учетом выживаемости крыс. Неврологический дефицит у животных определяли (слепым методом) по шкале McGraw et al. (в баллах) каждый час в течение 24 часов, а затем 1 раз в сутки. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов.

Основным недостатком способа является то, что модель ишемии головного мозга не является специфичной для многих видов исследований, связанных с нарушением кровообращения головного мозга. Помимо этого, использование данной шкалы оценки неврологического дефицита McGraw не всегда информативно. В связи с широкой вариабельностью анатомии артериального русла, бассейнов, внутренней и внешней сонной артерии необходимо исключить возможность коллатерального питания головного мозга в эксперименте.

Наиболее близким к заявленному решению является способ профилактики ишемии головного мозга (RU 2642961 публ. 29.01.2018). Сущность изобретения состоит в том, что крысам за час до моделирования тотальной четырехсосудистой ишемии головного мозга вводится тадалафил в дозе 1 мг/кг. Далее, соблюдая нужные временные интервалы производится контроль когнитивных нарушений. После головной мозг животных исследуется на наличие морфофункциональных нарушений.

Основным недостатком способа является то, что эффективность используемого вещества ниже, чем при фармакологическом прекондиционировании 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицином.

Задачей предлагаемого изобретения является создание более эффективного способа церебропротекции, включающий применение производного этилтиадиазола в качестве церебропротектора.

Задача достигается тем, в способе, включающем воспроизведение четырехсосудистой модели патологии и введение крысе линии Wistar 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг, которое вводят однократно за 60 минут до эксперимента внутрижелудочно через зонд, а через 60 минут проводят моделирование ишемии головного мозга путем коагуляции двух вертебральных артерий и временной окклюзии двух общих сонных артерий.

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что:

- в качестве церебропротектора вводят однократно 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг за 60 минут до эксперимента внутрижелудочно.

- эффективность вещества оценивается всесторонне: исследуется неврологический дефицит животного, поведенческий статус, уровень двух специфических маркеров повреждения головного мозга S100b и NSE, проводится гистологическое и морфометрическое исследование.

- с помощью электрофизиологического метода производится контроль правильно выполненной модели патологии.

- получаемый церебропротекторный эффект более выражен, чем в аналогичных заявленных способах.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ профилактики ишемии головного мозга с использованием 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицин, обладающего антиоксидантной и антигипоксической активностью и блокирующем активацию свободнорадикальных процессов, а также перекисного окисления липидов клеточных мембран, имеющих место при развитии острого инфаркта миокарда, ишемического и геморрагического инсультов, острых

нарушений регионального и общего кровообращения. Способ приводит к выраженной коррекции ишемии головного мозга.

Получение 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина.

В трехгорлую колбу, снабженную мешалкой, термометром и обратным
5 холодильником загружают 6,6 г (0,05 м) глицилглицина, 350 мл воды. После растворения загружают 6,46 г (0,05 м) 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазола, массу нагревают до 70°C и перемешивают при 70-75°C в течение 40 минут. Полученный раствор фильтруют, отгоняют воду, остаток перекристаллизовывают из изопропилового спирта. Получают 11,2 г мелкокристаллического порошка с Тпл ~ 190-192°C.

10 Найдено, %: С 36,41; Н 5,82; N 26,68; S 12,21; C₈H₁₅N₅SO₃

Вычислено, %: С 36,79; Н 5,78; N 26,82; S 12,24; O 18,37.

ИК-спектр, ν см⁻¹: 3270 (NH), 2800, 2780 (CH), 2560 (>N<), 1720 (C=O), 1545 (NHCO).

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

Исследование выполнено на 40 половозрелых самцах крыс линии «Wistar» 5–6-
15 месячного возраста массой 180–210 г. Содержание животных соответствовало всем правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Животные содержались в стандартных условиях, соответствующих санитарным правилам (№ 1045-73), утвержденным МЗ СССР 06.04.73 г. по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) и
20 ГОСТ Р 53434-2009. Вивисекцию проводили по этическим принципам обращения с лабораторными животными «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No.123».

В эксперименте было выделено 4 группы крыс (n=10): 1) интактные, 2)
ложнооперированные, 3) с тотальной церебральной ишемией, 4) с тотальной
25 церебральной ишемией и предварительным введением за 60 минут 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг. 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицин вводили внутривентрикулярно через зонд. Данное соединение синтезировано в ОАО «Всероссийский центр по изучению безопасности биологически активных веществ» (ВНЦ БАВ, Россия, Старая Купавна).

30 Наркотизацию животных в эксперименте выполняли с применением золетила 60 мг/кг и хлоралгидрата 150 мг/кг.

Все эксперименты были выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств при нарушениях мозгового кровообращения. В работе была использована модель патологии, при которой
35 осуществляли временную окклюзию двух общих сонных артерий на 4 минуты, с предварительной коагуляцией двух вертебральных артерий. Оценка адекватности выполнения окклюзии артерий, кровоснабжающих мозг, осуществлялась с помощью регистрации электрической активности головного мозга животного на приборе Biopac Systems Inc. MP150 EEG100C (Tadalafil as an agent of pharmacological preconditioning in
40 ischemic - reperfusion brain injury / Martynova O.V. // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2017. – Vol.3, №3. – P. 20-36. doi: 10.18413/2313-8971-2017-3-3-20-36).

Метод осуществляли при помощи программы AcqKnowledge 4.2. Критерием правильно выполненной методики являлось уменьшение амплитуды ЭЭГ.

Протокол исследования включал следующие этапы: моделирование ишемии
45 головного мозга; оценку уровня электроэнцефалограммы животного; оценка поведенческого статуса (2 сут) и неврологического дефицита на 1, 3, 7 и 14 сут после моделирования патологии

О выраженности церебропротекторного эффекта судили по тяжести неврологического

дефицита, поведенческого статуса, уровню специфических маркеров повреждения головного мозга S100b и NSE, анализу гистологического и морфометрического состояния срезов головного мозга.

При статистической обработке данных рассчитывается среднее значение, величину стандартного отклонения. Различия считаются достоверными при $p < 0,05$.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Для оценки неврологического статуса крыс использовали несколько методов: 1. Балльную шкалу оценки инсульта McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной. Внутри группы крыс с признаками неврологического дефицита подразделяли на животных с легкой, средней и тяжелой симптоматикой неврологического дефицита. Если у животного присутствовало несколько признаков неврологического дефицита, то баллы суммировали. За контроль принимали данные, полученные от животных с тотальной ишемией головного мозга. При оценке выраженности неврологического дефицита по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной после моделировании ишемии, спустя 1 сутки, средний балл был высоким $3,95 \pm 0,57$, что обусловлено наличием таких симптомов, как вялость и замедленность движений, односторонним полуптозом правого глаза. У 20% животных фиксировали летальный исход. Вялость и замедленность движений к 3 дню после моделирования патологии исчезали. На 3, 7, 14 сут сохранялся полуптоз правого глаза.

Введение 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг так же ограничивало развитие неврологического дефицита. Спустя 1 сутки средний неврологический балл был $0,7 \pm 0,09$. Неврологический дефицит проявлялся в вялости и замедленности, движений, одностороннем полуптозе правого глаз. Вялость и замедленность движений к 3 дню после моделирования патологии исчезали. В данной группе летальности животных не наблюдалось ($p < 0,05$) (Табл. 1):

Таблица 1

Таблица 1 – Влияние ЛХТ 4-15 на динамику тяжести неврологических нарушений у крыс с ишемией головного мозга по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (1996) (по среднему значению балла в группе) ($M \pm m$; $n=10$).

Группы	Период			
	1 сут	3 сут	7 сут	14 сут
интактные	0	0	0	0
ЛО	0	0	0	0
ИГМ	$3,95 \pm 0,57$	$2,75 \pm 0,29$	$2,4 \pm 0,27$	$2,3 \pm 0,21$
2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицин 50 мг/кг+ ИГМ	$0,7 \pm 0,09^*$	$0,6 \pm 0,12^*$	$0,3 \pm 0,10^*$	$0,3 \pm 0,10^*$

Примечание - здесь и везде далее* – $p < 0,05$ по отношению к контролю. «ЛО»- ложнооперированные животные; «ИГМ»- ишемия головного мозга; «ЛХТ+ИГМ» - ишемия головного мозга с предварительным введением производных этилтиадиазола.

Поведенческий статус крыс оценивали с помощью теста «Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ)» (Табл. 2). В группе с 4-сосудистой 4-минутной ИГМ (ишемия головного мозга) у животных наблюдалось значительное снижение горизонтальной активности, увеличение времени пребывания в темных рукавах. Снижение вертикальной активности проявлялось в снижении стоек, свешиваний приблизительно на 75%. Сохранялось минимальное ориентировочно-исследовательское поведение. В поведенческом тесте ПКЛ группа крыс с ИГМ и предварительным введением 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг проявляли

себя более активно по сравнению с контрольной группой. Это проявлялось в увеличении горизонтальной и вертикальной активности, что отражалось в большем количестве стоек и свешиваний. Ориентировочно-исследовательское поведение снижалось, но незначительно ($p < 0,05$).

5 Таблица 2

Влияние ишемии головного мозга на поведенческую активность животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» ($M \pm m$; $n=10$).

Критерий	Группы			
	интактные	ЛО	4-сос. 4-минутная ИГМ	2-амино-5-этил- 1,3,4-тиадиазолия глицилглицин 50мг/кг +ИГМ
Темный рукав, т	86,8±12,3	120±7,1	167,3±2,9	129±7,3*
Светлый рукав, т	93,2±12,3	60±7,1	12,7±2,9	51,4±7,3*
Стойки, шт.	5,8±0,6	4,4±0,7	2,9±0,5	4,9±0,9*
Свешивания, шт.	6,9±0,7	4,9±0,3	1±0,2	3±0,5*

20 При оценке двигательной активности животных в тесте актиметрии с инфракрасным мониторингом активности IR Actimeter после моделирования патологии активность крыс падала: уменьшались общая активность, количество стереотипных движений, максимальная скорость, общая дистанция. Время отдыха, в сравнении с ложнооперированными увеличивалось (Табл. 3).

25 Группа животных с предварительным введением 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг была более активнее, развивала большую скорость, проходила более длинную дистанцию. Время отдыха в данной группе ниже в сравнении с контролем ($p < 0,05$) (Табл. 3).

Таблица 3

30 Влияние ишемии головного мозга на поведенческую активность животных в тесте актиметрии ($M \pm m$; $n=10$)

Критерии	Группы			
	интактные	ЛО	4-сос. 4-минутная ИГМ	2-амино-5-этил- 1,3,4-тиадиазолия глицилглицина 50 мг/кг + ИГМ
Общая активность, у.е.	775 ±52,02	688,8±29,87	451,9±45,05*	565,1±45,60*
Стереотипы движения, у.е.	73,1±2,71	55,2±4,56	27,4±3,00*	38,4±3,52*
Максимальная скорость, у.е.	34,57±1,82	30,29±2,17	20,88±1,68*	26,68±1,51*
Общая дистанция, у.е.	1497,14±36,67	1386,8±51,25	756,30±72,11*	1055,92±124,76*
Время отдыха, у.е.	75,53±13,23	98,15±6,02	162,17±17,17*	129,7±13,52*

Далее осуществляли контроль уровня нейронспецифических маркеров S100b и NSE

в данных группах (Табл. 4) .

Таблица 4

Концентрация маркеров повреждения головного мозга в плазме животных на 3-е сутки ($M \pm m$; $n=10$).

5

10

интактные		ЛО		4х сос. 4-минутная ИГМ		2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина 50 мг/кг + ИГМ	
S100b	NSE	S100b	NSE	S100b	NSE	S100b	NSE
0,69±0,11	0,415±0,36	0,87±0,16	0,494±0,23	1,91±0,16*	0,561±0,19*	0,545±0,20#	0,239±0,141#

15

20

При анализе уровня S100b и NSE у животных данных экспериментальных групп регистрировали повышение концентрации маркеров в сыворотке крови. Статистически не значимо ($p > 0,05$) повышение концентрации маркеров наблюдали у ложнооперированных животных. Статистически значимо ($p < 0,05$) повышение концентрации было в группе с четырехсосудистой 4х минутной и ИГМ. При анализе уровня S100b и NSE у животных группы с ИГМ с предварительным введением 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг наблюдали снижение концентрации маркеров повреждения даже ниже уровня контрольной группы ($p > 0,05$).

25

При обзорной микроскопии у интактных животных нейроны были преимущественно пирамидной, округлой или многоугольной формы, с крупными округлыми ядрами и мелкозернистой цитоплазмой. У многих нейронов базофильная субстанция цитоплазмы имела вид крупных глыбок, расположенных периферически. В некоторых нейронах чётко определялись одно или два центрально расположенных ядрышка, представлено на (Фиг. 1), где А - лобная доля интактной крысы, X 100, окр. гематоксилин+эозин; Б – гиппокамп интактной крысы, X 400, окр. гематоксилин+эозин.

30

Область лобной доли характеризовалась низкой плотностью расположения, а область СА1 гиппокампа высокой плотностью, средних по размеру, нейронов.

35

При четырёхсосудистой модели ишемии отмечалась выраженная гиперхромия нейронов лобной доли с периваскулярным и перицеллюлярным отёком. Форма клеток была, преимущественно, многоугольной, вытянутой, ядра во многих из них не определялись. Капилляры паретически расширены, полнокровны. В области СА1 гиппокампа наблюдалась дезорганизация нейрональных слоев, хроматолиз, набухание и пикнотические изменения ядер, двуядрышковые нейроны практически не определялись, представлено на (Фиг.2), где – четырёхсосудистая модель ишемии головного мозга: А - лобная доля, X 400, окр. гематоксилин+эозин; Б – СА1 область гиппокампа, X 400, окр. тионином по Ниссию.

40

45

При введении за час до моделирования патологии 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг, морфологические изменения нейронов носили, преимущественно, некробиотический характер. Количество погибших нейронов было значительно ниже, чем без введения соединения. В гиппокампе нарушение стратификации слоев носили умеренный характер, представлено на (Фиг. 3), где - четырёхсосудистая модель ишемии головного мозга при коррекции 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицином : А - лобная доля, X 100, окр. гематоксилин+эозин; Б – гиппокамп, X 400, окр. гематоксилин+эозин.

При статистическом исследовании установлено, что ишемическое повреждение

нейронов и лобной доли, и гиппокампа достоверно более выражены в группе с четырёхсосудистой моделью ишемии мозга без коррекции веществом. Достоверно отличались минимальный диаметр, периметр и площадь нейронов, диаметр, периметр и площадь ядер ($p < 0.05$). Количество двуядрышковых нейронов достоверно больше при коррекции 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицином ($p < 0.05$), что отражает функциональное состояние нейронов, их большую активность и способность к регенеративным и репаративным процессам. Достоверных отличий не обнаружено при измерении максимального диаметра ядер нейронов ($p > 0.05$).

Таким образом, при четырёхсосудистой модели ишемии повреждения большинства нейронов были необратимы, без признаков активации репаративных процессов. Коррекция ишемического повреждения 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицином показала статистически достоверное повышение устойчивости нейронов лобной доли и СА1 области гиппокампа к гипоксии и ишемии, достоверное снижение количества погибших нейронов и большую активность репаративных процессов.

Таблица 5

Морфометрическая характеристика нейронов лобных долей головного мозга крыс ($M \pm m$; $n=30$).

Параметры	интактные	4х сосудистая ИГМ	2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицином 50 мг/кг + ИГМ
Max D	12,51±0,29	13,54±0,63#	9,87±0,25#
Min D	8,46±0,28	6,58±0,21*	7,32±0,51*
Периметр клетки	35,87±0,90	38,60±1,38*	26,34±3,36*
S клетки	83,33±3,25	75,45±3,62*	56,07±2,82*
Периметр ядра	21,98±0,89	23,58±0,65*	18,08±1,02*
S ядра	35,08±2,21	38,90±2,02*	25,76±1,24*
D Ядра	6,28±0,24	7,37±0,24*	5,94±0,09*
D Ядрышка	1,88±0,07	Гипохромные нейроны-(10%)1,67±0,18 Гиперхромные-(90%) Двуядрышковые- 0%	Гипохромные нейроны-(30%) 1, 89±0,05 Гиперхромные-(56%) Двуядрышковые-(14%)1,12±0,23

Примечание: *-при ($p < 0.05$), #- при ($p > 0.05$). За контроль принимали гр. интактных животных.

Таблица 6

Морфометрическая характеристика нейронов гиппокампа крыс ($M \pm m$; $n=30$).

Параметры	интактные	4х сосудистая ИГМ	2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина 50 мг/кг + ИГМ
Max D	11,85±0,29	11,38±0,16#	10,02±0,11*
Min D	8,03±0,28	6,34±0,20*	6,20±0,18*
Периметр клетки	33,01±0,80	30,40±0,34*	29,11±0,41*
S клетки	68,90±2,63	57,71±1,76*	42,43±1,54*
Периметр ядра	22,66±0,72	20,86±0,47*	18,16±1,78*
S ядра	38,06±2,50	29,96±1,25*	24,05±0,61*
D Ядра	6,23±0,26	7,09±0,25*	5,97±0,09*
D Ядрышка	2,38±0,07	Гипохромные-0% Гиперхромные-(90%) Двухядрышковые-(10%)- 1,83±0,23	Гипохромные нейроны- Гиперхромные-(75%) Двухядрышковые-(25%)- 1,96±0,19

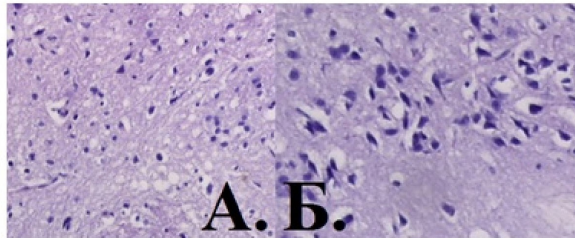
Примечание: *-при ($p < 0.05$), #- при ($p > 0.05$). За контроль принимали гр. интактных животных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженной коррекции ишемических повреждений головного мозга в условиях тотальной четырехсосудистой модели ишемии головного мозга крыс 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицином в дозе 50 мг/кг массы тела животного при однократном внутрижелудочном введении.

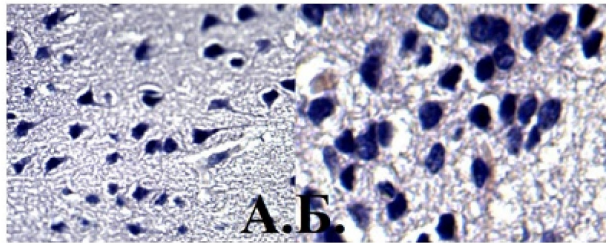
(57) Формула изобретения

Способ профилактики ишемии головного мозга, включающий воспроизведение четырехсосудистой модели патологии и введение крысам-самцам линии Wistar 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолия глицилглицина в дозе 50 мг/кг, который вводят однократно за 60 минут до эксперимента внутрижелудочно через зонд в качестве прекодиционирующего агента, а через 60 минут проводят моделирование церебральной ишемии путем коагуляции двух вертебральных артерий и временной окклюзии двух общих сонных артерий.

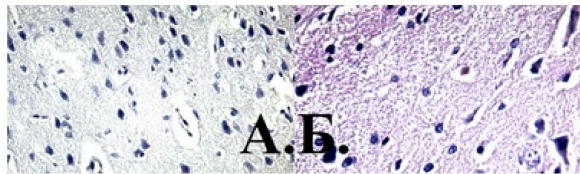
СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ
ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3