



(51) МПК  
*G09B 23/28* (2006.01)  
*A61K 31/41* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*G09B 23/28* (2006.01); *A61K 31/41* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016148733, 13.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 13.12.2016

Дата регистрации:  
 05.02.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.12.2016

(45) Опубликовано: 05.02.2018 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.  
 Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Цуриковой  
 Н.Д.

(72) Автор(ы):

Пересыпкина Анна Александровна (RU),  
 Покровский Михаил Владимирович (RU),  
 Левкова Елена Александровна (RU),  
 Губарева Виктория Олеговна (RU),  
 Покровская Татьяна Григорьевна (RU),  
 Шабельникова Анна Сергеевна (RU),  
 Никитина Владислава Александровна (RU),  
 КочкарOVA Индира Султановна (RU),  
 Шарапов Михаил Валерьевич (RU),  
 Гуреев Владимир Владимирович (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: ШАБЕЛЬНИКОВА А.С.  
 Фармакологическое прекондиционирование  
 никорандилом как возможность повышения  
 устойчивости тканей сетчатки к ишемии в  
 эксперимент. Журнал "Научный результат",  
 2015, т.1, N 4(6), с.75-78. RU 2539630 C1,  
 20.01.2015. RU 2497200 C1, 27.10.2013. RU  
 2497201 C1, 27.10.2013. EP 489404 A3,  
 14.10.1992. US 6436944 B1, 20.08.2002. (см.  
 прод.)

(54) Способ профилактики ретинальной ишемии-реперфузии миноксидилом в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к фармакологии и офтальмологии, и может быть использовано для профилактики ишемических состояний сетчатки в эксперименте. Способ включает предварительное прекондиционирование лекарственным средством путем однократного внутривенного введения его раствора лабораторному животному. Последующее моделирование ишемии

сетчатки проводят путем механического давления 110 мм рт.ст. на переднюю камеру глаза в течение 30 минут. В качестве лекарственного средства за 60 минут до моделирования используют миноксидил в дозе 0,5 мг/кг массы тела животного. Ретинопротективный эффект миноксидила оценивают по результатам электроретинографии после 72 часов реперфузии. Способ приводит к выраженной коррекции

ретиальной ишемии-реперфузии в эксперименте, что подтверждается достижением показателей уровня ретиальной микроциркуляции и

восстановлением электрофизиологической активности сетчатки. 1 пр., 2 табл.

(56) (продолжение):

**BITTENCOURT R C et al. Influence of minoxidil on ischemic cutaneous flaps in rats Acta Cir Bras. 2005 Nov-Dec; 20(6): 450-4.**

R U 2 6 4 3 6 7 1 C 1

R U 2 6 4 3 6 7 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G09B 23/28* (2006.01)  
*A61K 31/41* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*G09B 23/28* (2006.01); *A61K 31/41* (2006.01)

(21)(22) Application: **2016148733**, 13.12.2016

(24) Effective date for property rights:  
13.12.2016

Registration date:  
05.02.2018

Priority:

(22) Date of filing: 13.12.2016

(45) Date of publication: 05.02.2018 Bull. № 4

Mail address:

308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul. Pobedy,  
85, NIU "BelGU", OIS, Tsurikovej N.D.

(72) Inventor(s):

**Peresypkina Anna Aleksandrovna (RU),  
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),  
Levkova Elena Aleksandrovna (RU),  
Gubareva Viktoriya Olegovna (RU),  
Pokrovskaya Tatyana Grigorevna (RU),  
Shabelnikova Anna Sergeevna (RU),  
Nikitina Vladislava Aleksandrovna (RU),  
Kochkarova Indira Sultanovna (RU),  
Sharapov Mikhail Valerevich (RU),  
Gureev Vladimir Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR RETINAL ISCHEMIA-REPERFUSION PREVENTION BY MINOXIDIL IN EXPERIMENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves preliminary preconditioning by the drug via single intragastric administration of its solution to a laboratory animal. Subsequent modeling of retinal ischemia is carried out by mechanical pressure of 110 mm Hg on the anterior chamber of the eye for 30 minutes. Minoxidil in an amount of 0.5 mg/kg of animal body weight is used as a drug 60 minutes before simulation. The

retinoprotective effect of minoxidil is assessed by electro-retinography after 72 hours of reperfusion.

EFFECT: pronounced correction of retinal ischemia-reperfusion in the experiment, which is confirmed by achievement of retinal microcirculation levels and restoration of the electrophysiological activity of the retina.

1 ex, 2 tbl

C 1  
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
R U

R U  
2  
6  
4  
3  
6  
7  
1  
C 1

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии и офтальмологии.

По известным литературным источникам – в последние годы отмечается рост ишемических заболеваний глазного дна, связанных с распространением атеросклероза, гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, сахарного диабета, которые приводят к патологии сетчатки. Ретинальная ишемия приводит к развитию слепоты и инвалидности по зрению у людей различных возрастных групп (Камилов Х. М. Состояние общей и регионарной гемодинамики при глазном ишемическом синдроме [Текст] / Х. М. Камилов, М. С. Касимова, Д. К. Махкамова // Вестник Тамбовского университета. Сер. Естественные и технические науки. – 2015. – Т. 20, № 3. – С. 596–599). В связи с этим, профилактика и коррекция ишемических повреждений сетчатки, возникающих при различных системных заболеваниях и состояниях, является актуальной проблемой современной медицины.

Известен способ профилактики ишемии сетчатки эритропоэтином в эксперименте (RU № 2539629, публ. 20.01.2015), включающий воспроизведение модели патологии и введение лабораторному животному рекомбинантного эритропоэтина в дозе 50 МЕ/кг, отличающийся тем, что рекомбинантный эритропоэтин вводят однократно в 1-й день эксперимента внутривенно в качестве прекодиционирующего агента, а через 30 минут проводят моделирование ишемии сетчатки путем оказания механического давления (110 мм рт.ст.) на переднюю камеру глаза в течение 30 минут в 1-й день эксперимента.

Основным недостатком способа является то, что профилактика ишемии сетчатки рекомбинантным эритропоэтином в эксперименте не приводит к достижению целевых значений уровня ретинальной микроциркуляции после 72 часов реперфузии в отличие от предлагаемой профилактики, где уровень микроциркуляции в сетчатке в группе крыс с коррекцией патологии миноксидилом стремится к значению в группе интактных животных, достоверно не отличаясь от него, и превосходит показатели коррекции рекомбинантным эритропоэтином.

Наиболее близким к заявленному решению является способ профилактики ишемии сетчатки в эксперименте (RU № 2539630, публ. 20.01.2015), включающий фармакологическое прекодиционирование никорандилом путем его введения лабораторному животному в виде раствора внутривенно через зонд, а затем моделирование патологии, а никорандил вводят в дозе 0,86 мг/кг массы тела животного однократно, а через 30 минут проводят моделирование ишемии сетчатки путем оказания механического давления 110 мм рт.ст. на переднюю камеру глаза в течение 30 минут в 1-й день эксперимента.

Основным недостатком способа является то, что оценку профилактического действия никорандила проводят только по изменению показателей уровня микроциркуляции в сетчатке, не учитывая показатели функциональной активности сетчатки, что не позволяет полностью оценить фармакологическое действие препарата при проведении доклинических исследований.

Задачей предлагаемого изобретения является создание эффективного способа профилактики ретинальной ишемии-реперфузии миноксидилом в эксперименте, включающего прекодиционирующий агент миноксидил.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ профилактики ретинальной ишемии-реперфузии миноксидилом в эксперименте, включающий фармакологическое прекодиционирование лекарственным средством путем его введения лабораторному животному в виде раствора внутривенно через зонд, а

затем моделирование патологии путем оказания механического давления 110 мм рт.ст. на переднюю камеру глаза в течение 30 минут в 1-й день эксперимента, причем в качестве лекарственного средства применяют миноксидил, который вводят в дозе 0,5 мг/кг массы тела животного однократно, а через 60 минут проводят моделирование ретинальной ишемии-реперфузии. Результат подтверждается электроретинографически через 72 часа реперфузии.

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что внутрижелудочное введение миноксидила в дозе 0,5 мг/кг массы тела животного однократно приводит к более выраженной коррекции ретинальной ишемии-реперфузии в эксперименте, чем в прототипе и аналоге, так как миноксидил открывает митохондриальные АТФ-зависимые К<sup>+</sup>-каналы, за счет чего реализуется эффект прекодиционирования, что подтверждается достижением лучших показателей уровня ретинальной микроциркуляции и восстановлением электрофизиологической активности сетчатки при коррекции миноксидилом.

Регистрацию уровня микроциркуляции в сетчатке и электроретинографию (ЭРГ) проводили через 72 часа реперфузии после моделирования ретинальной ишемии.

Кроме того, в предлагаемом способе выявлена более эффективная профилактика ретинальной ишемии-реперфузии в эксперименте, подтверждаемая достижением лучших показателей уровня микроциркуляции в сетчатке при коррекции миноксидилом, чем в прототипе, и улучшением электрофизиологической активности сетчатки при проведении ЭРГ.

#### СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

Опыты проведены на 40 белых лабораторных крысах обоих полов массой 180-220 г. Каждая группа включала 10 крыс. Первая группа – группа интактных животных, вторая группа – с ретинальной ишемией (контроль), третья группа – с коррекцией миноксидилом; четвертая группа - с коррекцией никорандилом (препарат сравнения).

Моделирование ретинальной ишемии-реперфузии проводили путем оказания механического давления 110 мм рт.ст. на переднюю камеру глаза в течение 30 минут в 1-й день эксперимента. Подтверждением формирования ишемии служило отсутствие глазного кровотока (побеление глаза лабораторного животного).

В третьей группе животных за 60 мин до моделирования патологии вводили миноксидил в дозе 0,5 мг/кг массы тела крысы (терапевтическая доза получена в результате переноса доз с человека на крысу с использованием формулы межвидового переноса и коэффициента пересчета доз для разных видов животных в зависимости от массы тела по Улановой И.П.) однократно внутрижелудочно через зонд в виде крахмального раствора. За 15 мин до моделирования ишемии осуществляли наркотизацию внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг массы тела крысы.

В четвертой группе животных за 30 мин до моделирования ретинальной ишемии-реперфузии вводили никорандил в дозе 0,86 мг/кг массы тела животного (терапевтическая доза получена в результате переноса доз с человека на крысу с использованием формулы межвидового переноса и коэффициента пересчета доз для разных видов животных в зависимости от массы тела по Улановой И.П.) однократно внутрижелудочно через зонд в виде крахмального раствора. За 15 мин до моделирования ишемии осуществляли наркотизацию внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг массы тела животного.

О выраженности ретинопротективного эффекта судили по электрофизиологическим изменениям в сетчатке крыс через 72 часа реперфузии. Для этого под наркозом

(хлоралгидрат, 300 мг/кг массы тела животного, внутрибрюшинно) животное фиксировали. Функциональное состояние сетчатки оценивали по амплитуде а- и b-волн электроретинограммы. Угнетение волны b является наиболее чувствительным показателем ишемического повреждения ткани и отражает функциональное состояние сетчатки даже при отсутствии заметных структурных повреждений (Константинова Т. С. Протекторная и нейротоксическая роль оксида азота в моделях зрительных патологий [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.02 / Т. С. Константинова. – Москва, 2009. – 26 с.). Вызванные биопотенциалы пропускались на частоте 1-1000 Гц, усиливались, усреднялись и представлялись графически на экране при помощи Biopac-systems MP-150 с компьютерной программой AcqKnowledge 4.2 (США).

Уровень микроциркуляции в сетчатке крыс определяли сразу после проведения ЭРГ при помощи лазер-Доплер флоуметра Biopac-systems MP-150 и датчика игольчатого типа TSD-144 (США). Регистрацию уровня микроциркуляции в сетчатке оценивали в десяти точках, из полученных значений выводили среднее, которое вносили в протокол и принимали за уровень микроциркуляции в сетчатке у данного животного.

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов, средней арифметической и вероятности возможной ошибки (p) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при  $p < 0,05$ . Для расчётов использовали программу статистического анализа Microsoft Excel 2003.

#### ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Оценку электрофизиологической активности сетчатки проводят по её основным компонентам – по амплитуде а- и b-волн. Для проведения ЭРГ животных выдерживают в темноте 30 мин (Effects of the duration of dark adaptation on the retinal function of normal SD rats [Text] / L. Zahng, Y.-h. Gu, J. An [et al.] // Chinese journal of optometry ophthalmology and visual science. – 2013. – Vol. 15, № 6. – P. 323-326), далее наркотизируют и фиксируют на столике, изолированном от электромагнитного излучения. Роговичный серебряный электрод помещают на роговицу, предварительно смоченную физ. раствором для более полного контакта, референтный игольчатый электрод помещают подкожно в области черепа, заземляющий игольчатый электрод помещают подкожно в области основания хвоста. Стробоскоп со вспышкой белого света, подключенный к стимулятору, размещают за спиной животного, регистрацию ЭРГ проводят в ответ на одиночную стимуляцию. Вызванные биопотенциалы пропускают на частоте 1-1000 Гц, усиливают, усредняют и представляют графически. Запись ЭРГ проводят в течение 0,5 с у каждой крысы. Для оценки степени развития ишемии сетчатки используют соотношение амплитуд b- и а-волн ЭРГ – коэффициент b/a (Константинова Т. С. Протекторная и нейротоксическая роль оксида азота в моделях зрительных патологий [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.02 / Т. С. Константинова. – Москва, 2009. – 26 с.; Нероев В. В. Ишемия сетчатки и оксид азота [Текст] / В. В. Нероев, М. М. Архипова // Вестник РАМН. – 2003. – № 5. – С. 37-40).

Результаты оценки электрофизиологической активности сетчатки крыс на 72 час реперфузии после моделирования ретинальной ишемии в экспериментальных группах представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты оценки электрофизиологической активности сетчатки крыс на 72 час реперфузии ( $M \pm m$ ), усл.ед.

№ п/п	Экспериментальные группы	Коэффициент b/a после 72 ч реперфузии
-------	--------------------------	---------------------------------------

1	Интактные (n=10)	2,5±0,10 <sup>y</sup>
2	Ретинальная ишемия (n=10)	1,2±0,04*
3	Коррекция миноксидилом, 0,5 мг/кг (n=10)	2,4±0,09 <sup>y</sup>
4	Коррекция никорандилом, 0,86 мг/кг (n=10)	2,2±0,06* <sup>y</sup>

Примечание: \* -  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных; <sup>y</sup> -  $p < 0,05$  в сравнении с группой с ретинальной ишемией

В нашем исследовании при развитии ретинальной ишемии через 72 ч после моделирования патологии коэффициент b/a снижался до 1,2±0,04 при его нормальных значениях у белых лабораторных крыс 2,5±0,1 ( $p < 0,05$ ). На фоне коррекции патологии миноксидилом коэффициент b/a достоверно возрастал до 2,4±0,09 ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой контроля (табл. 1). При коррекции ишемии никорандилом коэффициент b/a составил 2,2±0,06, что достоверно отличается как от значений в группе контроля ( $p < 0,05$ ), так и от значений в группе интактных крыс ( $p < 0,05$ ).

Оценку микроциркуляции проводили при помощи лазер-Доплер флоуметра Вioras-systems MP-150 и датчика TSD-144 (США). Для этого производили регистрацию уровня микроциркуляции в сетчатке в десяти точках по окружности склеры с шагом 1 мм. Запись кривой уровня микроциркуляции проводили в течение 20 секунд в каждой точке. Из полученных десяти значений выводили среднее, которое вносили в протокол и принимали за уровень микроциркуляции в сетчатке у данного животного. Из 10 полученных значений выводили среднее, которое принимали за уровень микроциркуляции в сетчатке в данной группе животных.

Результаты оценки уровня микроциркуляции в сетчатке крыс на 72 час реперфузии после моделирования ретинальной ишемии в экспериментальных группах представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты оценки уровня микроциркуляции в сетчатке крыс на 72 час реперфузии ( $M \pm m$ ), п.е. (перфузионные единицы)

№ п/п	Экспериментальные группы	Уровень микроциркуляции после 72 ч реперфузии
1	Интактные (n=10)	743,9±5,0 <sup>y</sup>
2	Ретинальная ишемия (n=10)	353,3±11,7*
3	Коррекция миноксидилом, 0,5 мг/кг (n=10)	739,5±14,1 <sup>y</sup>
4	Коррекция никорандилом, 0,86 мг/кг (n=10)	705,2±15,5 <sup>y</sup>

Примечание: \* -  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных; <sup>y</sup> -  $p < 0,05$  в сравнении с группой с ретинальной ишемией

Уровень микроциркуляции в сетчатке интактных крыс составил 743,9±5,0 п.е. Уровень микроциркуляции после моделирования ретинальной ишемии в группе контроля составил на 72 час реперфузии 353,3±11,7 п.е., что достоверно ниже значения в группе интактных животных ( $p < 0,05$ ). На фоне коррекции патологии миноксидилом уровень микроциркуляции в сетчатке достоверно возрастает до 739,5±14,1 п.е. ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой контроля. При коррекции ишемии никорандилом уровень микроциркуляции в группе возрастает до 705,2±15,5 п.е. и достоверно отличается от значений в группе контроля ( $p < 0,05$ ).

В связи с вышеизложенным следует, что коррекция ретинальной ишемии-реперфузии миноксидилом в дозе 0,5 мг/кг массы тела животного приводит к достижению более высоких показателей уровня микроциркуляции в сетчатке лабораторных крыс после

72 ч реперфузии по сравнению с коррекцией никорандилом в дозе 0,86 мг/кг массы тела животного и стремится к значениям в группе интактных крыс.

Таким образом, в предлагаемом способе введение миноксидила в дозе 0,5 мг/кг массы тела животного производится внутривенно через зонд однократно, что приводит к более выраженной коррекции ретинальной ишемии-реперфузии в эксперименте, чем в прототипе и аналоге, так как миноксидил открывает митохондриальные АТФ-зависимые К<sup>+</sup>-каналы, за счет чего реализуется эффект preconditionирования, что подтверждается достижением лучших показателей уровня ретинальной микроциркуляции и восстановлением электрофизиологической активности сетчатки.

#### (57) Формула изобретения

Способ профилактики ретинальной ишемии-реперфузии в эксперименте, включающий фармакологическое preconditionирование лекарственным средством путем однократного внутривенного введения его раствора лабораторному животному с последующим моделированием ишемии путем механического давления 110 мм рт.ст. на переднюю камеру глаза в течение 30 минут, отличающийся тем, что в качестве лекарственного средства за 60 минут до моделирования используют миноксидил в дозе 0,5 мг/кг массы тела животного, а ретинопротективный эффект миноксидила оценивают по результатам электроретинографии после 72 часов реперфузии.

25

30

35

40

45