



(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G09B 23/28 (2006.01); *A61K 31/498* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017105480, 21.02.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 21.02.2017

Дата регистрации:
 29.01.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.02.2017

(45) Опубликовано: 29.01.2018 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Мартынова Ольга Викторовна (RU),
 Покровский Михаил Владимирович (RU),
 Гуреев Владимир Владимирович (RU),
 Мартынов Михаил Алексеевич (RU),
 Костина Дарья Александровна (RU),
 Солгалова Анастасия Сергеевна (RU),
 Анциферов Олег Владимирович (RU),
 Петренко Анастасия Александровна (RU),
 Довгань Антон Павлович (RU),
 Шелякина Елена Васильевна (RU),
 Шкилева Ирина Юрьевна (RU),
 Нечаева Инна Николаевна (RU),
 Тверской Алексей 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: SAKLANI R et al. Pharmacological
 preconditioning by milrinone: memory
 preserving and neuroprotective effect in
 ischemia-reperfusion injury in mice. Arch
 Pharm Res. 2010 Jul;33(7):1049-57. RU 2281765
 С1, 20.08.2006. RU 2539630 С, 20.01.2015. US
 20140294874 А1, 02.10.2014. ДОЛЖИКОВА
 И.Н. и др. Влияние дистантного и
 фармакологического (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии и неврологии, и может быть использовано для профилактики ишемических состояний головного мозга. Способ включает предварительное, до моделирования ишемического состояния мозга,

введение лабораторному животному прекондиционирующего агента. В качестве такого агента используют тадалафил в дозе 1 мг/кг, который вводят однократно внутривенно через зонд. Через 60 минут проводят моделирование ишемии головного мозга путем

коагуляции двух вертебральных артерий и временной окклюзии двух общих сонных артерий. Способ обеспечивает выраженную коррекцию ишемии головного мозга у животного в

эксперименте за счет индукции тадалафилом механизмов метаболической адаптации и реализации эффекта preconditionирования. 4 ил., 6 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

preconditionирования на экспрессию эндоглина и эндотелиальной по-синтазы в почках в отдаленном периоде после ишемии-реперфузии. Научные ведомости, 2012, N 4 (123). Выпуск 17/1, с. 135-141. МАРТЫНОВА О.В. и др. Исследование поведенческих реакций при моделировании тотальной ишемии головного мозга. Кубанский научный медицинский вестник, 2015, N6 (155), с.77-82. LIU Z et al. Phosphodiesterase-5 inhibitor and rat lung ischemia-reperfusion injury. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2012 Feb;20(1):42-7.

R U 2 6 4 2 9 6 1 C 1

R U 2 6 4 2 9 6 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G09B 23/28 (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
G09B 23/28 (2006.01); *A61K 31/498* (2006.01)

(21)(22) Application: **2017105480, 21.02.2017**

(24) Effective date for property rights:
21.02.2017

Registration date:
29.01.2018

Priority:

(22) Date of filing: **21.02.2017**

(45) Date of publication: **29.01.2018** Bull. № 4

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Martynova Olga Viktorovna (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Gureev Vladimir Vladimirovich (RU),
Martynov Mikhail Alekseevich (RU),
Kostina Darya Aleksandrovna (RU),
Solgalova Anastasiya Sergeevna (RU),
Antsiferov Oleg Vladimirovich (RU),
Petrenko Anastasiya Aleksandrovna (RU),
Dovgan Anton Pavlovich (RU),
Shelyakina Elena Vasilevna (RU),
Shkileva Irina Yurevna (RU),
Nechaeva Inna Nikolaevna (RU),
Tverskoj Aleksej Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) METHOD FOR PREVENTION OF BRAIN ISCHEMIA

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to experimental pharmacology and neurology, and can be used to prevent ischemic brain conditions. Method includes a preliminary, prior to modeling the ischemic state of the brain, administration of a preconditioning agent to the laboratory animal. As such an agent, tadalafil is used at a dose of 1 mg/kg, which is injected once intragastrically through the probe. After

60 minutes, a simulation of cerebral ischemia is performed by coagulation of two vertebral arteries and temporary occlusion of two common carotid arteries.

EFFECT: method provides a frank correction of cerebral ischemia in an animal during the experiment due to the induction of tadalafil mechanisms of metabolic adaptation and the realization of preconditioning effect.

1 cl, 4 dwg, 1 ex, 6 tbl

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

По известным литературным источникам – ишемический инсульт или инфаркт мозга является основной патологией среди тяжелых форм сосудистых поражений мозга. В России данная патология занимает первое место, как причина потери трудоспособности, а второе место в структуре общей смертности (Мельникова Е.В. Нейропротекция при ишемии головного мозга [Текст] / Е.В. Мельникова, А.А. Шмонин // Фарматека. – 2012. - №9. – С. 36-42).

Профилактику и коррекцию ишемии головного мозга теоретически возможно осуществить с помощью фармакологического прекондиционирования, суть которого состоит в активации эндогенных защитных механизмов, снижающих степень повреждения при последующем длительном ишемическом эпизоде (Должикова И. Н. Дистантное и фармакологическое прекондиционирование с использованием эритропоетина и тадалафила при экспериментальной ишемии почек: диссертация кандидата биологических наук: 14.03.06 / И.Н. Должикова. – Белгород). Перспективным для изучения прекондиционирующего действия при ишемии головного мозга является ингибитор фосфодиэстеразы-5, тадалафил.

Известно техническое решение «Средство для профилактики или лечения острых и хронических нарушений мозгового кровообращения, применение и способ лечения» (RU № 2468813, публ. 10.12.2012), которое содержит фармацевтическую композицию, включающую в качестве активных компонентов метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин и холина альфосцерат при следующем соотношении компонентов, в мас. %: метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин 0,01-2,00; холина альфосцерат 98,00-99,99. Раскрыто также применение указанной фармацевтической композиции для изготовления средства и способ лечения.

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.

Известно техническое решение «Способ лечения церебральной ишемии» (RU № 2281765, публ. 20.08.2006). Сущность изобретения состоит в том, что в способе лечения церебральной ишемии на ее модели у млекопитающего животному вводят количества янтарнокислого бис[(2-гидроксиэтил)-N,N,N-триметиламиния]. Эффект снижения гибели нейронов мозга при введении янтарнокислого бис[(2-гидроксиэтил)-N,N,N-триметиламиния] оценивали на модели крыс с хронической ишемией мозга, вызванной перевязкой сонных артерий. Характер и механизм повреждения нейронов мозга в этой модели соответствует наблюдаемой при ишемическом инсульте. Гибель нейронов мозга оценивали количественно методом ЯМР ¹H in vivo по снижению уровня нейронального маркера N-ацетиласпартата (NAA) в мозге. NAA является хорошо известным неинвазивным маркером целостности нейронов. NAA обнаруживается исключительно в нейронах. Снижение NAA или отношения NAA к креатину (относительный уровень NAA) строго коррелирует с потерей нейронов при их повреждении или дегенерации. (Demougeot C et al. J Neurochem. 2004 90 (4): 776-83. Roitberg B et al. Neurol Res. 2003 25 (1): 68-78. Schuhmann MU et al. J Neurotrauma. 2003 20(8):725-43). Перевязка сонных артерий была выполнена у крыс самцов линии Wistar за 3 часа до первой инъекции.

Далее крысам в течение семи дней вводили и.п. инъекции физ. р-ра (контроль), 1 мг/кг или 50 мг/кг янтарнокислого бис[(2-гидроксиэтил)-N,N,N-триметиламиния]. На 15 день с момента перевязки измеряли уровень NAA в мозге методом ЯМР ^1H in vivo.

Основным недостатком способа является то, что ЯМР ^1H in vivo очень дорогостоящий метод диагностики. Не всегда есть возможность его проведения.

Задачей предлагаемого изобретения является способ профилактики ишемии головного мозга, включающий ингибитор фосфодиэстеразы-5, тадалафил, в качестве прекондиционирующего агента.

Задача достигается тем, в способе, включающем воспроизведение четырехсосудистой модели патологии и введение лабораторному животному тадалафила в дозе 1 мг/кг, который вводят однократно за 60 минут до эксперимента внутривенно через зонд в качестве прекондиционирующего агента, а через 60 минут проводят моделирование ишемии головного мозга путем коагуляции двух вертебральных артерий и временной окклюзии двух общих сонных артерий.

Механизм церебропротективного действия тадалафила, как и ФДЭ-5, заключается в воздействии на путь NO- цГМФ- протеинкиназа G. При активизации ПК- G происходит фосфорилирование K^+ каналов, снижение чувствительности мембраны по отношению к нервным импульсам и ее гиперполяризация. Далее происходит снижение концентрации свободного Ca^{+2} цитоплазмы. Эти механизмы являются основой вазодилатирующих эффектов оксида азота. Главную роль в этом механизме играет фосфодиэстераза-5. Именно она уменьшает накопление цГМФ (Должикова И. Н. Дистантное и фармакологическое прекондиционирование с использованием эритропоетина и тадалафила при экспериментальной ишемии почек: диссертация кандидата биологических наук: 14.03.06 / И.Н. Должикова. – Белгород).

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что:

- в качестве прекондиционирующего агента вводят однократно тадалафил в дозе 1 мг/кг за 60 минут до эксперимента внутривенно, за счет этого через 30 мин (первое защитное окно) после введения открываются АТФ-зависимые K^+ -каналы, что в последующем приводит к повышению резистентности тканей головного мозга, через 12-48 ч после введения тадалафила открывается 2 защитное окно, в котором эффект прекондиционирования реализуется в том числе за счет действия оксида азота (NO) и дальнейшего включения механизмов метаболической адаптации;

- эффективность препарата оценивается комплексно: 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.

Способ приводит к выраженной коррекции ишемии головного мозга, так как тадалафил в данной дозе открывает АТФ-зависимые K^+ -каналы и в дальнейшем индуцирует механизмы метаболической адаптации, за счет чего реализуется эффект прекондиционирования.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

Исследование выполнено на 50 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 230-260 г. Экспериментальные животные были разделены на 5 групп: 1) интактную (n=10), 2) ложнооперированную, 3) группу с двухсосудистой патологией (n=10), 4) группу с четырехсосудистой патологией (n=10), 5) группу с четырехсосудистой патологией и коррекцией тадалафилом (1 мг/кг, в/б), (n=10). Животные содержались в стандартных

условиях вивария НИУ «БелГУ» со свободным доступом к еде и воде. Содержание животных и постановка эксперимента проводилась в соответствии с требованием приказов № 1179 МЗ СССР от 11.10.1983 г. и №267 РФ от 19.06.2003 г., а также международным правилам «Guide for the Care and of Laboratory Animals».

5 Животным 3 группы моделировали двухсосудистую локальную ишемию: на 4 минуты перекрывали кровоток в общих сонных артериях. Крысам 4 группы была смоделирована тотальная четырехсосудистая ишемия головного мозга с ишемическим периодом 4 минуты. Животным 5 группы за 60 минут до моделирования тотальной ишемии, внутрижелудочно вводили ингибитор фосфодиэстеразы-5, тадалафил, в дозе 1 мг/кг.
10 Наркотизацию животных проводили препаратом «Золетил 100» 60 мг/мл и хлоралгидрат 150 мг/мл. Контроль верно выполненной методики осуществляли с помощью регистрации животным электроэнцефалограммы. Животных выводили из эксперимента через 72 часа с момента его начала, путем передозировки наркотических препаратов.

О выраженности противоишемического 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 $p < 0,05$.

20 ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Оценку неврологического дефицита у животных осуществляли на 1, 3, 7 и 14 сутки после моделирования патологии с помощью бальной шкалы по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (1996) (по среднему значению балла в группе) (Табл. 1), за контроль принимали группу интактных животных, которая статистически не отличалась от
25 ложнооперированных:

Таблица 1

Динамика тяжести неврологических нарушений в исследуемых группах по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (1996) (по среднему значению балла в группе) ($M \pm m$; $n=10$).

30

Период	Группы				
	интактные	ЛО	2-сос. 4-минутная ИГМ	4-сос. 4-минутная ИГМ	иФДЭ -5 +ИГМ
1 сутки	0	0	0,2±0,08*	2,05±0,49*	0,8±0,21*
3 сутки	0	0	0	1±0,42*	0,75±0,23*
7 сутки	0	0	0	1±0,44*	0,4±0,15*
14 сутки	0	0	0	0,4±0,44*	0,2±0,13*

35

Примечание: здесь и везде далее *- $p < 0,05$, #- $p > 0,05$ по отношению к контрольной группе крыс.

У крыс после 2-сосудистой ишемии головного мозга продолжительностью 4 минуты на первые сутки наблюдался легкий неврологический дефицит. Это проявлялось в вялости конечностей и замедленности движений и статистически не отличалось от группы ложнооперированных животных ($p > 0,05$). На 3, 7 и 14 сутки неврологическая симптоматика отсутствовала. На первые сутки после моделирования ИГМ неврологический дефицит у крыс с 4-сосудистой моделью и ишемическим периодом продолжительностью 4 минуты был со средней степенью тяжести ($p < 0,05$): у 100% крыс наблюдали вялость и замедленность движений, у 50% крыс был односторонний полуптоз правого глаза, у 10% двусторонний полуптоз, у 20% крыс наблюдался паралич задней левой лапы, тремор. Вялость и замедленность движений к 3 дню после моделирования

45

патологии исчезали. На 3, 7, 14 сутки сохранялся паралич задней левой конечности и полуптоз правого глаза. Неврологический дефицит, у группы крыс на фоне коррекции фармакологическим прекодиционированием тадалафилом, был с более легкой симптоматикой по сравнению с группой животных с ИГМ без введения препарата (p<0,05): у 40% крыс наблюдали вялость и замедленность движений, у 60%-односторонний полуптоз правого глаза. Вялость и замедленность движений у животных к 3 дню после моделирования патологии исчезали. На 3, 7, 14 сутки сохранялся полуптоз правого глаза. По сравнению с контрольной группой, животные этой группы были значительно активнее даже в первые сутки после моделирования патологии.

Поведенческий статус крыс оценивали с помощью теста приподнятого крестообразного лабиринта. Оценивались такие параметры, как суммарное время нахождения в темном рукаве, светлом, а также количество стоек и свешиваний (Табл. 2):

Таблица 2

Оценка поведенческой активности животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» ($M \pm m$; n=10).

Критерий	Группы				
	Интактные	ЛО	2-сос. 4-минутная ИГМ	4-сос. 4-минутная ИГМ	иФДЭ -5 +ИГМ
Темный рукав, t	154,4±4,5	156,2±4#	158,1±4,1#	170±1,5*	159±2,3*
Светлый рукав, t	26,6±4,3	23,8±4#	22,9±3,9#	10±1,5*	20,7±2,1*
Стойки, шт.	10,5±0,9	10,1±0,8#	7,9±0,6*	4,3±0,4*	7,7±0,8*
Свешивания, шт.	4,8±0,7	4,4±0,7#	3,3±0,3*	1,6±0,3*	3,6±0,6*

В 2-сосудистой 4-минутной модели патологии у животных наблюдалось небольшое снижение горизонтальной активности, вертикальной активности, что проявлялось в уменьшении количества стоек и свешиваний. Снижалось ориентировочно-исследовательское поведение, статистически значимо (p<0,05). В группе с 4-сосудистой 4-минутной ИГМ у животных наблюдалось значительное снижение горизонтальной активности, увеличение времени пребывания в темных рукавах. Снижение вертикальной активности проявлялось в снижении стоек, свешиваний приблизительно на 60%. Сохраняется минимальное ориентировочно - исследовательское поведение (p<0,05). В поведенческом тесте ПКЛ группа крыс с ИГМ и коррекцией тадалафилом проявляла себя более активно по сравнению с контрольной группой. Это проявлялось в увеличении горизонтальной и вертикальной активности (Табл. 2), что отражалось в большем количестве стоек и свешиваний (p<0,05). Ориентировочно - исследовательское поведение снижено, но не значительно.

Двигательная активность животных оценивалась с помощью теста актиметрии с инфракрасным мониторингом активности IR Actimeter (Табл. 3).

Таблица 3

Оценка поведенческой активности животных в тесте актиметрии ($M \pm m$; n=10).

Критерии	Группы				
	интактные	ЛО	2-сос. 4-минутная ИГМ	4-сос. 4-минутная ИГМ	иФДЭ -5 +ИГМ
Общая активность	939,9±40,5	851±49#	595,7±40,17*	406,9±59*	553,3±28,26*
Стереотипы движения	77,5±4,04	72,4±5,34#	42±2,83*	29,0±2,05*	35,7±2,31*
Максимальная скорость	42,1±2,41	36,6±1,80#	27,74±1,78*	22,01±2,09*	24,89±1,85*
Общая дистанция	2261,8±104,55	1797,47±103,20#	1290,52±93,09*	772,3±52,27*	1190,61±105,28*

Время отдыха	89,66± 7,54	111,71± 10,37#	155,41± 8,87*	196,39± 7,21*	159,5±8,61*
--------------	----------------	-------------------	------------------	------------------	-------------

При оценке двигательной активности животных в тесте актиметрии с инфракрасным мониторингом активности IR Actimeter установлено, что активность ложнооперированных крыс по сравнению с интактными снижалась, но статистически незначимо ($p > 0,05$). С увеличением времени ишемического периода в эксперименте активность крыс падает: уменьшается общая активность, количество стереотипных движений, максимальная скорость, общая дистанция. Время отдыха с увеличением времени ишемии головного мозга возрастает (Табл. 3). При сравнении двигательной активности животных контрольной группы с группой тадалафилом в тесте актиметрии на инфракрасном мониторе активности IR Actimeter установлено, что активность крыс с предварительным введением препарата выше ($p < 0,05$).

Далее осуществляли оценку уровня специфических маркеров повреждения головного мозга S100b и NSE в данных группах (Табл. 4).

Таблица 4

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

интактные		ЛО		2-сос. 4-минутная ИГМ		4-сос. 4-минутная ИГМ		иФДЭ -5 +ИГМ	
S100b	NSE	S100b	NSE	S100b	NSE	S100b	NSE	S100b	NSE
0,77±0,21	0,365±0,36	0,95±0,18	0,38±0,23	1,498±1,04	0,434±0,29	2,03±0,33*	0,547±0,22*	0,585±0,30#	0,212±0,31#

При анализе уровня S100b и NSE у животных всех экспериментальных групп наблюдали повышение концентрации маркеров в сыворотке крови. Статистически незначимо ($p > 0,05$) повышение концентрации маркеров наблюдали у ложнооперированных животных (гипотетически связано с оперативным вмешательством и действием общего наркоза на организм), при двухсосудистой 4-минутной ИГМ. Статистически значимо ($p < 0,05$) повышение концентрации было в группе с четырехсосудистой 4-минутной и ИГМ. При анализе уровня S100b и NSE у животных группы с ИГМ с предварительной коррекцией тадалафилом наблюдали снижение концентрации маркеров повреждения даже ниже уровня контрольной группы ($p > 0,05$).

При обзорной микроскопии у интактных животных полученные результаты соответствовали описаниям цитоархитектонических особенностей лобной доли и гиппокампа. 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 четко определялись одно или два центрально расположенных ядрышка (Фиг. 1), где: А - лобная доля интактной крысы, X 100, окр. гематоксилин+эозин; Б – гиппокамп интактной крысы, X 400, окр. гематоксилин+эозин.

Область лобной доли характеризовалась низкой плотностью расположения, а область СА1 гиппокампа высокой плотностью, средних по размеру, нейронов. Морфометрические изменения нейронов при двухсосудистой модели ишемии имели общую тенденцию к увеличению и характеризовались увеличением максимально и минимального диаметров перикарионов, их периметра и площади. Диаметр, площадь и периметр ядер нейронов также увеличивались. Общее количество гиперхромных нейронов составило 36,7%, а двуядрышковых - 16,7% (Табл. 5). Изменения аналогичных показателей в области СА1 гиппокампа были менее значительны, однако общая тенденция к их увеличению прослеживалась (Табл. 6). Качественные изменения характеризовались увеличением количества гиперхромных нейронов, хроматолизом,

умеренной дезорганизацией слоев в области СА1. Тела клеток теряли четкость контуров, деформировались. Ядерные изменения были полиморфными и проявлялись как набуханием, так и пикнозом отдельных ядер. В некоторых нейронах наблюдалось смещение ядра на периферию перикариона. Увеличение количества двуядрышковых нейронов в сочетании с общим увеличением площади ядра и перикариона является морфологическим проявлением регенераторных процессов и повышением их функциональной активности, возникающих в ответ на локальную ишемию головного мозга (Фиг. 2 - двухсосудистая модель ишемии головного мозга), где: А - лобная доля, окр. гематоксилин+эозин; Б – СА1 область гиппокампа, окр. тионином по Нисслю, X 400.

При четырехсосудистой модели ишемии отмечалась выраженная гиперхромия нейронов лобной доли с периваскулярным и перичеллюлярным отеком. 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 (Фиг. 3 - четырехсосудистая модель ишемии головного мозга), где: А - лобная доля, X 400, окр. гематоксилин+эозин; Б – СА1 область гиппокампа, X 400, окр. тионином по Нисслю.

При введении за час до моделирования четырехсосудистой патологии тадалафила в дозе 1 мг/кг, морфологические изменения нейронов носили, преимущественно, некробиотический характер. Количество погибших нейронов было значительно ниже, чем без коррекции тадалафилом. В гиппокампе нарушение стратификации слоев носили умеренный характер (Фиг. 4 - четырехсосудистая модель ишемии головного мозга при коррекции тадалафилом), где: 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 четырехсосудистой моделью ишемии мозга без коррекции тадалафилом. Достоверно отличались минимальный диаметр, периметр и площадь нейронов, диаметр, периметр и площадь ядер ($p < 0.05$). Количество двуядрышковых нейронов достоверно больше при коррекции тадалафилом ($p < 0.05$), 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 двухсосудистой модели ишемии головного мозга крыс отмечались умеренные некробиотические изменения с признаками активации регенераторных процессов как в нейронах лобной доли, так и гиппокампа. При четырехсосудистой модели ишемии повреждения большинства нейронов были необратимы, без признаков активации репаративных процессов. Коррекция ишемического повреждения тадалафилом 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	2-сосудистая ИГМ	4-сосудистая ИГМ	иФДЭ-5+ИГМ
-----------	-----------	------------------	------------------	------------

Max D	12,51±0,29	13,23±0,42#	13,54±0,63#	8,57±0,35#
Min D	8,46±0,28	10,41±0,40*	6,58±0,21*	5,62±1,51*
Периметр клетки	35,87±0,90	41,58±1,27*	38,60±1,38*	23,83±4,46*
S клетки	83,33±3,25	120,48±5,81*	75,45±3,62*	40,67±1,28*
Периметр ядра	21,98±0,89	29,68±1,01*	23,58±0,65*	16,38±1,89*
S ядра	35,08±2,21	58,61±4,21*	38,90±2,02*	20,56±0,39*
D Ядра	6,28±0,24	9,15±0,42*	7,37±0,24*	5,64±0,11*
D Ядрышка	1,88±0,07	Гипохромные нейроны-(46,7%) 2,65±0,50 Гиперхромные-(36,7%) Двудрышковые-(16,7%)- 2,40±0,24	Гипохромные нейроны-(10%)1,67±0,18 Гиперхромные-(90%) Двудрышковые-	Гипохромные нейроны-(43,4%) 1,63±0,16 Гиперхромные-(43,4%) Двудрышковые- (13,2%) 1,26±0,10

Примечание: *-при (p<0.05), #- при (p>0.05). За контроль принимали гр. интактных животных. В группе «иФДЭ-5+ИГМ» - гр. крыс с четырехсосудистой ИГМ.

Таблица 6

Морфометрическая характеристика нейронов гиппокампа крыс (M±m; n=30).

Параметры	интактные	2-сосудистая ИГМ	4-сосудистая ИГМ	иФДЭ-5+ИГМ
Max D	11,85±0,29	13,64±0,16*	11,38±0,16#	8,49±0,21*
Min D	8,03±0,28	6,90±0,20*	6,34±0,20*	5,70±0,78*
Периметр клетки	33,01±0,80	37,22±0,34*	30,40±0,34*	24,30±2,30*
S клетки	68,90±2,63	77,14±2,63*	57,71±1,76*	38,94±0,81*
Периметр ядра	22,66±0,72	27,11±0,47*	20,86±0,47*	17,31±1,28*
S ядра	38,06±2,50	50,41±1,25*	29,96±1,25*	20,98±0,26*
D Ядра	6,23±0,26	6,47±0,25#	7,09±0,25*	5,56±0,07*
D Ядрышка	2,38±0,07	Гипохромные нейроны- Гиперхромные-(86,7%) Двудрышковые-(13,3%)- 2,03±0,11	Гипохромные- Гиперхромные-(90%) Двудрышковые-(10%)- 1,83±0,23	Гипохромные нейроны- Гиперхромные-(90%) Двудрышковые-(10%)- 1,83±0,23

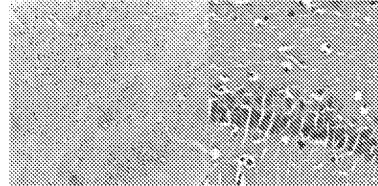
Примечание: *-при (p<0.05), #- при (p>0.05). За контроль принимали гр. интактных животных. В группе «иФДЭ-5+ИГМ» - гр. крыс с четырехсосудистой ИГМ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженной коррекции ишемических повреждений головного мозга в условиях тотальной четырехсосудистой модели ишемии головного мозга крыс иФДЭ-5, тадалафилом в дозе 1 мг/кг массы тела животного при однократном внутривенном введении.

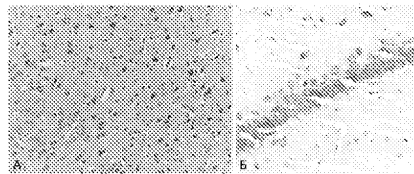
(57) Формула изобретения

Способ профилактики ишемии головного мозга, включающий воспроизведение четырехсосудистой модели патологии и введение лабораторному животному тадалафила в дозе 1 мг/кг, который вводят однократно за 60 минут до эксперимента внутривенно через зонд в качестве прекодиционирующего агента, а через 60 минут проводят моделирование ишемии головного мозга путем коагуляции двух вертебральных артерий и временной окклюзии двух общих сонных артерий.

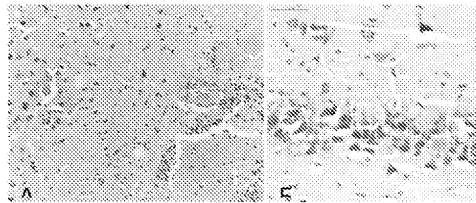
СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ
ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА



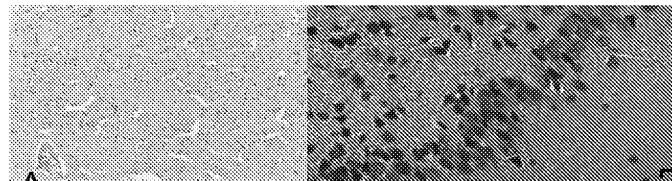
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4