



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016139812, 10.10.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.10.2016Дата регистрации:
18.07.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.10.2016

(45) Опубликовано: 18.07.2017 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский
институт биоорганической химии им. Г.Б.
Елякова ДВО РАН, зав. патентным отделом
Стадниченко Н.И.

(72) Автор(ы):

Агафонова Ирина Григорьевна (RU),
Ануфриев Виктор Филиппович (RU),
Машнев Борис Павлович (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Тихоокеанский институт
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской
академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 9108189 A1, 13.06.1991. А.Е.
Закирова и др. Синтез 6-гидрокси-2,3-
диглутатионил-7-этилнафтазарина и анализ
сопутствующих продуктов //Сборник
тезисов докладов XV Всероссийской
молодежной школы-конференции по
актуальным проблемам химии и
биологии. МЭС ТИБОХ, Владивосток 5-15
сентября 2014 г. : сборник трудов.
Владивосток : ДВО РАН. - 2014. - С. (см.
прод.)

(54) Средство для лечения ишемии сосудов головного мозга

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается применения 5,6,8-тригидрокси-2,3-диглутатионил-7-этил-1,4-нафтохинона в качестве средства для лечения ишемии сосудов головного мозга при острых нарушениях мозгового кровообращения. Изобретение приводит к более быстрому снижению зоны отека в сравнении с аналогами. Низкая токсичность 5,6,8-тригидрокси-2,3-

диглутатионил-7-этил-1,4-нафтохинона, хорошая растворимость в физиологическом растворе и длительность хранения выгодно отличают заявляемое средство от аналогов. Изобретение обеспечивает расширение арсенала средств, предназначенных для лечения ишемии сосудов головного мозга при острых нарушениях мозгового кровообращения. 8 ил., 5 табл.

(56) (продолжение):

70. Anufriev VPh. Synthesis of some hydroxynaphthazarins and their cardioprotective effects under ischemia-reperfusion in vivo // Bioorg Med Chem Lett. - 1998.- 17;8(6). - P. 587-592. RU 2362573 C1, 27.07.2009. WO 2015183985 A2, 03.12.2015. RU 2137472 C1, 20.09.1999.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 625 740**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 31/122 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2016139812, 10.10.2016**

(24) Effective date for property rights:
10.10.2016

Registration date:
18.07.2017

Priority:

(22) Date of filing: **10.10.2016**

(45) Date of publication: **18.07.2017** Bull. № 20

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku,
159, FGBUN Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoy khimii im. G.B. Elyakova DVO
RAN, zav. patentnym otdelom Stadnichenko N.I.**

(72) Inventor(s):

**Agafonova Irina Grigorevna (RU),
Anufriev Viktor Filippovich (RU),
Mashnev Boris Pavlovich (RU),
Kozlovskaya Emma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoy khimii im. G.B. Elyakova
Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj
akademii nauk (TIBOKH DVO RAN) (RU)**

(54) **MEANS FOR TREATING ISCHEMIA OF VASCULAR BRAINS**

(57) Abstract:

FIELD: pharmacology.

SUBSTANCE: invention concerns the use of 5,6,8-trihydroxy-2,3-diglutathionyl-7-ethyl-1,4-naphthoquinone as an agent for the treatment of cerebral ischemia in acute cerebrovascular disorders. The invention results in a faster reduction of the edema zone

in comparison with analogues.

EFFECT: expansion of the arsenal of funds intended for the treatment of cerebral ischemia in acute disorders of cerebral circulation, low toxicity, good solubility in physiological saline and storage time.

8 dwg, 5 tbl

R U 2 6 2 5 7 4 0 C 1

1 C 0 2 6 2 5 7 4 0 R U

Изобретение относится к медицине, конкретно к клинической фармакологии, и может быть использовано для лечения ишемического повреждения мозга.

Одним из известных препаратов, улучшающих кровоснабжение мозга, является кавинтон [Машковский М.Д. // Лекарственные средства, 15 издание, Москва, Новая Волна, 2005, 407-408]. Его лечебное действие является однонаправленным и заключается в расширении сосудов головного мозга. Положительным эффектом кавинтона, как избирательного церебрального вазодилататора у больных с цереброваскулярными расстройствами, является активация гликолиза мозговой ткани [Чуканова Е.И. // Кавинтон в комплексном лечении пациентов с хронической цереброваскулярной недостаточностью. Ж. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2009. Т. 109. №9. С. 35-39].

Однако этого эффекта недостаточно для улучшения кровоснабжения мозга. Известно, что ишемия мозговой ткани приводит к резкому ухудшению не только кровоснабжения, но и трофики ткани - накоплению окисленных продуктов обмена веществ, что в свою очередь инактивирует мембраносвязанные ферменты (супероксиддисмутазу и каталазу) и приводит к дальнейшему расстройству обмена веществ. Для предотвращения этих последствий необходимо восстановление механизмов антиоксидантной защиты мозга.

Еще одним известным препаратом для лечения больных ишемией является антиоксидантный препарат эмоксипин (6-метил-2-этилпиридин-3-ол), действие которого было изучено на моделях экспериментального ишемического инсульта [28]. Эмоксипин оказался эффективным при терапии острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), вызванного окклюзией сонных артерий крыс. Он достоверно снижал смертность животных, уменьшал тяжесть локальной и общемозговой неврологической симптоматики, увеличивал латентный период развития выраженных клинических проявлений. Высокая терапевтическая эффективность эмоксипина в эксперименте на крысах обусловлена ингибированием свободно-радикального окисления мембранных липидов, что обеспечивает снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Агафонова И.Г. и др. Сравнительный анализ изменения мозгового кровообращения у крыс с индуцированным острым нарушением мозгового кровообращения методом магнитно-резонансной томографии // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. №1. С. 104-107]. Эмоксипин не оказывает влияния на образовавшиеся тромбы во время ишемии.

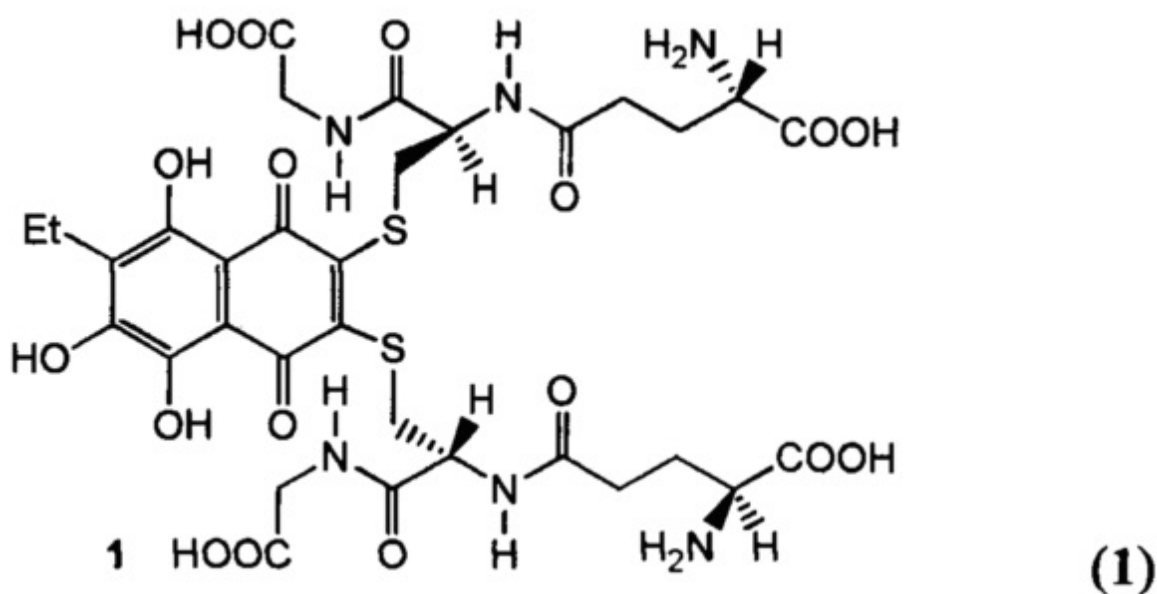
Известен препарат гистохром®, разработанный в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН (ТИБОХ), используемый для лечения ишемической болезни сердца и ограничения зоны некроза при инфаркте миокарда [RU 2137472 C1, 20.09.1999], воспалительных заболеваний сетчатки и роговицы глаза [RU 2134107 C1, 10.08.1999], а также для лечения геморрагического инсульта [RU 2266737 C1, 27.12.2005]. Он представляет собой лекарственную форму индивидуального вещества - природного хиноидного пигмента морских беспозвоночных эхинохрома А (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона, номер государственной регистрации Р №002362/01-2003) [RU 1833544 C].

Эффективность гистохрома при геморрагическом инсульте была изучена в клинике у больных с кровоизлиянием в головной мозг, развившимся вследствие артериальной гипертензии. Препарат назначался ежедневно на протяжении пяти дней для введения по 5 мл 1% раствора гистохрома внутривенно. Характер инсульта верифицировался методом магнитно - резонансной томографии (МРТ). Согласно данным МРТ были выявлены размеры гематомы и смещение срединных структур мозга. Положительный терапевтический эффект после применения гистохрома был отмечен у неврологических

больных через две недели после терапии.

Однако гистохром достаточно лабилен на воздухе; его субстанция характеризуется низкой растворимостью в воде и физиологическом растворе.

С целью поиска веществ, свободных от вышеуказанных недостатков, в ТИБОХ был синтезирован ряд полигидрокси-1,4-нафтохинонов и, в частности, 5,6,8-тригидрокси-2,3-диглутатионил-7-этил-1,4-нафтохинон формулы (1), обозначенный (GluNAZ) [SU 1822549 A3, 20.08.1996; Anufriev V.Ph., Novikov V.L., et. al. // Synthesis of some hydroxynaphthazarins and their cardioprotective effects under ischemia-reperfusion in vivo. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998. Vol.8. No. 6. P. 587-592].



Фармакологические исследования показали, что эти соединения обладают свойством протектора миокарда при его ишемии и реперфузии, в частности, GluNAZ сокращает зону инфаркта миокарда до 50%. Эффект GluNAZ и других производных нафтазарина в одних и тех же экспериментальных условиях сравнивался с верапамилом (блокатором кальциевых каналов) и нитроглицерином (кардиопротекторным средством). Было установлено, что соединение GluNAZ увеличивает продолжительность жизни животных после индуцированной ишемии миокарда, улучшает неврологический статус животных и поисково - исследовательскую активность животных.

Указание на его противоишемические свойства, проявляемые при воздействии на сосуды головного мозга, подверженные ишемическому повреждению, в доступной патентной и научно-технической литературе не обнаружено.

Задача изобретения - расширение арсенала средств для лечения головного мозга от ишемического повреждения при острых нарушениях мозгового кровообращения.

Поставленная задача решена применением 5,6,8-тригидрокси-2,3-диглутатионил-7-этил-1,4-нафтохинона в качестве средства для лечения сосудов головного мозга от ишемического повреждения при острых нарушениях мозгового кровообращения.

GluNAZ нормализует механизм антиоксидантной защиты ткани мозга при ишемии и гипоксии. Его противоишемическое действие обусловлено антигипоксическим и антиагрегантным эффектом, увеличением кровоснабжения мозга. Изобретение может быть использовано для лечения ишемического повреждения мозга.

Новое применение GluNAZ в качестве средства для лечения головного мозга от ишемических повреждений при острых нарушениях мозгового кровообращения не вытекает из уровня техники в данной области и не очевидно для специалиста.

Соединение GluNAZ получено, как описано в SU 1822549 A3, 20.08.1996 (пример 6).
Исследование противоишемического действия GluNAZ на сосуды головного мозга
Авторами проведено сравнительное изучение терапевтического действия заявляемого
5 средства - GluNAZ и препарата гистохром®, который применяется для лечения
геморрагического инсульта.

Изучение противоишемического эффекта GluNAZ проводили на крысах линии Вистар.
С этой целью были выполнены следующие исследования.

Тестирование животных перед экспериментом

Для определения устойчивости к эмоциональному стрессу все животные за неделю
10 до операции были протестированы в тесте «Открытое поле» и на основании полученных
результатов разделены на три группы: 1 - устойчивые, 2 - предрасположенные к стрессу,
3 - средние (промежуточные) [Агафонова И.Г., Колосова Н.Г. и др. // Влияние
гистохрома на состояние сосудов головного мозга и поисково-исследовательскую
активность преждевременно стареющих крыс OXYS. Магнитно-резонансная томография
15 в диагностике хронической ишемии. Бюллетень экспериментальной биологии и
медицины. 2007. Т. 143. Вып. 4. С. 446-450]. Для эксперимента были отобраны животные,
предрасположенные к эмоциональному стрессу.

Модель острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК)

В исследование были включены 72 крысы-самки линии Вистар в возрасте 8 месяцев
20 и массой 200-220 г. Животные были размещены по 2 особи в клетке, находились в
стандартных условиях содержания в виварии при естественном световом режиме и
свободном доступе к воде и пище.

Индукцию ОНМК вызывали окклюзией левой средней мозговой артерии (лСМА) у
предварительно обездвиженных крыс внутрибрюшинной инъекцией раствора рометара
25 (xylazinum, SPORA, Prague) в концентрации 5,5 мг/кг и раствора реланиума в
концентрации 37 мг/кг. Крысам была наложена постоянная лигатура на левую среднюю
мозговую артерию согласно [Агафонова И.Г., Котельников В.Н. и др. // Сравнительное
изучение влияния гистохрома и мексидола на структурно-функциональные
характеристики мозга преждевременно стареющих крыс OXYS методом МРТ. Бюллетень
30 экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 150. Вып. 12. С. 686-691].

В левой средней мозговой артерии, после наложения постоянной лигатуры, был
сделан прокол иглой для удаления крови из артерии, а затем в артерию снова была
введена собранная из проколотовой артерии кровь крысы. В качестве контроля
использовали ложно оперированных животных.

35 После индукции ишемии у животных был определен каскад ишемических
повреждений. После окклюзии лСМА в контрольной группе отмечалось до 40% падения
животных в первые сутки после операции. Из выживших животных были сформированы
контрольная и экспериментальные группы по 12 голов в каждой. В таблице 1 приведены
данные о количестве выживших животных после терапии.

40

45

Таблица 1

**Количество выживших животных после терапии
(% - процент выживших животных)**

Вещество /время	3 ч	%	24 ч	%	72 ч	%	1 нед.	%	3 нед.	%	1 мес	%
Контроль (ОНМК)	8/12	30	7/12	40	7/12	40	7/12	40	7/12	40	7/12	40
Гистохром	10/12	20	10/12	20	10/12	20	10/12	20	10/12	20	10/12	20
GluNAZ	10/12	20	10/12	20	10/12	20	10/12	20	10/12	20	10/12	20

Оценка поведенческих реакций животных

По мере нарастания симптомов нарушения мозгового кровообращения, вызванного механической окклюзией лСМА, отмечено нарастание у животных когнитивных расстройств. Задержка латентного периода выхода оперированных животных в центр исследуемого пространства через 24 ч после операции составила 21-30 мин по сравнению с интактным контролем (1-2 мин). Через 48 ч после операции время латентного периода сократилось до 18-21 мин. Через 72 ч время латентного периода сократилось до 17-20 мин. Через неделю латентный период существенно сократился, приблизившись к 7-12 мин. Через три недели латентный период восстанавливался до нормы 1-3 мин.

После терапии эффект исследуемых веществ в течение первых 48 ч статистически не отличался. Время латентного периода составляло: через 24 часа - 21-24 мин для обоих препаратов гистохром/GluNAZ; через 48 часов 13-16/11-14 мин, соответственно; через 72 часа 12-16/7-10 мин; через неделю 9-12/3-7 мин; через три недели 7-12/3-6 мин. В промежутках животные не тестировались, что исключало фактор тренировки.

На фиг. 1 представлены результаты исследования поведенческой реакции крыс после ОНМК. Выход животного в центр поля.

Оценка неврологических нарушений

Оценку неврологических нарушений проводили по шестибальной шкале Menzes. Она состоит из следующих позиций: 6 - отказ вытянуть левую переднюю лапу полностью; 5 - неустойчивое кружение налево; 4 - постоянное кружение налево; 3 - падение налево; 2 - никакого движения; 1 - отсутствие спонтанных движений; 0 - подавленный уровень сознания. Оценку симптомов по шкале проводили за сутки до операции, и после через 6, 12, 24, 48 и 72 ч, затем 7, 14 и 21 суток. У контрольных животных после операции отмечен подавленный уровень сознания. Около 40% животных в контроле погибли, у остальных крыс неврологический статус восстанавливался медленно. Через 48 ч крысы начинали двигаться с падением и кружением налево. Через 72 ч начинали двигаться с неустойчивым движением налево. Животные экспериментальных групп после терапии препаратами восстанавливались быстрее и уже через 48 ч начинали двигаться с неустойчивым движением налево.

На фиг. 2 представлены результаты исследования неврологического статуса животных после терапии.

Острая токсичность

Для определения токсичности использовали лабораторных белых беспородных мышей. Острую токсичность препаратов оценивали по формуле Кербера:

$$LD_{50}=LD_{100}-\Sigma(z \times d)/m;$$

где ЛД₅₀ - показатель гибели 50% животных; ЛД₁₀₀ - показатель гибели всех животных; z - половина суммы числа животных, павших от двух последних доз; d -

интервал между каждыми двумя последними дозами; m - число животных на каждую дозу [Бойд У. Основы иммунологии, (под ред. Гурвич А.Е.) М.: Мир. 1969. 647 С.]. В результате тестирования препаратов была установлена доза 50%-ной гибели животных: LD₅₀ гистохрома >30 мг/кг; LD₅₀ GluNAZ >1480 мг/кг.

Терапия

Курсовое лечение исследуемыми препаратами проводили согласно инструкциям к применению 1% гистохрома, как препаратом сравнения. Раствор 1% гистохрома вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг, пятикратно, в течение 5 дней, через неделю и через две недели повторяли схему. GluNAZ вводили в той же дозе и по той же схеме, за одним исключением - однократную дозу делили пополам и вводили два раза в сутки. Первую инъекцию препаратов начинали через 15 мин после операции. Следующую инъекцию делали через сутки. Ложнооперированным животным вводили физиологический раствор в эквивалентной дозе по схеме, идентичной введению препаратов.

Измерение артериального давления

Уровень артериального давления (систолического и диастолического, САД/ДАД) измеряли у спящих крыс, чтобы избежать излишнего элемента волнения. Введение исследуемых веществ intactным крысам не вызывал резкого изменения артериального давления, после операции резкого снижения артериального давления также не отмечалось. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние исследуемых веществ на изменение артериального давления (АД) (систола/диастола - САД/ДАД) крыс линии Вистар после индукции ОНМК, (n = 8)

Вещество	САД/ДАД до операции	САД/ДАД после операции
Контроль	111.6 ± 6,3 / 82.1 ± 4.2	148.6 ± 8.1 / 114.1 ± 3.1
Гистохром	122.3 ± 3,6 / 86.3 ± 3.5	146.1 ± 7.2 / 123.2 ± 6.8
GluNAZ	118.3 ± 5,2 / 80.4 ± 5.2	146.8 ± 5.1 / 118.5 ± 4.5

Данные представлены как M ± sd., (p < 0,01)

Электрокардиография

На протяжении всего эксперимента вели мониторинг ЭКГ, частоту сердечных сокращений (ЧСС), а также контролировали температуру и дыхание животных во время и после операции. Для этого была использована приставка к томографу «Animal Physiological Monitoring and Gating System», предназначенная для мониторинга ЭКГ, ЧСС, дыхания и температуры тела животных. Данные ЭКГ снимали у наркотизированных животных. Работу сердечной мышцы регистрировали во II втором отведении.

На фиг. 3 (а-в) представлена ЭКГ крыс до и после индукции острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу: а) ЭКГ intactного животного до операции, сердечный ритм в норме; б) состояние тахикардии через 15 мин после операции; в) состояние брадикардии через 1 ч после операции. Через неделю после терапии обоими препаратами ЭКГ и ЧСС стабилизировались до нормы контрольного животного.

Томография и ангиография

Томография головного мозга и ангиография сосудов были выполнены на томографе для экспериментальных исследований «PharmaScan US 70/16» (Bruker) с напряженностью магнитного поля 7.0 Тесла, частотой процессора 300 MHz и катушкой типа BGA 09P.

Используемые протоколы томографии: Turbo spin echo sequence для получения T_1 - взвешенных изображений (T_1 -ВИ) и T_2 - взвешенных изображений (T_2 -ВИ).

Используемые протоколы ангиографии: 3 - Dimensional Time of Flight (3D-TOF) ангиография и 2D-TOF flow compensation, PC angiography, Head_Angio.

Перед сканированием животных обездвигивали внутрибрюшинной инъекцией раствора рометара (xylazinum, SPORA, Prague) в концентрации 5,5 мг/кг и раствора реланиума в концентрации 37 мг/кг. Первое сканирование животного проводили до операции, второе сразу после операции.

Трехмерное изображение сосудистого бассейна получали в трехмерном изображении FLASH_3D со следующими параметрами: TR/TE=15.0/2.2; угол наклона 20; поле изображения 4,0/4,0/4,0; эффективная толщина среза 40 мм; перекрытие 40,0 мм; матрица 256/192/192 элементов; одно усреднение сигнала, время сканирования 14 мин. С помощью программного обеспечения томографа была выполнена MIP - реконструкция сосудов (Maximal Intensity Projection) для выявления вазомоторной реакции с использованием пакета ROI (Region of Instrument), предназначенного для обчета данных. Оценку сосудистого бассейна выполняли после MIP - реконструкции. Диаметр сосудов церебрального бассейна крыс в течение эксперимента измеряли с использованием двух точек устанавливаемых MPT - курсором: первой - на границе адвентиция / медиа латеральной стенки артерии, второй - на границе медиа / адвентиция медиальной стенки до и после операции.

На фиг. 4 представлена ангиография ГМ крысы линии Вистар через 15 мин после окклюзии лСМА, где верифицировано отсутствие кровенаполнения артерий средней мозговой артерии после индукции ОНМК. В зоне левого полушария регистрируется потеря сигнала от артерий, а в зоне правого полушария происходит усиление интенсивности сигнала от артерий неповрежденного полушария.

Дальнейший мониторинг артериального кровенаполнения показывает, что постепенно, в течение двух недель происходит перераспределение кровенаполнения по свободным от окклюзии артериям. В контрольной группе животных после операции интенсивность сигнала от артерий неповрежденного полушария интенсивно увеличивалась в течение трех суток, затем начинала снижаться. При оперативной терапии исследуемыми веществами, в интервале терапевтического окна, интенсивность сигнала от артерий левого полушария постепенно увеличивалась в среднем до 24% по сравнению с контролем. Это говорит о восстановлении кровоснабжения мелких артерий после ишемии. Интенсивность сигнала от артерий правого полушария также менялась. У контрольных животных после операции она была увеличена почти до 20% и в течение трех суток постепенно снижалась. Это говорит о перераспределении кровенаполнения мелких артерий. Изменение размеров мозговых артерий (в мм) после окклюзии представлено в таблице 3.

Таблица 3

Изменение размеров правой средней мозговой артерии (мм)
до и после окклюзии лСМА

Время	Контроль до окклюзии	Контроль после окклюзии	Гистохром,	GluNAZ,
3ч	0.8 ± 0.01	$1.4 \pm 0.08\#$	1.2 ± 0.08	1.2 ± 0.03
24 ч	0.8 ± 0.07	$1.4 \pm 0.05 \#$	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.06
72 ч	0.8 ± 0.1	$1.4 \pm 0.10\#$	$1.0 \pm 0.09^\wedge$	$1.0 \pm 0.05^\wedge$

- значимые различия по отношению к контролю ($p < 0,05$); ^ - эффект вещества.

Статистический анализ

Результаты обрабатывали по правилам вариационной статистики с использованием пакета программы MS Office Excel 2003 и пакетом программ STATISTICA 5.5.

Достоверность различий между группами вычисляли t-критерием Стьюдента с определением средней арифметической (М) и ее стандартной ошибки (m). Достоверным считали значение при $p < 0,05$. Количество измерений размера сосудов было выполнено программным обеспечением томографа и составило до 90 измерений на каждую крысу (таблицы 2, 3).

Томография

Через сутки после операции у крыс начали появляться гиперинтенсивные зоны в области коры головного мозга. На фиг. 5 (1-16) продемонстрированы участки головного мозга на T_2 -ВИ. Для количественной оценки зоны повреждения, вызванного ишемией, мозг сканировали в трех направлениях: фронтальной, сагиттальной и аксиальной плоскостях. Для получения T_2 -взвешенных изображений (T_2 -ВИ) использовали импульсную последовательность Head_Turbo_RARE_ T_2 со следующими параметрами:

матрица 256×256 , толщина среза 1 мм, площадь обзора $4.0 \times 4.0 \text{ см}^2$, TR/TE - 2500/33.0 мсек. Для получения T_1 -взвешенных изображений (T_1 -ВИ) использовали импульсную последовательность Head Turbo RARE T_1 : матрица 256×192 , толщина среза 1 мм, площадь обзора $4.0 \times 4.0 \text{ см}^2$, TR/TE - 1300/9.0 мсек с использованием программного обеспечения томографа ParaVision 3.0.2. Сканирование животных проводили до операции (контроль) и через 15 мин после операции. Далее мониторинг велся через 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч; затем - через 7, 14 и 21 суток [Агафонова И.Г., Колосова Н.Г. и др. Влияние гистохрома на состояние сосудов головного мозга и поисково-исследовательскую активность преждевременно стареющих крыс OXYs. Магнитно-резонансная томография в диагностике хронической ишемии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. Т. 143. Вып. 4. С. 446-450].

На фиг. 5 показаны изображения ГМ до операции (1-8) и после операции (9-16). На изображениях (12-14) - полукругом обведен участок мозга, где прослеживаются зоны точечного ишемического повреждения в виде гиперинтенсивных точек на T_2 -ВИ по сравнению с контролем (3-5). Зона отека, вызванная ишемией, наблюдалась в левом полушарии. Через 24 ч после ишемии на T_2 -ВИ определялась зона повышенного сигнала за счет развития цитотоксического отека. По результатам морфометрического анализа показано, что поврежденное полушарие деформировано, и его объем увеличивался на 11-14% по сравнению с контралатеральным полушарием за счет субарахноидального пространства и сдавливания желудочков. К концу недели у оперированных крыс объем деформированного полушария уменьшался, не достигая первоначального на 3-6%. Объем отека контрольных оперированных крыс верифицировался уже через сутки на T_2 -ВИ и через неделю достигал $39 \pm 4,3\%$ от всего объема полушария, ($P < 0,05$).

Полученные данные показывают, что на разработанной модели ишемии мозга экспериментальных животных, основной очаг поражения развивается в первые сутки после начала ишемии. При этом у контрольных оперированных животных очаг продолжал увеличиваться за счет зоны пенумбры. У леченых животных зона цитотоксического отека не увеличивалась.

Локализация очагов повреждения полностью совпадала с гипотетическими зонами мозга, ответственными за иннервацию конечностей животных. Степень ответа поврежденной лапы (контралатеральной поврежденному полушарию) снижалась

постепенно в течение двух недель и к концу этого периода почти приближалась к норме до $92 \pm 2,6\%$, ($p < 0,05$).

У леченых крыс процесс восстановления поврежденной зоны мозга происходил быстрее, к концу первой недели степень ответа составляла $87 \pm 5,4\%$, ($P < 0,05$). При этом через две недели восстанавливался вес животных (контрольных и леченых) со $186,5 \pm 5,2$ г после операций почти до первоначального $226,2 \pm 3,3$ (по сравнению с интактными - $241 \pm 2,1$).

В течение «терапевтического окна» - отрезка времени, равного 3-6 ч, проводили терапию исследуемыми препаратами. Длительность существования «ишемической полутени» индивидуальна для каждого животного. У более гиперактивных крыс (предрасположенных к стрессу) этот эффект наблюдался быстрее, по сравнению с крысами более пассивного статуса, поэтому в эксперименте оценивали крыс, предрасположенных к стрессу. Формирование очага ишемии у контрольных оперированных животных увеличивалось в течение недели. У леченых животных зона отека после ишемии была меньших размеров (таблица 2).

При окклюзии лСМА происходит целый каскад повреждений, в частности агрегация тромбоцитов и увеличение вязкости крови, что приводит к образованию микротромбов. Повреждение эндотелиального слоя сосудистой стенки также ведет к патологическим последствиям, а именно возможна гиперплазия интимы или атеросклеротическое поражение меди. При снижении кровотока происходит изменение функции эндотелия (выделение оксида азота, вызывающего дилатацию сосуда) [Agafonova I.G., Kotel'nikov V.N., Eichoff U. // Applied Magnetic Resonance. 2014. Vol. 45. No 5. P. 527-536].

В таблице 4 представлены данные изменения интенсивности сигнала (ИС) от поврежденного и неповрежденного полушарий в двух режимах.

Таблица 4

Определение интенсивности сигнала (ИС) от поврежденных и неповрежденных участков полушарий через сутки после операции (отн. ед.)

Вещество	Время	T ₂ -ВИ		T ₁ -ВИ	
		правое полушарие	левое полушарие	правое полушарие	левое полушарие
К	3ч	$112,5 \pm 0.09$	$112,3 \pm 0.11$	$74,6 \pm 1.2$	$74,9 \pm 2.3$
	24ч	$111,1 \pm 1.03$	$110,2 \pm 1.21$	$75,1 \pm 0.9$	$75,6 \pm 1.1$
	72ч	$113,7 \pm 0.59$	$112,9 \pm 0.71$	$73,1 \pm 1.3$	$74,2 \pm 1.9$
К*	3ч	$112,6 \pm 1.87$	$126,2 \pm 2.48$	$76,8 \pm 3.2$	$76,8 \pm 3.2$
	24ч	$114,2 \pm 1.89$	$192,7 \pm 1.95\#$	$74,6 \pm 2.2$	$78,6 \pm 2.2$
	72ч	$115,8 \pm 1.56$	$195,2 \pm 2.12\#$	$79,1 \pm 1.7$	$89,1 \pm 1.7\#$
Гистохром	3ч	$92,3 \pm 1.46$	$122,5 \pm 2.19$	$76,3 \pm 1.8$	$74,3 \pm 1.8$
	24ч	$91,4 \pm 2.76$	$171,1 \pm 3.36\#$	$76,9 \pm 4.3$	$84,6 \pm 3.2\#$
	72ч	$98,3 \pm 2.98$	$175,9 \pm 2.21\#$	$72,9 \pm 4.1$	$83,9 \pm 4.1\#$
GluNAZ	3ч	$93,7 \pm 2.17$	$123,7 \pm 2.17$	$79,1 \pm 1.5$	$74,1 \pm 1.5$
	24ч	$102,8 \pm 2.39$	$166,8 \pm 1.39\#$	$76,3 \pm 2.2$	$82,3 \pm 2.2\#$
	72ч	$104,0 \pm 2.21$	$163,9 \pm 2.64\#$	$76,5 \pm 1.9$	$76,5 \pm 5.9^{\wedge}$

- значимые различия по отношению к контролю, при которых значение $p < 0,05$;

^ - значимые различия между веществами после терапии, при которых значение $p < 0,05$;

(К – контроль, К* - контроль после операции)

Как видно из таблицы 4, ИС на T₂-ВИ ткани левого полушария (К*) через 24 ч значительно более выражена относительно ткани симметричного правого полушария. Это говорит о нарастании цитотоксического отека после ишемии. Через 72 ч отек продолжал увеличиваться. После терапии гистохромом и GluNAZ через 48 ч на T₂-ВИ интенсивность сигнала снижена по сравнению с К* на 23-28%, через 72 ч область отека не увеличивалась.

На фиг. 6 (а-б) представлены места локализации цитотоксического отека у крыс после ОНМК. Стрелками указаны гиперинтенсивные области двух смежных по вертикали срезов головного мозга животного. В левом полушарии, в области лСМА выявлены изменения, соответствующие острому нарушению кровообращения. Определяется гиперинтенсивная зона МР-сигнала на T₂-ВИ, соответствующая зоне нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу. У оперированных животных увеличение объема цитотоксического отека отмечено через 24 ч, которое продолжает увеличиваться и через 72 ч. Исследуемые вещества сдерживают увеличение зоны ишемии. Причем эффект GluNAZ проявляется уже через 24 ч, у гистохрома эффект более пролонгированный и отмечен через 48 ч. Основными зонами ишемического повреждения в данной модели является кора, включая сенсомоторную область, и область стриатума.

На фиг. 7 показано морфометрическое измерение патологических зон у крыс после операции с помощью программного обеспечения томографа ROI (Region of Interest). Зеленым цветом выделена зона отека кортикальной зоны через 24 ч. Желтым цветом выделен участок ишемии, который появляется через 72 ч у животных без терапии. Зона отека оперированных контрольных животных продолжает увеличиваться в течение трех суток, как в корковом слое, так и в области стриатума. В таблице 5 представлены данные по изменению объема отека после терапии.

Таблица 5

Верификация зоны отека после терапии у крыс линии Вистар

Вещество	Время	Размеры отека после ишемии		Изменение интенсивности сигнала от зоны отека на T ₂ -ВИ	
		мм ³	%	отн. ед.	%
Контроль	0	0		62.57 ± 3.18	
Контроль после операции	3 ч	3.25 ± 0.08		-	
	12 ч	8.49 ± 0.65		-	
	24 ч	14.31 ± 1.10	40	45.16 ± 3.34	24
	48 ч	13.11 ± 1.18		47.41 ± 4.12	
	72 ч	14.36 ± 0.52	40	44.25 ± 2.71	
Гистохром	3 ч	3.17 ± 1.08		-	
	12 ч	9.23 ± 1.14		-	
	24 ч	10.31 ± 2.21	18	55.74 ± 1.12	8 - 11
	48 ч	11.11 ± 2.54		57.31 ± 4.01	
	72 ч	11.36 ± 1.11	19	53.25 ± 2.33	
GluNAZ	3 ч	3.22 ± 0.19		-	
	12 ч	8.21 ± 1.14		-	
	24 ч	10.14 ± 0.39	23	42.45 ± 1.96	8 - 11
	48 ч	12.56 ± 1.74		57.94 ± 2.11	
	72 ч	12.37 ± 1.13	27	43.18 ± 2.36	

Как видно из таблицы 5, объем отека увеличивался на протяжении трех суток до 34-40% по отношению к среднему объему мозга крыс. У животных после гистохрома зона отека выросла примерно в среднем до 17-19% по отношению к среднему объему головного мозга крыс. Этот объем цитотоксического отека оставался увеличенным на

протяжении 72 ч. Затем зона отека постепенно уменьшалась.

GluNAZ также задерживал увеличение зоны отека до 19-21% по отношению к общему объему головного мозга крыс. Эффективность действия препарата наблюдалась уже через 24-48 ч. Это может свидетельствовать о начале реперфузии и снижении цитотоксического отека в данной зоне патологии. Возможно, оба препарата снижают процессы тромбообразования и восстанавливают мозговое кровообращение в капиллярах и мелких артериях.

Для верификации нарушения и/или восстановления проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) использовался контрастный препарат «Магневист» (Schering AG, Германия). Накопление контраста в очаге ишемии связано с повреждением эндотелия капилляров. В течение формирования ишемического повреждения на T₁-ВИ получали сигнал от ткани, который соответствовал локализации повреждения. Используемый контрастный агент снижает время спин-спиновой релаксации, тем самым, усиливая сигнал на T₁-ВИ.

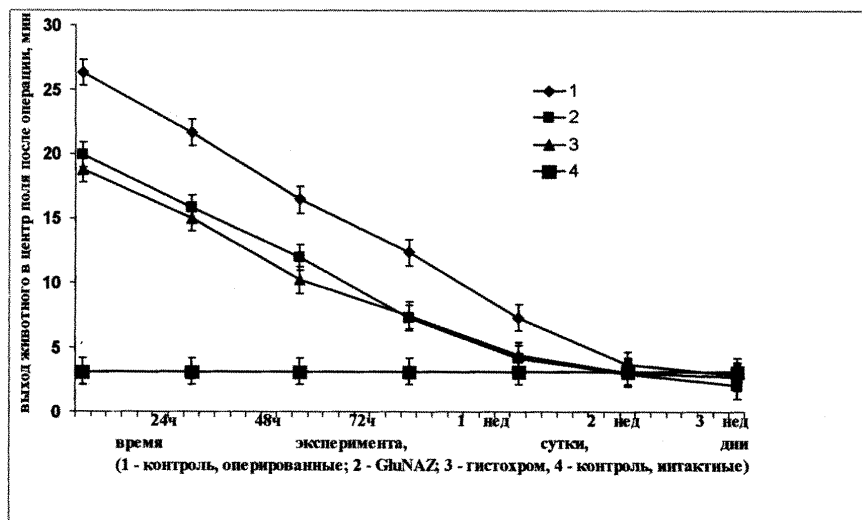
На фиг. 8 (а-б) показана динамика накопления контрастного препарата в зоне отека после индукции ОНМК у крыс. На фиг. 8 (б) стрелками показаны участки повреждения ГЭБ и накопления контраста.

Результаты исследований величины зоны отека во время терапевтического окна показывают, что заявляемое средство проявляет антиоксидантные свойства подобно гистохрому. Однако эффект GluNAZ проявляется быстрее по сравнению с гистохромом. Заявляемое средство на протяжении 24-48 ч снижает зону ишемии на 18% быстрее по сравнению с гистохромом. Низкая токсичность GluNAZ, хорошая растворимость и длительность хранения выгодно отличают заявляемое средство от гистохрома.

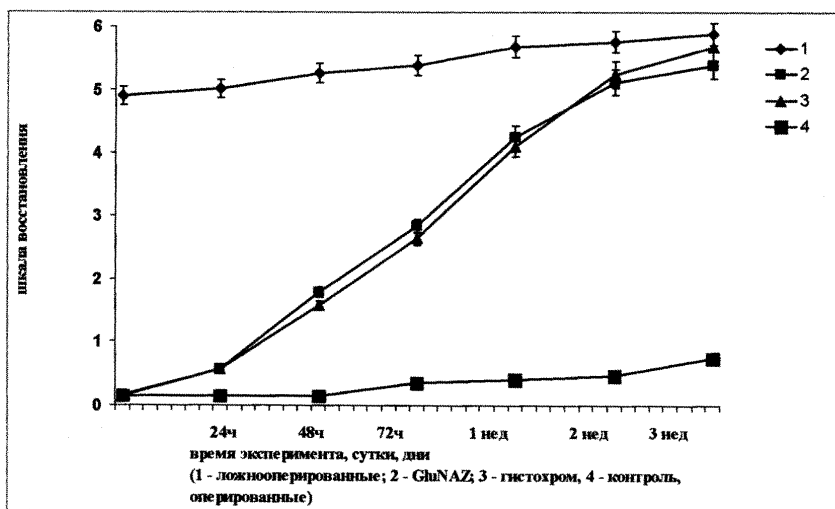
По данным ЭКГ и ЧСС инъекция GluNAZ в концентрации, превышающей терапевтическую дозу более чем в 10 раз, не оказывает негативного эффекта на увеличение частоты сердечных сокращений у интактных животных. При исследовании возможных побочных эффектов в экспериментах *in vivo* (МРТ, МРА) проводили мониторинг состояния всех внутренних органов крыс, особенно сосудов, печени, почек, селезенки. После применения исследуемых веществ никаких побочных эффектов на внутренние органы животных не отмечены.

(57) Формула изобретения

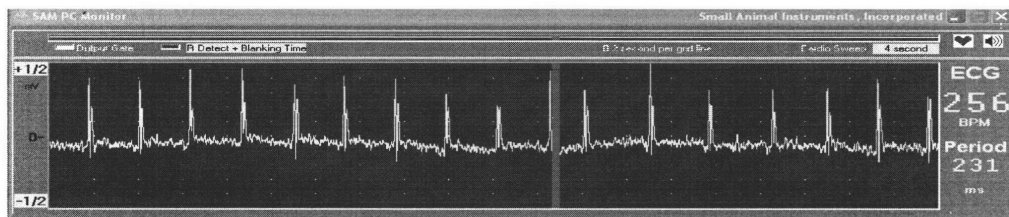
Применение 5,6,8-тригидрокси-2,3-диглутатионил-7-этил-1,4-нафтохинона в качестве средства для лечения ишемии сосудов головного мозга при острых нарушениях мозгового кровообращения.



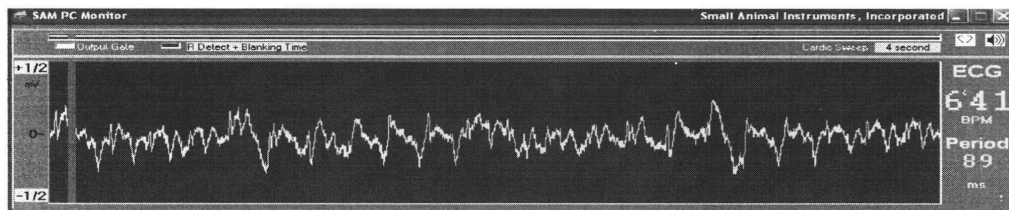
Фиг. 1



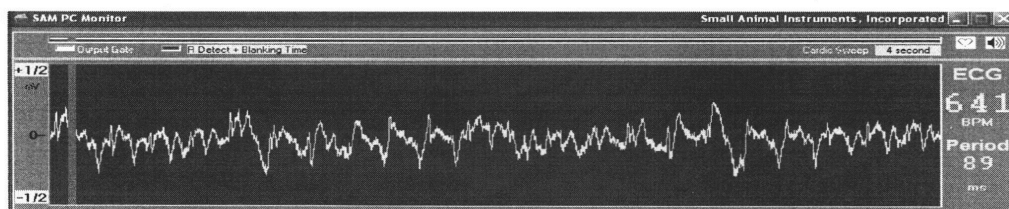
Фиг. 2



Фиг. 3 а



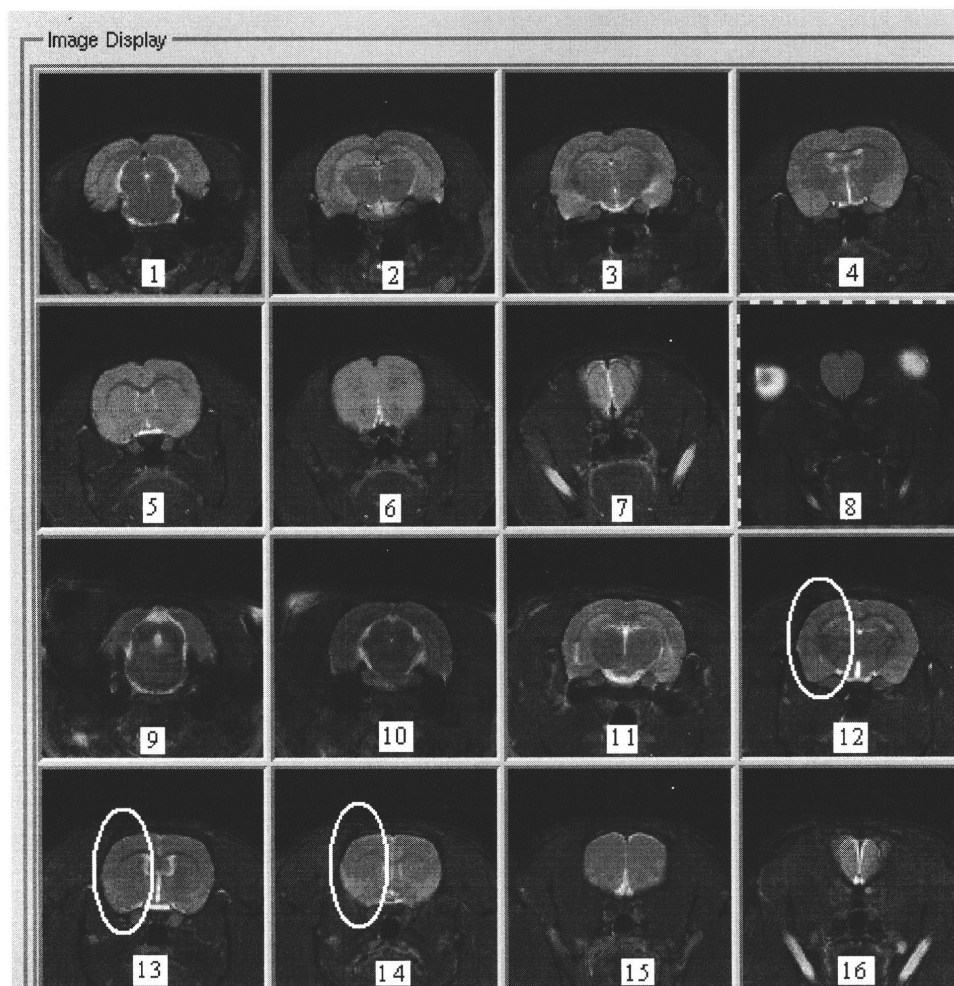
Фиг. 3 б



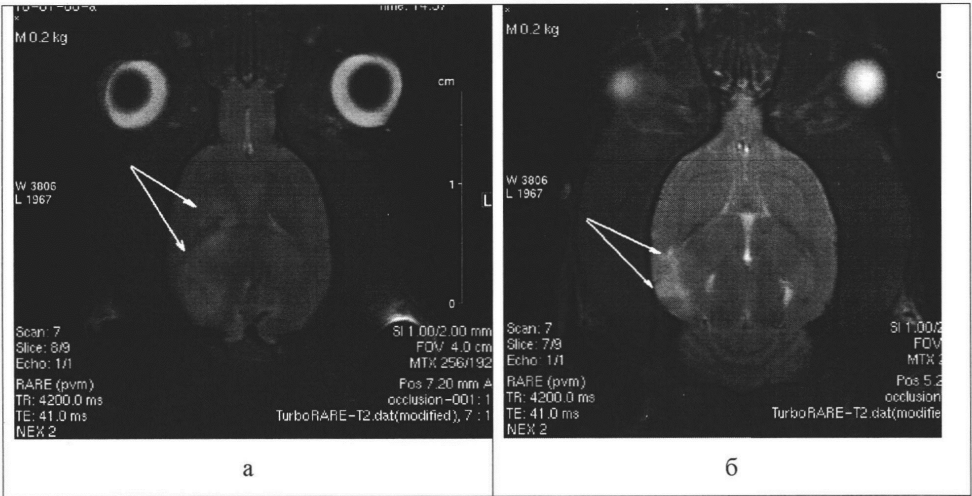
Фиг. 3 в



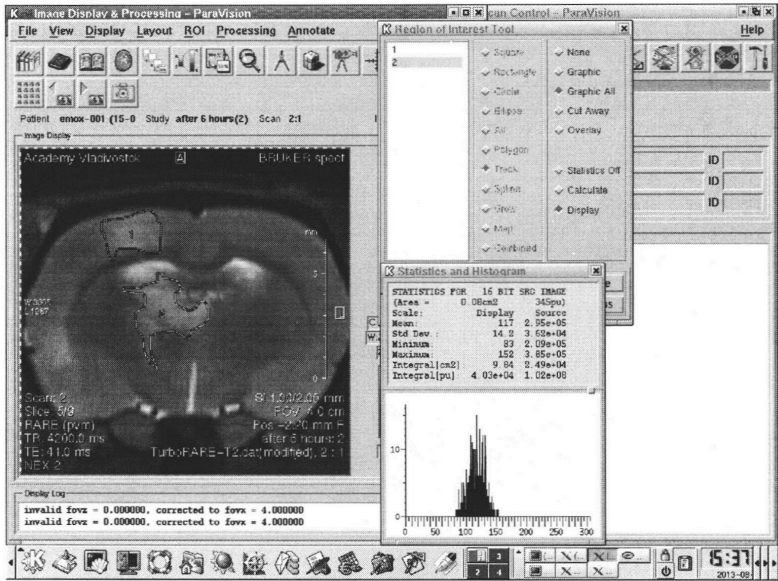
Фиг. 4



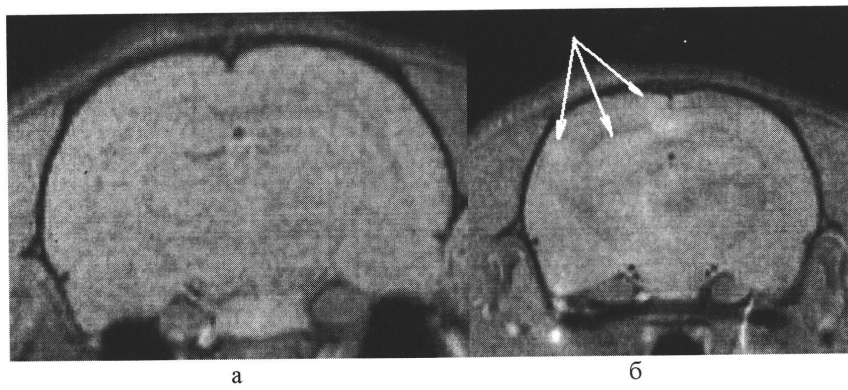
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8