



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 38/43 (2019.02); A61P 13/12 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018133652, 24.09.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.09.2018

Дата регистрации:
23.07.2019

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 24.09.2018

(45) Опубликовано: 23.07.2019 Бюл. № 21

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

(72) Автор(ы):
Елагин Владислав Викторович (RU),
Братчиков Олег Иванович (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Покровская Татьяна Григорьевна (RU),
Костина Дарья Александровна (RU),
Гуреев Владимир Владимирович (RU),
Корокин Михаил Викторович (RU),
Корокина Лилия Викторовна (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 2586219 C2, 10.06.2016. RU
2639415 C1, 21.12.2017. US 2016194340 A1,
07.07.2016. КОКЛИН И.С. "Использование
селективных ингибиторов аргиназы 2 и
тадалафила в комбинированной коррекции
гомоцистеин-индуцированной эндотелиальной
дисфункции". Research result. Pharmacology
and clinical pharmacology 2015, vol.1, no.4(6), pp.
15-20. PANDEY D. et al. (см. прод.)

(54) Способ профилактики ишемически-реперфузионных повреждений почек ингибитором аргиназы II в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной фармакологии и урологии, и касается профилактики ишемически-реперфузионных повреждений почек. Для этого крысам линии Wistar за 120 минут до моделирования ишемии почек путем наложения атраматичных зажимов на почечные ножки на 40 минут с последующей реперфузией кровотока

вводят ингибитор аргиназы II KUD975, в дозе 3 мг/кг внутривенно через зонд. Способ обеспечивает эффективную профилактику ишемически-реперфузионных повреждений почек, в том числе за счет эндотелийпротективных свойств препарата, вводимого в экспериментально установленный момент времени. 1 пр., 2 табл.

(56) (продолжение):

"Transcriptional regulation of endothelial arginase 2 by histone deacetylase 2". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014 Jul; 34(7):1556-1566, реферат, найдено 24.04.2019 из PubMed PMID; 24833798. LEMPIAINEN J. et al. "AMPK activator AICAR ameliorates aschemia reperfusion injury in the rat kidney". *British J Pharmacol.* 2012, 166(6): 1905-1915.

R U 2 6 9 5 3 3 3 C 1

R U 2 6 9 5 3 3 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 695 333** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 38/43 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 38/43 (2019.02); A61P 13/12 (2019.02)(21)(22) Application: **2018133652, 24.09.2018**(24) Effective date for property rights:
24.09.2018Registration date:
23.07.2019

Priority:

(22) Date of filing: **24.09.2018**(45) Date of publication: **23.07.2019** Bull. № 21

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Elagin Vladislav Viktorovich (RU),
Bratchikov Oleg Ivanovich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Pokrovskaya Tatyana Grigorevna (RU),
Kostina Darya Aleksandrovna (RU),
Gureev Vladimir Vladimirovich (RU),
Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Korokina Liliya Viktorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) METHOD FOR PREVENTING ISCHEMIA-REPERFUSION RENAL INJURIES WITH AN INHIBITOR OF ARGINASE II IN EXPERIMENT

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to experimental pharmacology and urology, and concerns preventing ischemia-reperfusion renal injuries. For this purpose, Wistar rats 120 minutes before simulating renal ischemia by applying non-traumatic clamps on renal pedicles for 40 minutes followed by

reperfusion of blood flow, arginase II KUD975 inhibitor 3 mg/kg is administered intragastrically through a probe.

EFFECT: method provides effective prevention of renal ischemia-reperfusion injury, including due to endothelium-protective properties of the preparation administered at the experimentally established time.

1 cl, 1 ex, 2 tbl

RU 2 695 333 C1

RU 2 695 333 C1

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

В течение последних 25 лет частота возникновения острого почечного повреждения возросла в 20 раз и составляет в среднем 13-20% всех госпитализаций [Заморский И.И. Щудрова Т.С. Линькова Н.С. и др. Нефропротективное действие пептида EDL при остром повреждении почек различного генеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – №3. – С. 376-381]. Параллельно росту заболеваемости острым почечным повреждением увеличиваются инвалидизация и смертность от данного состояния. Ишемическое повреждение почки, усугубляющееся впоследствии реперфузией органа, является ведущей патогенетической причиной в этиологии острого почечного повреждения [Янкаускас С.С., Мациевский Д.Д., Плотников Е.Ю. и др. Использование высокочастотной ультразвуковой доплеровской техники для исследования почечного кровотока при ишемии/реперфузии почки. // Нефрология и диализ. – 2014. – №1. – С. 169-173].

В патогенезе ишемически-реперфузионных повреждений почек важную роль играет фермент, регулирующий обмен L-аргинина и оксида азота – аргиназа, существующая в двух изоформах: аргиназа I и аргиназа II [Arginase-2 mediates renal ischemia-reperfusion injury / Raup-Konsavage W.M., Gao T., Cooper T.K., et al. // American Journal of Physiology-Renal Physiology. – 2017. – 313:2. – F522-F534].

Известен способ профилактики ишемически-реперфузионной травмы почек в эксперименте (Arginase-2 mediates renal ischemia-reperfusion injury / Raup-Konsavage W.M., Gao T., Cooper T.K., et al. // American Journal of Physiology-Renal Physiology. – 2017. – 313: 2. – F522-F534), включающий моделирование патологии путем наложения атравматичных зажимов на почечные ножки лабораторных мышей на 28 минут. Для профилактики ишемически-реперфузионной травмы использовали однократное внутрибрюшинное введение неселективного ингибитора аргиназ S-(2-бороноэтил)-L-цистеина за 18 часов до ишемического стимула. Способ обеспечивает уменьшение выраженности гистопатологических изменений, процессов оксидативного стресса и апоптоза, синтез провоспалительных цитокинов; увеличивало образование оксида азота и фосфорилирование eNOS, экспрессию коактиватора 1 альфа γ -рецептора-активатора пролиферации пероксисом и способствовало сохранению митохондриальной ультраструктуры.

Основным недостатком способа является то, что для профилактики в качестве фармакологического агента используется неселективный ингибитор фермента аргиназы, который снижает активность как аргиназы II, так и аргиназы I. Вследствие подавления активности аргиназы I у животных могут наблюдаться такие побочные эффекты, как гипераммониемия, проявляющаяся в недостаточности цикла ферментов мочевины и приводящая к отравлению организма аммиаком, что может усугублять симптомы накопления других продуктов азотистого обмена при остром почечном повреждении – креатинина и мочевины.

Наиболее близким к заявленному является способ профилактики ишемически-реперфузионной травмы почек в эксперименте (Lempiäinen J, Finckenberg P, Levijoki J, Mervaala E. AMPK activator AICAR ameliorates ischaemia reperfusion injury in the rat kidney. // British Journal of Pharmacology. – 2012. – 166(6). – 1905-1915. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01895.x.), включающий воспроизведение модели патологии путем наложения на почечные ножки атравматичных зажимов на 40 минут с последующей реперфузией и введение лабораторному животному 5-амино-4-имидазолкарбоксамид рибозид-1- β -D-рибофуранозида в дозе 500 мг/кг однократно, причем, 5-амино-4-

имидазолкарбоксамид рибозид-1-β-D-рибофуранозид вводят внутривенно за 30 минут до моделирования ишемии и выраженность нефропротективных свойств производят однократно через 24 часа реперфузии без оценки выраженности изменений в клубочках и морфометрии.

5 Основным недостатком способа является то, что профилактика ишемии при гистологическом исследовании подтверждается только полуколичественной оценкой острого канальцевого некроза без учета выраженности изменений в корковом веществе почек, отвечающим за клубочковую фильтрацию и отсутствием оценки процесса на
10 трети сутки эксперимента, когда патологические изменения достигают своего максимума, что не позволяет полностью говорить об эффективной профилактике ишемически-реперфузионных повреждений почек в эксперименте.

С другой стороны, 5-амино-4-имидазолкарбоксамид рибозид-1-β-D-рибофуранозид в клинических исследованиях III фазы не подтвердил свою эффективность при ишемических и реперфузионных повреждениях сердца, имеющих сходный патогенез с
15 изучаемой моделью [Pokrywka A, Cholbinski P, Kaliszewski P, et al. Metabolic modulators of the exercise response: Doping control analysis of an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor δ (GW16) and 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR). – J Physiol Pharmacol. – 2014. – 65(4). – 469-76.]. Кроме того, в качестве средства для наркоза использовался изофлуран, который по данным литературы обладает нефропротективной
20 активностью, что могло исказить полученные результаты исследования [Carraretto, A.R. et al. Does propofol and isoflurane protect the kidney against ischemia/reperfusion injury during transient hyperglycemia?. Acta Cir. Bras. [online]. 2013, vol.28, n.3, pp.161-166.].

Задачей предлагаемого изобретения является создание более эффективного способа профилактики ишемически-реперфузионного повреждения почек с использованием
25 ингибитора аргиназы II KUD975 в эксперименте.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ профилактики ишемически-реперфузионного повреждения почек с использованием ингибитора аргиназы II KUD975, включающий профилактику лекарственным средством путем однократного введения его раствора белым лабораторным животным с последующим
30 моделирование патологии путем наложения атравматичных зажимов на почечные ножки на 40 минут с последующей реперфузией кровотока в почках, причем в качестве лабораторных животных используют белых крыс линии Wistar, в качестве лекарственного средства используют ингибитор аргиназы II KUD975, вводимый в дозе 3 мг/кг внутривенно через зонд за 120 минут до моделирования ишемии, а оценку
35 нефропротективных свойств проводят через 24 и 72 часа реперфузии.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ профилактики ишемически-реперфузионного повреждения почек с использованием ингибитора аргиназы II KUD975 в эксперименте, подтверждаемого результатами гистологического исследования с морфометрией высоты эпителия в проксимальном и
40 дистальном отделах нефрона, площади поперечного сечения почечного тельца и сосудистого клубочка.

Исследуемое нами вещество KUD975 представляет собой синтезированное соединение фенольной природы - метиловый эфир (2-((1-гидрокси-нафталин-2-ил)тио)ацетил)-D-пролина.

45 Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что введение ингибитора аргиназы II KUD975 в дозе 3 мг/кг однократно за 120 минут до индукции ишемии приводит к выраженной профилактике ишемически-реперфузионных повреждений почек в эксперименте, что подтверждается результатами гистологического

исследования с морфометрией.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

Эксперименты проведены на 70 крысах-самцах линии Wistar массой 180-220 г. Для исследования взяты крысы без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим.

Выбор крыс-самцов в эксперименте связан с наличием циклических гормональных изменений у самок и ренопротективных эффектов у эстрогенов, что может повлиять на чистоту эксперимента.

Каждая группа включала 10 крыс. Первая группа – группа ложнооперированных животных, вторая группа – с моделированием ишемически-реперфузионных повреждений почек (контроль, 24 часа), третья группа – с моделированием ишемически-реперфузионных повреждений почек (контроль, 72 часа), четвертая группа – с коррекцией патологии ингибитором аргиназы II KUD975 (24 часа реперфузии), пятая группа – с коррекцией патологии ингибитором аргиназы II KUD975 (72 часа реперфузии), шестая группа – с коррекцией патологии L-норвалином (препарат сравнения, 24 часа реперфузии), седьмая группа – с коррекцией патологии L-норвалином (препарат сравнения, 72 часа реперфузии).

Моделирование ишемически-реперфузионного повреждения почек производили следующим образом: под общей анестезией (хлоралгидрат, 300 мг/кг внутривенно) производили срединную лапаротомию, выделяли почечные ножки и последовательно накладывали атравматичные сосудистые зажимы на обе ножки с ишемическим периодом 40 минут под контролем микроциркуляции. Далее производили снятие зажимов, промывали брюшную полость 0,9% раствором натрия хлорида и послойно ушивали рану. Через 24 или 72 часа после эксперимента животных подвергали эвтаназии с последующим забором почек для морфологического исследования.

В четвертой и пятой экспериментальных группах животным за 120 мин до наложения сосудистых зажимов вводили ингибитор аргиназы II KUD975 в дозе 3 мг/кг однократно внутривенно через зонд. В шестой и седьмой экспериментальных группах животным за 30 мин до наложения сосудистых зажимов вводили L-норвалин в дозе 100 мг/кг однократно внутривенно.

О выраженности протективного эффекта судили по результатам гистологического исследования с морфометрией высоты эпителия в проксимальном и дистальном отделах нефрона, площади поперечного сечения почечного тельца и сосудистого клубочка через 24 или 72 часа реперфузионного периода.

Для проведения гистологического исследования полученный кадаверный материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина. По завершении фиксации из биоматериала иссекали участок тканей размерами 1x1 см, заливали в парафин по стандартной методике и изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм.

Полученные гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Ван Гизонн, по Маллори.

Микроскопирование и фотографирование осуществляли с помощью оптической системы, состоящей из микроскопа Leica CME и окуляр-камеры DCM – 510. Морфометрическое исследование включало в себя определение следующих показателей: на микрофотографиях с использованием программы Imago J проводили измерение высоты эпителиоцитов в проксимальном и дистальном отделах нефрона, измерение площади поперечного сечения почечного тельца и сосудистого клубочка.

Достоверность изменений абсолютных параметров определяли разностным методом вариационной статистики с нахождением средних значений сдвигов, средней

арифметической и вероятности возможной ошибки (р) по таблицам Стьюдента. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$. Для расчётов использовали программу статистического анализа Microsoft Excel.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

5 При микроскопическом изучении гистологических срезов почки у ложнооперированных животных регистрировались нормальные морфометрические показатели: высота эпителия в проксимальных канальцах составила $11,28 \pm 1,56$ мкм, в дистальных канальцах – $7,08 \pm 1,43$ мкм. Площадь поперечного сечения почечного тельца и сосудистого клубочка составляли $10318,97 \pm 83,74$ мкм² и $6449,95 \pm 40,42$ мкм² соответственно. Данные показатели свидетельствуют о нормальной микроскопической картине в корковом и мозговом веществе почек.

10 Через сутки после оперативного вмешательства высота проксимальных эпителиоцитов снизилась в 1,4 раза в сравнении с ложнооперированными животными. К 3-им суткам было выявлено достоверное ($p \leq 0,05$) уменьшение высоты уже в 1,7 раза ($6,56 \pm 0,74$ мкм). В дистальных отделах нефрона изменение высоты эпителия имело ту же тенденцию. При этом, максимальное снижение высоты эпителиоцитов в 1,7 раза ($p \leq 0,05$) происходило через 3-е суток после оперативного вмешательства и составило - $4,24 \pm 0,73$ мкм.

20 Относительно изменений площади поперечного сечения почечного тельца и сосудистого клубочка, было выявлено, что на фоне незначительного уменьшения размеров почечного тельца, снижение показателей площади сосудистого клубочка было достоверно ($p \leq 0,05$) меньше в 1,7 раза, что вполне объяснимо увеличением количества в поле зрения почечных телец со сморщенными сосудистыми клубочками.

25 На фоне коррекции ингибитором аргиназы II KUD975 через 24 часа реперфузии высота эпителия проксимальных и дистальных канальцев увеличивалась до $9,4 \pm 0,09$ мкм и $6,61 \pm 0,09$ мкм соответственно. Площадь сосудистого клубочка увеличивалась до $5848,69 \pm 80,87$ мкм² при параллельном увеличении площади почечного тельца до $9929,89 \pm 113$ мкм².

30 На фоне коррекции L-норвалином через 24 часа реперфузии высота эпителия проксимальных и дистальных канальцев увеличивалась до $8,38 \pm 0,1$ мкм и $6,5 \pm 0,08$ мкм соответственно. Площадь сосудистого клубочка увеличивалась до $5690,58 \pm 88,22$ мкм² при параллельном увеличении площади почечного тельца до $9882,41 \pm 104,55$ мкм².

35 Схожая динамика отмечалась и через 72 часа реперфузии: высота эпителия проксимальных и дистальных канальцев увеличивалась до $8,57 \pm 0,1$ мкм и $6,19 \pm 0,1$ мкм соответственно, достоверно отличаясь от группы контроля и L-норвалина ($p \leq 0,05$).

Площадь сосудистого клубочка также возрастала до $4867,97 \pm 62,17$ мкм² при параллельном увеличении площади почечного тельца до $9952,29 \pm 128,88$ мкм².

40 На фоне коррекции L-норвалином через 72 часа реперфузии высота эпителия проксимальных и дистальных канальцев увеличивалась до $7,98 \pm 0,1$ мкм и $5,55 \pm 0,1$ мкм соответственно, достоверно отличаясь от группы контроля ($p \leq 0,05$). Площадь

45 сосудистого клубочка увеличивалась до $4240,73 \pm 54,92$ мкм² при параллельном увеличении площади почечного тельца до $9587,35 \pm 134,13$ мкм². Динамика результатов морфометрии структур почек представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Динамика результатов морфометрии высоты эпителия канальцев в

экспериментальных группах (мкм, $M \pm m$, $n=10$)

Группа	1 сутки		3 сутки	
	Высота эпителия проксимальных канальцев	Высота эпителия дистальных канальцев	Высота эпителия проксимальных канальцев	Высота эпителия дистальных канальцев
Ложнооперированные	11,28±1,56	7,08±1,43	11,28±1,56	7,08±1,43
Ишемия-реперфузия	8,21±0,21 ^a	6,46±0,15 ^a	6,56±0,74 ^a	4,24±0,73 ^a
Ишемия-реперфузия + KUD975	9,4±0,09 ^{a, b}	6,61±0,09 ^a	8,57±0,1 ^{a, b}	6,19±0,1 ^{a, b}
Ишемия-реперфузия + L-норвалин	8,38±0,1 ^a	6,5±0,08 ^a	7,98±0,1 ^{a, b}	5,55±0,1 ^{a, b}

Примечание: ^a – $p < 0,05$ в сравнении с группой ложнооперированных животных; ^b – $p < 0,05$ в сравнении с группой ишемии-реперфузии.

Таблица 2

Динамика результатов морфометрии клубочковых структур в экспериментальных группах (мкм², $M \pm m$, $n=10$)

Группа	1 сутки		3 сутки	
	Площадь сосудистого клубочка	Площадь почечного тельца	Площадь сосудистого клубочка	Площадь почечного тельца
Ложнооперированные	6449,95±40,42	10318,97±83,74	6449,95±40,42	10318,97±83,74
Ишемия-реперфузия	5799,65±117,89 ^a	9859,3±244,98	3747,06±135,33 ^a	9303,6±253,16 ^a
Ишемия-реперфузия + KUD975	5848,69±80,87 ^a	9929,89±113	4867,97±62,17 ^{a, b}	9952,29±128,88 ^b
Ишемия-реперфузия + L-норвалин	5690,58±88,22 ^{a, b}	9882,41±104,55	4240,73±54,92 ^{a, b}	9587,35±134,13 ^a

Примечание: ^a – $p < 0,05$ в сравнении с группой ложнооперированных животных; ^b – $p < 0,05$ в сравнении с группой ишемии-реперфузии.

Таким образом, в предлагаемом способе внутрижелудочное введение ингибитора аргиназы II KUD975 в дозе 3 мг/кг однократно за 120 минут до индукции ишемии приводит к более выраженной профилактике ишемически-реперфузионных повреждений почек, чем введение L-норвалина в дозе 100 мг/кг, что подтверждается результатами гистологического исследования с морфометрией через 24 и 72 часа реперфузионного периода.

(57) Формула изобретения

Способ профилактики ишемически-реперфузионного повреждения почек с использованием ингибитора аргиназы II KUD975, включающий профилактику лекарственным средством путем однократного введения его раствора белым лабораторным животным с последующим моделированием патологии путем наложения атравматичных зажимов на почечные ножки на 40 минут с последующей реперфузией кровотока в почках, отличающийся тем, что в качестве лабораторных животных используют белых крыс линии Wistar, в качестве лекарственного средства используют ингибитор аргиназы II KUD975, вводимый в дозе 3 мг/кг внутрижелудочно через зонд за 120 минут до моделирования ишемии, а оценку нефропротективных свойств проводят в динамике через 24 и 72 часа реперфузии при исключении побочных эффектов, характерных для мало- и неселективных ингибиторов аргиназ.