



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 38/43 (2019.05); A61P 13/12 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018133820, 25.09.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.09.2018

Дата регистрации:
05.08.2019

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 25.09.2018

(45) Опубликовано: 05.08.2019 Бюл. № 22

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 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.
"Transcriptional regulation (см. прод.)

(54) Способ профилактики нарушений функций 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 атрауматичных 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. 2 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

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 6 5 8 0 C 1

R U 2 6 9 6 5 8 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61K 38/43 (2019.05); *A61P 13/12* (2019.05)

(21)(22) Application: **2018133820, 25.09.2018**

(24) Effective date for property rights:
25.09.2018

Registration date:
05.08.2019

Priority:

(22) Date of filing: **25.09.2018**

(45) Date of publication: **05.08.2019** Bull. № 22

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 RENAL DYSFUNCTION WITH AN ARGINASE II INHIBITOR 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, 2 tbl, 1 ex

RU 2 696 580 C 1

RU 2 696 580 C 1

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

Острое почечное повреждение остается серьезной проблемой здравоохранения, особенно у госпитализированных и критических пациентов, и является основным фактором риска развития хронического заболевания почек [Belayev L.Y., Palevsky P.M. The link between acute kidney injury and chronic kidney disease. // *Curr Opin Nephrol Hypertens* – 2014. – 23. – 149-154; Coca S.G., Singanamala S., Parikh C.R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. // *Kidney Int* – 2012. – 81. – 442-448]. Несмотря на поддерживающий уход с использованием заместительной почечной терапии, острая почечная недостаточность по-прежнему связана с увеличением краткосрочной и долгосрочной смертности не только из-за почечной недостаточности, но и из-за сопутствующей дисфункции других органов и систем [Kao C.C., Yang W.S., Fang J.T., et al. Remote organ failure in acute kidney injury. // *Journal of the Formosan Medical Association*. – 2018]. Ведущей причиной острого почечного повреждения является недостаточная перфузия тканей почек, усугубляющаяся дальнейшей реперфузией [Martin, J.L., Gruszczuk, A.V., Beach, T.E. et al. Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury // *Pediatr Nephrol* – 2018. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3984-5>].

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 аргиназы 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. С другой стороны, не производилась оценка функционального состояния почек, как основного прогностического критерия, применяемого в клинической практике.

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 и введение лабораторному животному 5-амино-4-имидазолкарбоксамид рибозид-1- β -D-рибофуранозид 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 расчета скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия.

Основным недостатком способа является то, что профилактика нарушений функций почек оценивается только с помощью измерения сывороточных концентраций креатинина и мочевины без расчета скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия, а также отсутствия данных о динамике на третьи сутки эксперимента, когда патологические изменения достигают своего максимума, что не позволяет полностью говорить об эффективной профилактике нарушений функций 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 изучаемой моделью [Pokrywka A, Cholbinski P, Kaliszewski P, Kowalczyk K, Konczak D, Zembron-Lacny A. 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 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 [cited 2018-05-27], pp.161-166.].

Задачей предлагаемого изобретения является создание более эффективного способа профилактики нарушений функций почек с использованием ингибитора аргиназы II KUD975.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ профилактики нарушений функций почек с использованием ингибитора аргиназы II KUD975, включающий профилактику лекарственным средством путем однократного введения его раствора лабораторным животным с последующим моделированием 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 выраженности изменения функциональных показателей производят через 24 и 72 часа реперфузии.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ профилактики нарушений функций почек с использованием ингибитора аргиназы II KUD975 в эксперименте, подтверждаемого результатами биохимических исследований и расчета скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия. Исследуемое нами вещество KUD975 представляет собой синтезированное соединение фенольной природы - метиловый эфир (2-((1-гидрокси-нафталин-2-ил)тио)ацетил)-D-пролина.

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].

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 нарушений функций почек в эксперименте, что подтверждается результатами биохимических исследований и расчета скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

5 Эксперименты проведены на 80 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.

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

Моделирование ишемически-реперфузионного повреждения почек производили следующим образом: под общей анестезией (хлоралгидрат, 300 мг/кг внутривентриально) производили срединную лапаротомию, выделяли почечные ножки и последовательно накладывали атравматичные сосудистые зажимы на обе ножки с ишемическим периодом
25 40 минут под контролем микроциркуляции. Далее производили снятие зажимов, промывали брюшную полость 0,9% раствором натрия хлорида и послойно ушивали рану. Для получения образцов мочи, животных помещали в метаболические клетки со свободным доступом к воде на 12 или 24 часа. Далее измерялся диурез и отбирались образцы для дальнейшего исследования. Через 24 или 72 часа реперфузии лабораторное
30 животное наркотизировали путем внутривентриальной инъекции хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг массы тела животного, производили релапаротомию и отбирали кровь из правого желудочка для биохимических исследований.

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

О выраженности ренопротективных свойств судили по результатам биохимических исследований и расчета скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции
40 натрия через 24 и 72 часа реперфузионного периода.

Уровень сывороточного креатинина и мочевины определяли фотоколориметрическим методом с помощью стандартных наборов реактивов. Концентрация ионов калия и натрия в сыворотке крови определялась по стандартной методике, прилагаемой к наборам на автоматическом анализаторе.

45 Клиренс эндогенного креатинина (скорость клубочковой фильтрации (СКФ)) рассчитывался следующим образом:

$$\text{СКФ} = \frac{\text{креатинин мочи (мкмоль/л)} \times \text{объем мочи (мл)}}{\text{креатинин сыворотки крови (мкмоль/л)} \times \text{время (мин)}}$$

Фракционная экскреция натрия (F_{Na}) рассчитывалась по следующей формуле:

$$F_{Na} = \frac{\text{натрий мочи} \times \text{креатинин сыворотки крови}}{\text{натрий сыворотки крови} \times \text{креатинин мочи}} \times 100\%$$

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.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Через 24 часа реперфузии в группе с моделированием патологии уровень креатинина сыворотки крови не отличался достоверно от группы ложнооперированных животных и составлял $55,7 \pm 0,8$ мкмоль/л и $57,9 \pm 2,38$ мкмоль/л соответственно. Однако за счет снижения диуреза отмечалось падение скорости клубочковой фильтрации с $0,51 \pm 0,03$ мл/мин в группе ложнооперированных животных до $0,17 \pm 0,02$ мл/мин в группе ишемии-реперфузии. Через 72 часа отмечалось прогрессирующее снижение фильтрационной способности почек, выражающееся в нарастании уровня сывороточного креатинина с $56 \pm 1,52$ мкмоль/л до $120 \pm 3,45$ мкмоль/л и снижении скорости клубочковой фильтрации в 8,2 раза с $0,49 \pm 0,03$ мл/мин в группе ложнооперированных животных до $0,06 \pm 0,01$ мл/мин в группе с моделированием патологии.

Исследование сывороточной концентрации мочевины продемонстрировало, что моделирование 40-минутной билатеральной модели ишемии-реперфузии почек приводило к росту данного показателя через 24 часа реперфузии с $5,35 \pm 0,21$ ммоль/л до $9,7 \pm 0,68$ ммоль/л, которое несколько нивелировалось через 72 часа, достигая уровня $8,33 \pm 0,23$ ммоль/л.

В группе ложнооперированных животных уровень фракционной экскреции натрия через 24 и 72 часа составлял $0,38 \pm 0,02\%$ и $0,5 \pm 0,02\%$. Моделирование острого почечного повреждения ишемически-реперфузионного генеза приводило к росту F_{Na} до $2,24 \pm 0,12\%$ до $7,4 \pm 0,78\%$ через 24 и 72 часа реперфузии соответственно.

Профилактика нарушений функций почек ингибитором ангиотензиновой системы KUD975 приводила к снижению сывороточной концентрации креатинина через 72 часа реперфузии до $73,7 \pm 2,22$ мкмоль/л и росту скорости клубочковой фильтрации до $0,31 \pm 0,02$ мл/мин и $0,26 \pm 0,02$ мл/мин на первые и третьи сутки эксперимента соответственно, отличаясь достоверно от показателей группы контроля и группы препарата сравнения ($p < 0,05$). Уровень сывороточной концентрации мочевины также снижался до $6,47 \pm 0,37$ ммоль/л и $6,9 \pm 0,23$ ммоль/л через 24 и 72 часа реперфузии соответственно. Фракционная экскреция натрия на фоне профилактического применения KUD975 в дозе 3 мг/кг, отражающая канальцевую дисфункцию также снижалась, составляя $1,14 \pm 0,11\%$ и $1,8 \pm 0,09\%$ в различные временные точки эксперимента, превосходя по эффективности препарат сравнения.

Профилактика нарушений функций почек L-норвалином приводила к снижению сывороточной концентрации креатинина через 72 часа реперфузии до $93,4 \pm 3,39$ мкмоль/л и росту скорости клубочковой фильтрации до $0,21 \pm 0,02$ мл/мин и $0,15 \pm 0,01$ мл/мин на первые и третьи сутки эксперимента соответственно, отличаясь достоверно от показателей группы контроля лишь на третьи сутки эксперимента ($p < 0,05$). Уровень сывороточной концентрации мочевины снижался до $7,8 \pm 0,29$ ммоль/л и $7,8 \pm 0,48$ ммоль/л через 24 и 72 часа реперфузии соответственно. Фракционная экскреция натрия на фоне профилактического применения L-норвалина составила $1,42 \pm 0,13\%$ и $2,76 \pm 0,21\%$ в различные временные точки эксперимента. Динамика биохимических маркеров острого

почечного повреждения, скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Динамика биохимических маркеров острого почечного повреждения в экспериментальных группах ($M \pm m$; $n=10$)

Экспериментальная группа	Креатинин (мкмоль/л)		Мочевина (ммоль/л)	
	24 часа	72 часа	24 часа	72 часа
Ложнооперированные	55,7±0,8	56±1,52	5,35±0,21	5,4±0,14
Ишемия-реперфузия	57,9±2,38	120±3,45 ^x	9,7±0,68 ^x	8,33±0,23 ^x
Ишемия-реперфузия + KUD975	56,2±1,66	73,7±2,22 ^{xy}	6,47±0,37 ^{xy}	6,9±0,23 ^{xy}
Ишемия-реперфузия + L-норвалин	56,2±1,91	93,4±3,39 ^{xy}	7,8±0,29 ^{xy}	7,8±0,48 ^x

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

Таблица 2

Динамика скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия в экспериментальных группах ($M \pm m$; $n=10$)

Экспериментальная группа	СКФ (мл/мин)		ФЭН (%)	
	24 часа	72 часа	24 часа	72 часа
Ложнооперированные	0,51±0,03	0,49±0,03	0,38±0,02	0,5±0,02
Ишемия-реперфузия	0,17±0,02 ^x	0,06±0,01 ^x	2,24±0,12 ^x	7,4±0,78 ^x
Ишемия-реперфузия + KUD975	0,31±0,02 ^{xy}	0,26±0,02 ^{xy}	1,14±0,11 ^{xy}	1,8±0,09 ^{xy}
Ишемия-реперфузия + L-норвалин	0,21±0,02 ^x	0,15±0,01 ^{xy}	1,42±0,13 ^{xy}	2,76±0,21 ^{xy}

Примечание: ^x – $p < 0,05$ в сравнении с группой ложнооперированных животных; ^y – $p < 0,05$ 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 нарушений функций почек, чем введение L-норвалина в дозе 100 мг/кг, что подтверждается результатами биохимических исследований и расчета скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия через 24 и 72 часа реперфузионного периода.

(57) Формула изобретения

Способ профилактики нарушений функций почек с использованием ингибитора аргиназы II KUD975, включающий профилактику лекарственным средством путем однократного введения его раствора 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 выраженности изменения функциональных показателей проводят в динамике через 24 и 72 часа реперфузии при исключении побочных эффектов, характерных для мало- и неселективных ингибиторов аргиназ.