



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016103923, 08.02.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.02.2016Дата регистрации:
05.05.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.02.2016

(45) Опубликовано: 05.05.2017 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Покровский Михаил Владимирович (RU),
Покровская Татьяна Григорьевна (RU),
Корокин Михаил Викторович (RU),
Малорадова Татьяна Николаевна (RU),
Гуреев Владимир Владимирович (RU),
Костина Дарья Александровна (RU),
Якушев Владимир Иванович (RU),
Мартынова Ольга 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: LA MURA V. et al. Liver sinusoidal
endothelial dysfunction after LPS
administration: a role for inducible-nitric oxide
synthase. J Hepatol. 2014 Dec;61(6):1321-7. RU
2402333 C1, 27.10.2010. RU 2400826 C1,
27.09.2010. RU 2507595 C2, 20.02.2014. CN
101612061 A, 30.12.2009. БАСАЛАЙ О. Н. и
др. Коррекция нарушений метаболизма в
почках и их функции у (см. прод.)(54) СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ
С СИСТЕМНЫМ ВОСПАЛЕНИЕМ НИЗКОЙ ГРАДАЦИИ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной кардиофармакологии, и касается моделирования эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с системным воспалением низкой градации и окислительным стрессом. Способ включает внутрибрюшинное введение белым крысам-самцам линии Wistar однократно в сутки гентамицина в дозе 20 мг/кг в течение 5 дней. После этого внутрибрюшинно вводят липополисахарид Escherichia coli серотипа O55: B5 в дозе 1 мг/кг 1 раз в 7 дней в течение двух

недель. Затем делают перерыв во введении фармакологических агентов в течение 7 дней. После этого внутрибрюшинно вводят ингибитор эндотелиальной NO-синтазы L-нитроаргинин метиловый эфир в дозе 25 мг/кг ежедневно в течение 7 дней. Способ обеспечивает моделирование нескольких взаимосвязанных звеньев патогенеза эндотелиальной дисфункции, что приближает модель к процессам в организме человека на бессимптомной фазе течения дисфункции при варианте коморбидной патологии. 2 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

крыс с интоксикацией гентамицином комбинацией таурина с цинка дигидратом.

Токсикологический вестник, 2014, N 4, с. 25-28. CASTELLANO G et al. Endothelial dysfunction and renal fibrosis in endotoxemia-induced oliguric kidney injury: possible role of LPS-binding protein. Crit Care. 2014 Sep 27; 18(5): 520.

R U 2 6 1 8 6 5 7 C 1

R U 2 6 1 8 6 5 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2016103923, 08.02.2016**(24) Effective date for property rights:
08.02.2016Registration date:
05.05.2017

Priority:

(22) Date of filing: **08.02.2016**(45) Date of publication: **05.05.2017** Bull. № 13

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Pokrovskaya Tatyana Grigorevna (RU),
Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Maloradova Tatyana Nikolaevna (RU),
Gureev Vladimir Vladimirovich (RU),
Kostina Darya Aleksandrovna (RU),
Yakushev Vladimir Ivanovich (RU),
Martynova Olga Viktorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR SIMULATION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION ASSOCIATED WITH LOW GRADATION SYSTEMIC INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves daily intraperitoneal injection of gentamicin at a dose of 20 mg/kg for 5 days to white Wistar male rats. Thereafter, LPS Escherichia coli serotype O55:B5 is administered intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg once in 7 days for two weeks. Then a break is made in pharmacological agents administration for 7 days. Thereafter, endothelial NO-synthase inhibitor L-nitroarginine methylester is

administered daily intraperitoneally at a dose of 25 mg/kg for 7 days.

EFFECT: method provides simulation of several interrelated endothelial dysfunction pathogenesis links to approximate the model to the human body processes in the asymptomatic phase of dysfunction in case of comorbid pathology.

2 dwg, 1 ex

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной кардиофармакологии, и может быть использовано для оценки эндотелиопротективных эффектов ряда фармакологических препаратов с различными механизмами действия при моделировании системного воспаления низкой градации и окислительного стресса.

5 По известным литературным источникам субклиническое персистирующее воспаление низкой градации является важным патогенетическим звеном многих социально значимых хронических заболеваний, включая атеросклероз, сахарный диабет, метаболический синдром, онкологические заболевания и болезнь Паркинсона (Samantha Chang, and Liwu Li Metabolicendotoxemia: a novel concept in chronic disease pathology //J MedSci 2011;31(5):
10 191-209). В связи с этим разработка метода моделирования эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с системным воспалением низкой градации и окислительным стрессом, является актуальной проблемой экспериментальной фармакологии.

Известен способ моделирования эндотоксического шока у кроликов, включающий в себя однократное внутривенное введение липополисахарида *Escherichia coli* (E.coli),
15 серотипа O55:B5 в дозе 0,5 мг/кг и L-нитроаргинин метилового эфира (L-NAME) в дозе 15 мг/кг/сутки за три дня до эндотоксического шока и в течение пяти дней после него (Eric Wiel, Qian Pu, Delphine Corseaux, Emmanuel Robin, Régis Bordet, Niels Lund, Brigitte Jude, and Benoit Vallet Effect of L-arginine on endothelial injury and hemostasis in rabbit
endotoxin shock, Journal of Applied Physiology, November 1, 2000, vol. 89, no. 5, 1811-1818).

20 Основными недостатками данного способа являются: однократное введение липополисахарида, которое не позволяет смоделировать системное воспаление низкой градации; введение L-NAME до введения липополисахарида, что ведет к проявлению
лечебных эффектов при окислительном стрессе, а не его усугублению. Кроме того, данный метод не позволяет влиять на изменение метаболических путей, регулируемых
25 почками.

Другой способ моделирования хронической эндотоксемии у крыс включает интраперитонеальное введение гентамицина в дозе 20 мг/кг в течение 5 дней, на 6 день
дополняется однократным введением липополисахарида в дозе 0,2 мг/кг. Животные
выводятся из эксперимента на 30, 60 или 90 сутки от начала эксперимента (Kalashnikova,
30 S.; Kovnatskaya, G.; Shchyogolev, A Morphofunctional Changes in the Kidneys in Chronic Endotoxemia against the Background of Hypothyroidism, Bulletin of Experimental Biology & Medicine; Aug 2012, Vol.153, Issue 4, p. 516).

Основными недостатками данного способа являются: однократное введение липополисахарида, которое не позволяет смоделировать системное воспаление низкой
35 градации и отсутствие прямого воздействия на звенья, регулирующие активность NO-синтазы.

Наиболее близким к заявленному решению является способ моделирования эндотелиальной дисфункции с помощью бактериального липополисахарида (в дозе 5
мг/кг внутривентрально) и ингибитора индуцибельной NO-синтазы 1400W (в дозе 3 мг/
40 кг внутривентрально) (Liver sinusoidal endothelial dysfunction after LPS administration: a role for inducible-nitric oxide synthase. La Mura V. et al., J Hepatol. 2014, Dec; 61(6):1321-7).

Недостатками данного способа являются:

1. Однократное введение липополисахарида в высокой дозе, что воспроизводит изменения, происходящие при сепсисе, а не хроническом воспалении.
- 45 2. Используется ингибитор индуцибельной NO-синтазы, что может способствовать проявлению лечебных эффектов за счет блокады индуцибельной, а не эндотелиальной синтазы оксида азота.
3. Отсутствует повреждающее действие на почечную ткань, что не позволяет

рассматривать эндотелиальную дисфункцию со всех патофизиологических этапов развития.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка легковоспроизводимого способа моделирования системного воспаления низкой градации и окислительного стресса, а также ассоциированной с ними эндотелиальной дисфункции.

Поставленная задача достигается следующим образом: белым крысам-самцам линии Wistar массой 250-300 г внутрибрюшинно вводят липополисахарид и ингибитор NO-синтазы, причем предварительно однократно в сутки внутрибрюшинно вводят нефротоксичный антибактериальный препарат из группы аминогликозидов гентамицин в дозе 20 мг/кг в течение 5 дней. По окончании введения гентамицина, на шестые сутки от начала эксперимента, начинают введение липополисахарида *Escherichia coli* серотипа (O55:B5) в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно 1 раз в 7 дней в течение двух недель, затем делают перерыв во введении животным фармакологических агентов в течение 7 дней, после чего внутрибрюшинно вводят блокатор эндотелиальной NO-синтазы L-нитроаргинин метиловый эфир в дозе 25 мг/кг ежедневно в течение 7 дней. Животных выводят из эксперимента на 34 сутки.

Внутрибрюшинное введение нефротоксичного антибактериального препарата гентамицина приводит к морфофункциональным изменениям почечной паренхимы, проявляющихся вторичной артериальной гипертензией, диссоциацией эндотелийпродуцируемых медиаторов, повышением в крови уровня асимметричного диметиларгинина (АДМА) – эндогенного конкурентного блокатора NO-синтазы, активацией оксидативного стресса и др.

Инъекции липополисахарида *Escherichia coli* вызывают окислительные повреждения: уменьшение толщины поверхности эндотелия, обуславливая нарушения структуры гликокаликса сосудистого русла и развитие эндотелиальной дисфункции, которая приводит к ухудшению микроциркуляции и снижению оксигенации тканей.

L-NAME блокирует эндотелиальную NO-синтазу, усугубляет оксидативный стресс, нарушая прооксидантно-антиоксидантный баланс.

Использование последовательного введения гентамицина, липополисахарида и блокатора эндотелиальной синтазы оксида азота в указанных дозах позволяет добиться следующих результатов:

- блокировать не только синтез, но и биодоступность оксида азота как ключевого патогенетического звена в развитии эндотелиальной дисфункции;
- преодолеть эндогенные механизмы природной защиты и нарушить баланс функционирования систем организма и гомеостаз;
- приблизить экспериментальные методы моделирования эндотелиальной дисфункции к патогенетическим процессам, протекающим в организме человека при хроническом воспалении и ассоциированной с ним эндотелиальной дисфункции.

Таким образом, поставленная задача решена.

СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ.

Эксперимент выполнен на 30 половозрелых самцах крыс линии Wistar массой 180-200 г. В эксперименте использовались три группы животных: 1) группа интактных животных (n=10); 2) группа с L-NAME-индуцированным дефицитом оксида азота (n=10); 3) опытная группа (n=10).

Группе интактных животных вводили плацебо (0,9% раствор натрия хлорида).

Группе с L-NAME-индуцированным дефицитом оксида азота ежедневно внутрибрюшинно вводили 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида в течение 6 дней, затем процедуру повторяли 1 раз в неделю в течение двух недель. Завершали эксперимент

введением L-NAME в дозе 25 мг/кг ежедневно в течение 7 дней.

Опытной группе ежедневно внутривентриально вводили 4% раствор гентамицина в течение 5 дней в дозе 20 мг/кг.

По окончании введения гентамицина на шестые сутки от начала эксперимента животным интраперитонеально вводили липополисахарид кишечной палочки в дозе 1 мг/кг 1 раз в неделю. Процедуру повторяли в течение двух недель. Затем делали перерыв во введении животным фармакологических агентов в течение 7 дней, после чего вводили блокатор эндотелиальной NO-синтазы L-нитроаргинин метиловый эфир в дозе 25 мг/кг ежедневно в течение 7 дней.

На 34 день от начала эксперимента под наркозом вводили катетер в левую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД). Болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Показатели гемодинамики: систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством датчика и компьютерной программы Biopac System Inc. MP150. Проводились функциональные пробы: эндотелий зависимая вазодилатация (ЭЗВД) - внутривенное введение ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг, эндотелий независимая вазодилатация (ЭНВД) - внутривенное введение нитропруссид натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг.

Для оценки выраженности эндотелиальной дисфункции использовался коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД), рассчитываемый как отношение площадей треугольников над кривой восстановления артериального давления после введения нитропруссид и ацетилхолина.

При статистической обработке данных рассчитывается среднее значение, величина стандартного отклонения. Различия считаются достоверными при $p < 0,05$.

ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг массы тела животного, внутривентриально) животное фиксировали и производили регистрацию уровня гемодинамических показателей, их вариабельности при введении фармакологических агентов. Затем производился расчет СрАД, площадей треугольников над кривой восстановления артериального давления на нитропруссид и ацетилхолин, КЭД (по САД, ДАД и СрАД) для каждой группы животных.

Болюсное внутривенное введение ацетилхолина в течение 3-5 сек приводило к резкому падению артериального давления, достигающего у интактных животных для САД 84,3±4,4, для ДАД - 38,7±2,8 и для среднего артериального давления (СрАД) 53,9±2,7 мм рт.ст., при этом в течение первых 2-3 сек развивалась резкая брадикардия до 130-150 ударов в минуту. Восстановление АД происходило в среднем за 42,2±0,8 сек после нормализации сердечного ритма. Эндотелий независимая вазодилатация также характеризовалась снижением САД до 83,0±3,7, ДАД до 42,1±4,4 и СрАД до 55,7±3,5 мм рт.ст. с последующим полным восстановлением в среднем в течение 45,1±1,0 сек.

Блокада NO-синтазы с помощью длительного, ежедневного, в течение 7-суток внутривентриального введения L-NAME (N-нитро-L-аргинин метиловый эфир в дозе 25 мг/кг) вызывало артериальную гипертензию (САД - 190,3±6,7, ДАД - 145,0±3,9, СрАД - 160,1±4,6 мм рт.ст.) и приводила к меньшему снижению показателей АД после введения ацетилхолина (САД до 110,6±5,2, ДАД до 82,8±6,6, СрАД до 92,1±6,1 мм рт.ст.) и нитропруссид (САД до 88,7±4,7, ДАД до 50,8±4,2 и СрАД до 63,4±4,1 мм рт.ст.) по сравнению с интактными животными.

Моделирование эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с системным

воспалением низкой градации и окислительным стрессом, вызывало артериальную гипертензию (САД – $173,0 \pm 15,2$, ДАД – $134,0 \pm 3,9$, СрАД - $152,0 \pm 11,2$ мм рт.ст.) и приводило к большому снижению показателей АД после введения ацетилхолина (САД до $102,9 \pm 8,1$, ДАД до $66,9 \pm 8,0$, СрАД до $79,2 \pm 4,8$ мм рт.ст.) и меньшему – после введения 5 нитропрусида (САД до $92,8 \pm 4,7$, ДАД до $47,1 \pm 4,2$ и СрАД до $62,0 \pm 2,9$ мм рт.ст.) по сравнению с интактными животными.

Динамика показателей гемодинамики в исследуемых группах животных представлена в таблице 1 на Фиг. 1.

10 При расчете степени выраженности эндотелиальной дисфункции по показателю КЭД были получены следующие данные: КЭД=1,1 у интактных животных, КЭД=7,2 у животных контрольной группы и КЭД=5,4 у животных, получавших L-NAME. Расчет коэффициента эндотелиальной дисфункции представлен в таблице 2 на Фиг. 2.

15 Таким образом, данный способ позволяет моделировать эндотелиальную дисфункцию, ассоциированную с универсальными механизмами повреждения: системным воспалением низкой градации и окислительным стрессом, и может быть использован для оценки эндотелиопротективных эффектов ряда фармакологических препаратов с различными механизмами действия.

(57) Формула изобретения

20 Способ моделирования эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с системным воспалением низкой градации и окислительным стрессом, включающий внутрибрюшинное введение белым крысам-самцам линии Wistar однократно в сутки гентамицина в дозе 20 мг/кг в течение 5 дней, после чего внутрибрюшинно вводят липополисахарид Escherichia coli серотипа O55:B5 в дозе 1 мг/кг 1 раз в 7 дней в течение 25 двух недель, затем делают перерыв во введении фармакологических агентов в течение 7 дней, после чего внутрибрюшинно вводят ингибитор эндотелиальной NO-синтазы L-нитроаргинин метиловый эфир в дозе 25 мг/кг ежедневно в течение 7 дней.

30

35

40

45

Способ моделирования эндотелиальной дисфункции,
ассоциированной с системным воспалением низкой
градации и окислительным стрессом

Таблица 1

Динамика показателей гемодинамики в исследуемых группах животных

Группы животных	САД (мм.рт.ст)	ДАД (мм.рт.ст)	СрАД (мм.рт.ст)
Интактные (исходные значения)	137±3,7	101,9±4,3	115,0±1,9
ЭЗВД с АХ	84,3±4,4,	38,7±2,8	53,9±2,7
ЭНВД с НП	83,0±3,7	42,1±4,4	55,7±3,5
L-NAME (исходные значения)	190,3±6,7*	145,0±3,9*	160,1±4,6*
ЭЗВД с АХ	110,6±5,2*	82,8±6,6*	92,1±6,1*
ЭНВД с НП	88,7±4,7*	50,8±4,2*	63,4±4,1*
Опытная группа (исходные значения)	173,0±15,2*	134,0±3,9*	152,0±11,2*
ЭЗВД с АХ	102,9±8,1*	66,9±8,0*	79,2±4,8 *
ЭНВД с НП	92,8±4,7*	47,1±4,2*	62,0±2,9 *

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными; ** - $p < 0,05$ в сравнении с группой L-NAME

Фиг. 1

Способ моделирования эндотелиальной дисфункции,
ассоциированной с системным воспалением низкой
градации и окислительным стрессом

Таблица 2

Расчет коэффициента эндотелиальной дисфункции

	Функциональные пробы	Δ СрАД сосудистой реакции (мм.рт.ст)	Время сосудистой реакции (сек)	Площадь сосудистой реакции (усл. ед)	КЭД
Интактные	ЭЗВД с АХ	59,9±2,9	42,2±0,8	1268,0±74,8	1,1
	ЭНВД с НП	61,0±3,0	45,1±1,0	1375,3±93,7	
L-NAME	ЭЗВД с АХ	68,0±4,1*	20,0±1,4*	695,3±87,6*	5,4*
	ЭНВД с НП	98,0±2,0*	67,4±1,4*	3322,7±116,7*	
Опытная группа	ЭЗВД с АХ	68,5±6,6*	25,2±4,7*	814,2±78,0*	7,2**
	ЭНВД с НП	97,4±4,4*	131,4±16,2**	5862,3±116,7**	

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными; ** - $p < 0,05$ в сравнении с группой L-NAME.

Фиг. 2