



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/24 (2023.08); A61K 33/04 (2023.08); A61P 43/00 (2023.08); G09B 23/28 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023119462, 24.07.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.07.2023Дата регистрации:
27.12.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.07.2023

(45) Опубликовано: 27.12.2023 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Щеблыкин Дмитрий Валерьевич (RU),
Покровская Татьяна Григорьевна (RU),
Лебедев Пётр Романович (RU),
Щеблыкина Олеся Викторовна (RU),
Болгов Антон Алексеевич (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Молчанов Владимир Васильевич (RU),
Костина Дарья Александровна (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: КОРОКИНА Л.В. и др. "Коррекция
L-NAME-индуцированной эндотелиальной
дисфункции при использовании синтетических
доноров оксида азота" Биомедицина, no. 4,
2006, с. 90-92. RU 2364393 C1, 20.08.2009. KR
20090060557 A, 15.06.2009. DAN WANG, et al.,
Endothelial dysfunction and reduced nitric oxide
in resistance arteries in autosomal-dominant
polycystic (см. прод.)

(54) СПОСОБ КОРРЕКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ НА МОДЕЛИ L-NAME-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕФИЦИТА ОКСИДА АЗОТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной фармакологии, и может быть использовано для коррекции эндотелиальной дисфункции. Перед введением тиосульфата натрия моделируют эндотелиальную дисфункцию подопытным животным, которым ежедневно 1 раз в сутки в течение 7 дней внутрибрюшинно вводят неселективный блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метиловый эфир (L-NAME) в дозе 60 мг/кг. После чего через 12 часов после введения L-NAME внутрибрюшинно

вводят тиосульфат натрия в дозе 200 мг/кг. Способ позволяет повысить эффективность коррекции эндотелиальной дисфункции за счет способности стимулировать эндогенный синтез NO, а также выраженного противовоспалительного, антиагрегантного и антиоксидантного действия, препарата тиосульфата натрия в указанной дозировке на исследуемой модели патологии. 9 ил., 1 табл., 6 пр.

(56) (продолжение):

kidney disease, *Kidney International*, Volume 64, Issue 4, 2003, Pages 1381-1388.

R U 2 8 1 0 4 1 5 C 1

R U 2 8 1 0 4 1 5 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/24 (2006.01)
A61K 33/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
G09B 23/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/24 (2023.08); A61K 33/04 (2023.08); A61P 43/00 (2023.08); G09B 23/28 (2023.08)(21)(22) Application: **2023119462, 24.07.2023**(24) Effective date for property rights:
24.07.2023Registration date:
27.12.2023

Priority:

(22) Date of filing: **24.07.2023**(45) Date of publication: **27.12.2023** Bull. № 36

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhailovna**

(72) Inventor(s):

**Shcheblykin Dmitrii Valerevich (RU),
Pokrovskaja Tatiana Grigorevna (RU),
Lebedev Petr Romanovich (RU),
Shcheblykina Olesia Viktorovna (RU),
Bolgov Anton Alekseevich (RU),
Pokrovskii Mikhail Vladimirovich (RU),
Molchanov Vladimir Vasilevich (RU),
Kostina Daria Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatskii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD OF CORRECTION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION USING MODEL OF L-NAME-INDUCED NITRIC OXIDE DEFICIENCY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; experimental pharmacology.

SUBSTANCE: invention can be used to correct endothelial dysfunction. Before the administration of sodium thiosulfate, endothelial dysfunction is modeled in experimental animals, which are intraperitoneally injected with a non-selective NO synthase blocker N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) at a dose of 60 mg/kg 1 time per day for 7 days. Then, 12 hours after administration of L-NAME, sodium thiosulfate is

administered intraperitoneally at a dose of 200 mg/kg.

EFFECT: method makes it possible to increase the effectiveness of correction of endothelial dysfunction due to the ability to stimulate endogenous NO synthesis, as well as the pronounced anti-inflammatory, antiplatelet and antioxidant effects of sodium thiosulfate preparation in the specified dosage on the pathology model under study.

1 cl, 9 dwg, 1 tbl, 6 ex

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии и может быть использовано для коррекции эндотелиальной дисфункции.

Известен способ восстановления эндотелийзависимой холинергической релаксации грудной аорты спонтанно гипертензивных крыс с помощью фосфолипидных везикул (липосом), описанный A.I.Soloviev, A.V.Stefanov, O.V.Bazilyuk, V.F.Sagach в статье «Phospholipid vesicles (liposomes) restore endothelium-dependent cholinergic relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rats» в *J Hypertens.* 1993, Jun; 11(6): 623-7, который заключается в том, что фосфолипидные липосомы в концентрации 100-125 мкг/мл восстанавливают эндотелий-зависимую холинергическую релаксацию грудной аорты спонтанно гипертензивных крыс, нормализуют синтез и секрецию эндотелиального релаксирующего фактора, способствуют коррекции эндотелиальной функции поврежденных клеток эндотелия.

Основным недостатком способа является недостаточная биодоступность суспензии фосфолипидных липосом и риск их поглощения клетками ретикулоэндотелиальной системы, снижающие способность липосом достигать определенных тканей-мишеней.

Известен способ вазопротекторного воздействия путем блокады рецепторов аденозина дифосфата тромбоцитов клопидогрелем на фоне коронарного атеросклероза, описанный Heitzer T., Rudolph V., Schwedhelm E., Karstens M., Sydow K., Ortak M., Tschentscher P., Meinertz T., Böger R., Baldus S. «Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects.», *J. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, V.26 (1), P.1648-1652, 2006 г., который заключается в увеличении биодоступности оксида азота в эндотелии коронарных артерий человека и уменьшении биомаркеров оксидантного стресса и воспаления после пятидневного применения клопидогреля.

Основным недостатком способа является изучение вазопротекторных свойств клопидогреля у пациентов с коронарным атеросклерозом, у которых блокатор индуцибельной NO-синтазы (NG-monomethyl-L-arginine-L-NMMA) был использован в качестве тестируемого агента для доказательства эндотелиотропных эффектов. Поэтому результаты коррекции эндотелиальной дисфункции при коронарном атеросклерозе, вызываемым снижением биодоступности оксида азота, и не связанным с недостаточностью эндотелиальной NO-синтазы, с помощью клопидогреля неудовлетворительны.

Известны способы применения молекулы донора H₂S, тиосульфата натрия за последние несколько лет (*Hydrogen Sulfide Metabolite, Sodium Thiosulfate: Clinical Applications and Underlying Molecular Mechanisms / Zhang M.Y., Dugbartey G.J., Juriasingani S., Sener A. // Int J Mol Sci. – 2021. – № 22. – P. 6452*).

Основным недостатком способа является отсутствие изучения эффектов доноров H₂S на модели L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции.

Наиболее близким к заявленному решению является исследование (*Treatment with hydrogen sulfide alleviates streptozotocin-induced diabetic retinopathy in rats/ Si Y.F., Wang J., Guan J. et al. // Br J Pharmacol. – 2013 – № 169. – P. 619-631.*), в котором было показано, что H₂S ограничивает эндотелиальную дисфункцию, нефропатию, кардиомиопатию, ретинопатию в экспериментальных животных моделях диабета.

Основным недостатком способа является отсутствие изучения эффектов доноров H₂S на модели L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции путем введения N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME)

Задачей изобретения является создание способа коррекции эндотелиальной

дисфункции на модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота, включающего использование тиосульфата натрия, обладающего противовоспалительным, антиагрегантным, антиоксидантным действием, а также способностью стимулировать эндогенный синтез NO.

5 Задача достигается тем, что на фоне моделирования L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции в эксперименте внутрибрюшинным введением мышам линии СВА/Лас в течение 7 суток ADMA-подобного блокатора эндотелиальной NO-синтазы – N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME) в дозе 60 мг/кг проводится коррекция эндотелиальной дисфункции внутрибрюшинным введением тиосульфата
10 натрия в дозировке 200 мг/кг через 12 часов после введения L-NAME в течении 7 дней.. Это приводит к выраженной коррекции эндотелиальной дисфункции при моделируемой патологии. Данный эффект связан с выраженным противовоспалительным, антиагрегантным и антиоксидантным действием, а также способностью стимулировать эндогенный синтез NO.

15 L-нитро-аргинин-метилового эфира

Заявленный способ характеризуют следующие изображения.

Фиг.1 Схема «Протокол исследования эндотелиопротективных эффектов тиосульфата натрия при коррекции L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота»

Фиг. 2 График «Влияние тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг на уровень
20 артериального давления при коррекции L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции». Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой интактных животных; # – $p < 0,05$ при сравнении с L-NAME

Фиг. 3 График «Влияние тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг на регуляцию
25 сосудистого тонуса при коррекции L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции». Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой интактных животных; # – $p < 0,05$ при сравнении с группой L-NAME

Фиг. 4 График «Влияние тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг на изменение
30 агрегационной активности тромбоцитов при коррекции L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции». Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой интактных животных; # – $p < 0,05$ при сравнении с группой L-NAME

Фиг. 5 График «Влияние тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг на изменение уровня фактора Виллебранда при коррекции L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции». Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой интактных животных; # – $p < 0,05$ при сравнении с группой L-NAME

35 Фиг. 6 Графики «Влияние тиосульфат натрия в дозе 200 мг/кг на активность антиоксидантной системы и изменение уровня перекисного окисления липидов при коррекции L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции». Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой интактных животных; # – $p < 0,05$ при сравнении с группой L-NAME

40 Фиг. 7 График «Влияние тиосульфат натрия в дозе 200 мг/кг на концентрацию C-реактивного белка при коррекции L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции». Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой интактных животных; # – $p < 0,05$ при сравнении с группой L-NAME

Фиг. 8 График «Влияние тиосульфат натрия в дозе 200 мг/кг на концентрацию
45 конечных метаболитов оксида азота в плазме крови при коррекции L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции». Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении с группой интактных животных; # – $p < 0,05$ при сравнении с группой L-NAME

Фиг. 9 Диаграмма «Влияние тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг на совокупность

показателей, отражающих эндотелиопротективные эффекты фармакологической коррекции при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота»
СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

Опыты проводили на мышах линии СВА/Лас (25-30 г), эндотелиопротективные
5 эффекты тиосульфата натрия изучены при парентеральном (внутрибрюшинном) введении животным на модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота. Все лабораторные животные были распределены случайным образом на 3 экспериментальные группы в зависимости от цели исследования, каждая группа включала 10 животных:

10 1 группа – интактные животные, на протяжении 7 дней эксперимента получали внутрибрюшинно соответствующий объем (10 мл/кг) воды для инъекций 1 раз в сутки;

2 группа – L-NAME-индуцированная эндотелиальная дисфункция. Животным данной группы ежедневно 1 раз в сутки в течение 7 дней внутрибрюшинно вводился L-NAME (Sigma, Германия), в дозе 60 мг/кг;

15 3 группа – L-NAME-индуцированная эндотелиальная дисфункция + Тиосульфат натрия 200 мг/кг. Животным данной группы ежедневно 1 раз в сутки в течение 7 дней внутрибрюшинно вводился L-NAME, в дозе 60 мг/кг, через 12 часов после введения L-NAME внутрибрюшинно вводился тиосульфат натрия в дозе 200 мг/кг. Доза 200 мг/кг выбрана на основании результатов отечественных исследований, свидетельствующих
20 о выраженном гиполипидемическом и антиатеросклеротическом действиях тиосульфата натрия (с учетом коэффициента межвидового переноса доз) (Патент №2372923 на изобретение Средство, обладающее гиполипидемической и антиатеросклеротической активностью. Публикация: 2009.11.20).

На 8 сутки эксперимента животных наркотизировали (Золетил100 (Virbac, Франция)
25 2,5 мг/100 г + Ксилазин (Биогель, Беларусь) 2 мг/100 г внутрибрюшинно), регистрировали артериальное давление, проводили исследование сосудистой реактивности, затем отбирали кровь из полости левого желудочка для последующего анализа концентрации метаболитов NO, уровня СРБ, а также оценки уровня агрегации тромбоцитов. После отбора крови животных подвергали эвтаназии посредством цервикальной дислокации.
30 Проводили забор сердца для анализа уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности антиоксидантных систем, а также брюшной части аорты для анализа экспрессии противовоспалительных цитокинов и молекул адгезии.

Протокол исследования с отражением потенциальных точек приложения исследуемого препарата, представлен на Фиг. 1

35 Пример конкретного выполнения

Пример №1

Оценка влияния тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг на гемодинамические показатели и реактивность сосудистого русла в условиях L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции.

40 Введение L-NAME мышам самцам в течение 7 суток индуцировало статистически значимое повышением артериального давления (АД) относительно группы интактных животных (Фиг. 2). Курсовое введение тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг приводила к нормализации как систолического, так и диастолического АД до уровня интактных животных ($p > 0,05$).

45 При проведении функциональных сосудистых проб с ацетилхолином и нитропруссидом натрия, было показано, что введение L-NAME нарушает регуляторные механизмы сосудистого тонуса. В группе моделированной патологии коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) более чем в 5 раз превосходил показатели здоровых

интактных животных ($p < 0,05$) (Фиг. 3).

Курсовое введение тиосульфата натрия в дозах 200 мг/кг способствовало сохранению эндотелий-зависимой вазодилатации в условиях моделирования патологии. КЭД в данной группе был сопоставим с показателями интактных животных ($p > 0,05$).

5 Пример №2

Оценка антиагрегантной активности тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг в условиях L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции.

Анализ агрегационной активности тромбоцитов показал, что введение L-NAME приводит к активации тромбоцитов и повышению их АДФ-индуцированной агрегации относительно здоровых интактных животных (Фиг. 4).

Кроме того, избыточная адгезия кровяных пластинок у животных на фоне введения L-NAME также связана с повышением активности фактора Виллебранда (Фиг. 5).

Курсовое применение тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг приводило к коррекции проагрегантного статуса, что подтверждалось снижением степени АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на 55,97% относительно группы L-NAME ($p < 0,05$) и соответствовало показателям интактных животных ($p > 0,05$), а также нормальным уровнем фактора Виллебранда ($p > 0,05$ относительно интактной группы).

Пример №3

Оценка антиоксидантной активности тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг в условиях моделированной эндотелиальной дисфункции.

Результаты оценки оксидантного статуса подопытных животных выявили повышенный уровень окислительного стресса в гомогенизате сердца мышей, получавших L-NAME, за счет значительного снижения содержания восстановленного глутатиона (GSH) и активности супероксиддисмутазы (СОД), а также повышенный уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) по сравнению с контрольной группой (Фиг. 6).

Курсовое применение тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг ингибировало процесс окислительного стресса в тканях сердца мышей, получавших L-NAME, за счет значительного увеличения активности антиоксидантных систем, и снижения уровня ПОЛ по сравнению с группой без фармакотерапии.

30 Пример №4

Оценка противовоспалительной активности тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг в условиях L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции

Введение L-NAME мышам самцам в течение 7 суток индуцировало формирование провоспалительного статуса в стенках сосудов, о чем свидетельствуют повышение концентрации биохимического маркера воспаления С-реактивного белка (СРБ) в плазме крови (Фиг. 7), а также результаты анализа экспрессии провоспалительных генов в тканях брюшной аорты (Таблица 1)

Таблица 1 – Влияние тиосульфата натрия на экспрессию генов провоспалительных цитокинов и молекул адгезии при L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции ($M \pm SD$; $n=5$)

Группа \ Ген	TNF- α	IL-6	VCAM-1
интактные	1,12 \pm 0,08#	1,05 \pm 0,18#	1,07 \pm 0,06#
L-NAME	4,06 \pm 0,14*	5,07 \pm 0,23*	2,24 \pm 0,06*
L-NAME+ Тиосульфат натрия 200 мг/кг	2,74 \pm 0,27*#	3,32 \pm 0,22*#	1,31 \pm 0,04*#

Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении с интактной группой; # – $p < 0,05$ при сравнении с группой L-NAME.

Нормализация концентрации СРБ в сыворотке крови, а также снижение экспрессии генов провоспалительных цитокинов и молекул адгезии в ткани брюшной аорты свидетельствуют о наличии противовоспалительного действия тиосульфат натрия в дозе 200 мг/кг при коррекции L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота и реализацию данного эффекта через регуляцию активности генов TNF- α , IL-6 и VCAM-1.

Пример №5

Оценка эффективности фармакологической стимуляции синтеза оксида азота тиосульфатом натрия в дозе 200 мг/кг в условиях L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции

Введение L-NAME мышам самцам в течение 7 суток приводило к значимому снижению концентрации метаболитов NO в сыворотке крови подопытных животных (Фиг. 8).

Применение тиосульфата натрия в дозе 200 мг/кг обеспечило адекватную фармакологическую стимуляцию выработки эндогенного NO в условиях L-NAME индуцированной эндотелиальной дисфункции и достижение уровня метаболитов NO интактных животных.

Пример №6

Оценка площадей лепестковых диаграмм по совокупности показателей эндотелиопротективного действия

При построении лепестковых диаграмм положение исследуемых показателей эндотелиопротективной активности на выстраиваемых осях группы тиосульфата натрия было основано на математическом пересчете их значения в соотношении к интактной группе и группе L-NAME, где показатели интактных животных соответствовали 1, а группы L-NAME – 2 (Фиг. 9)

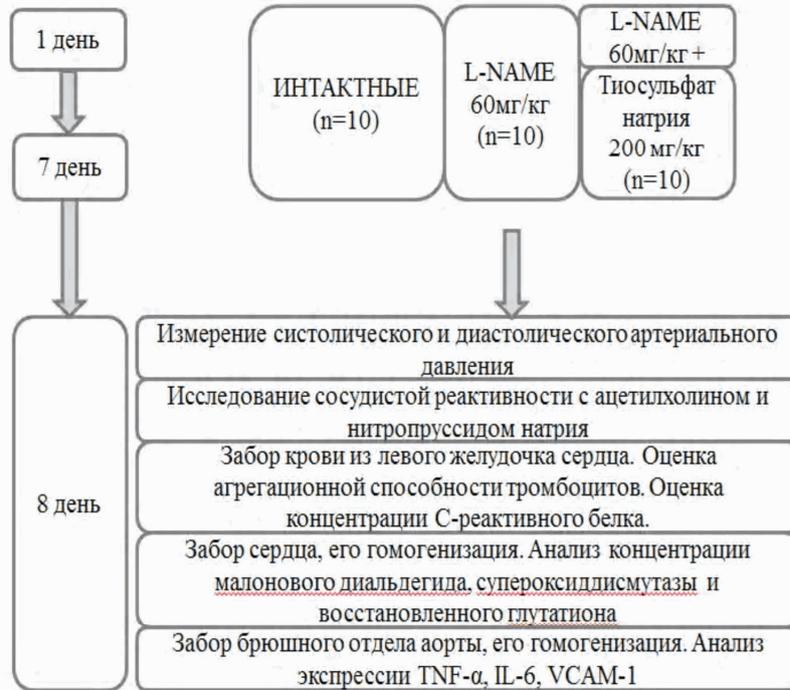
Диаграмма, полученная на основании показателей группы, принимавшей тиосульфат натрия в дозе 200 мг/кг соизмерима по площади с графиком интактной группы и превышает его лишь на 4%, что свидетельствует о выраженном эндотелиопротективном действии препарата в данной дозировке на исследуемой модели патологии:

Таким образом, полученные результаты убедительно свидетельствуют о выраженной коррекции эндотелиальной дисфункции в условиях, воспроизводимого нами L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота у мышей линии СВА/Лас тиосульфатом натрия в дозе 200 мг/кг, который может быть использован для коррекции эндотелиальной дисфункции.

(57) Формула изобретения

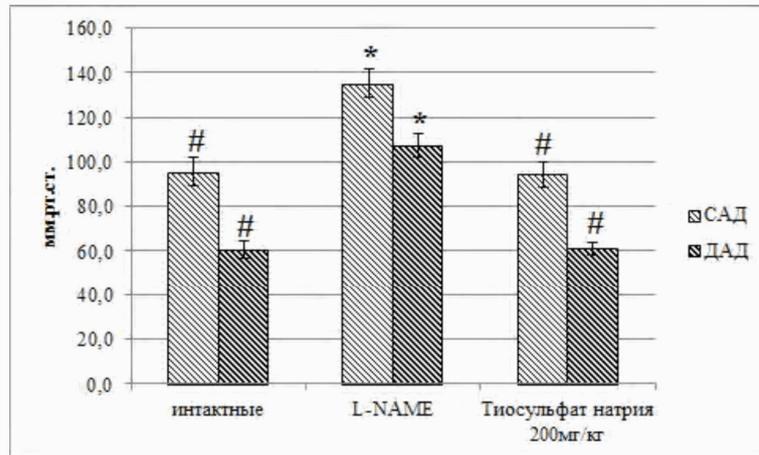
Способ коррекции эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированном дефиците оксида азота у мышей линии СВА/Лас, моделированном ежедневным в течение 7 дней внутрибрюшинным введением N-нитро-L-аргинин метилового эфира в дозе 60 мг/кг, отличающийся тем, что для коррекции эндотелиальной дисфункции через 12 часов после введения L-NAME вводят внутрибрюшинно тиосульфат натрия в дозе 200 мг/кг в течение 7 дней.

1

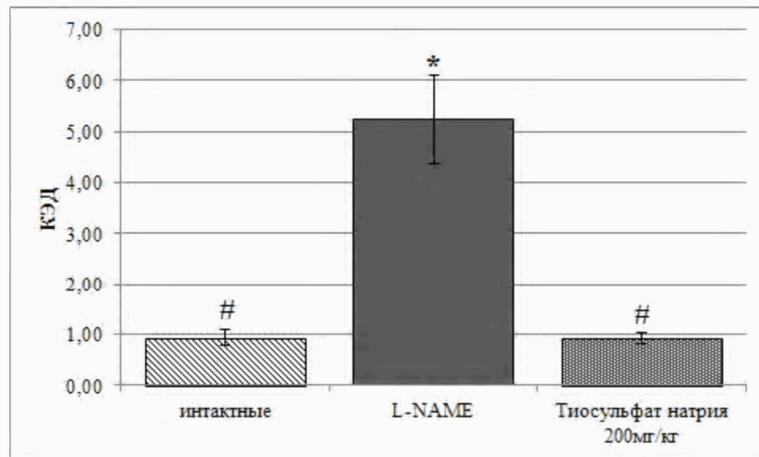


Фиг. 1

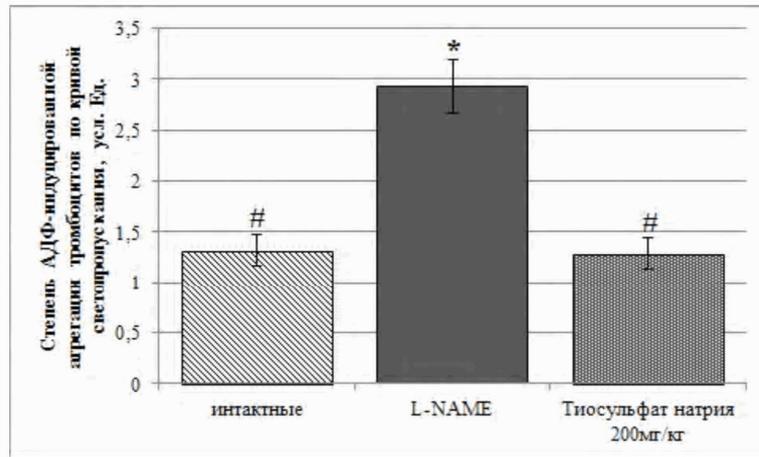
2



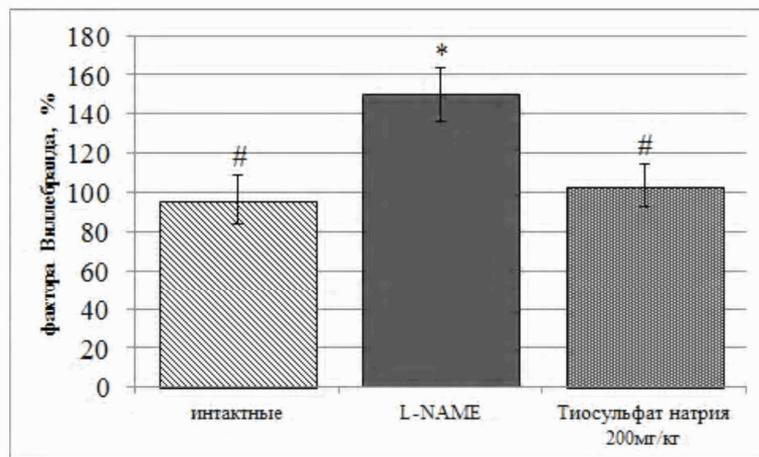
Фиг.2



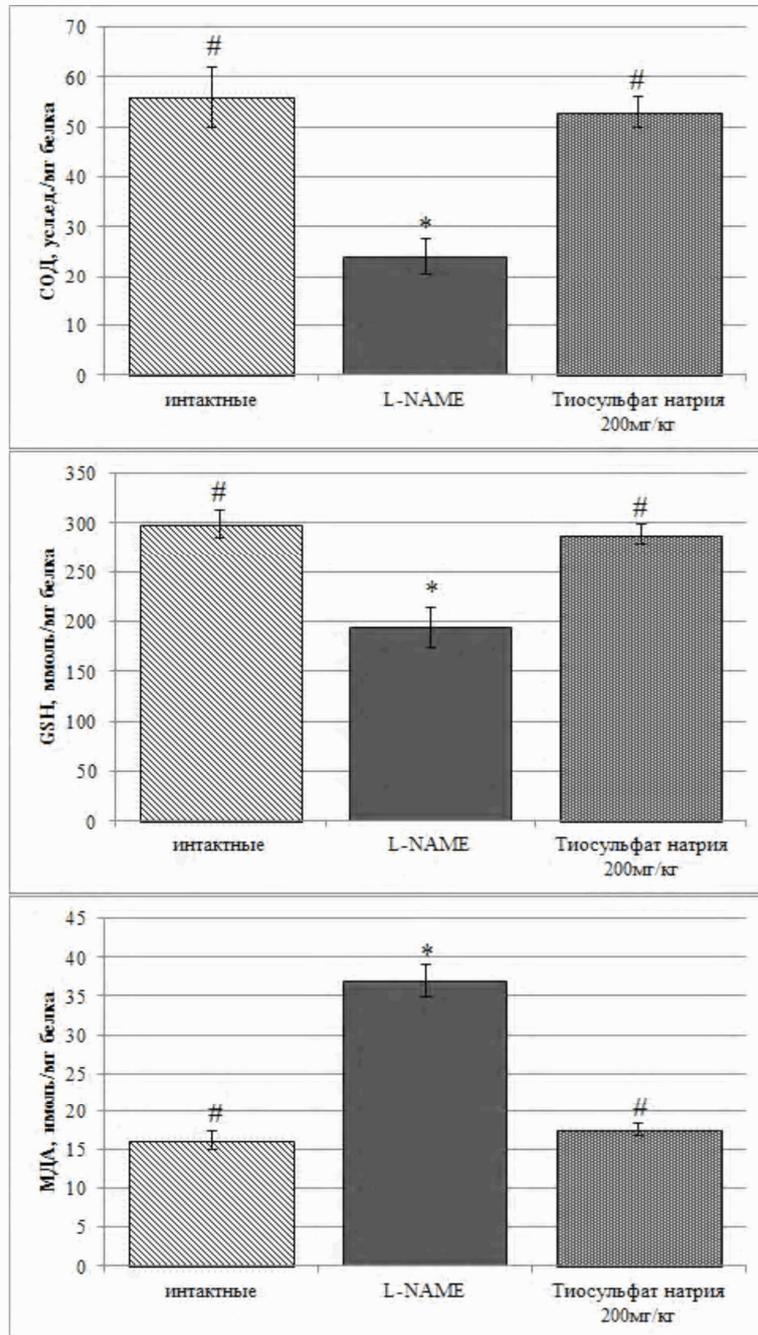
Фиг. 3



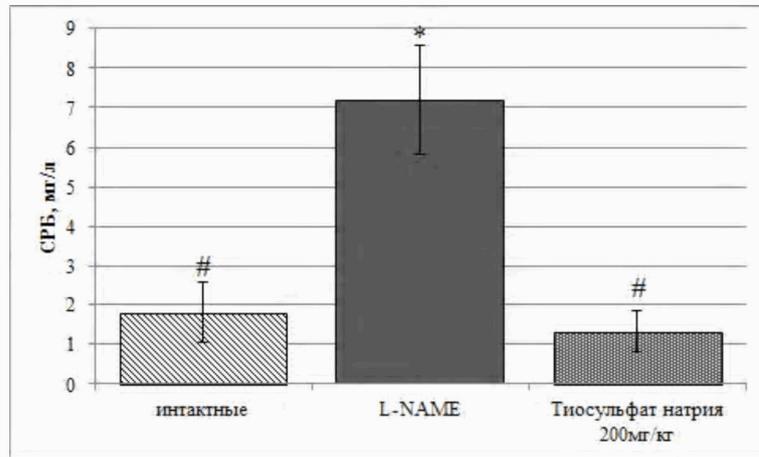
Фиг. 4



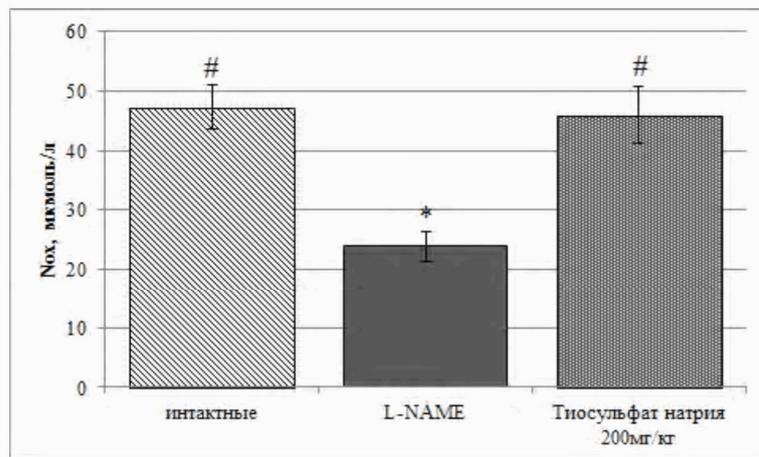
Фиг. 5



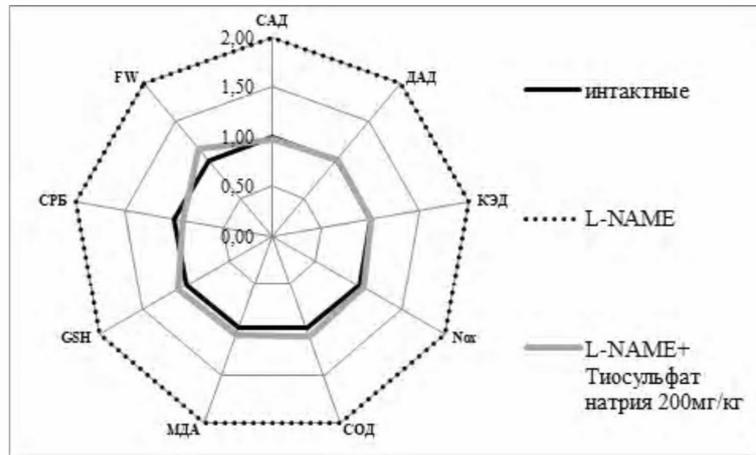
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9