



(51) МПК  
*A61K 38/16* (2006.01)  
*A61K 38/18* (2006.01)  
*A61P 13/12* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 38/16* (2019.05); *A61K 38/18* (2019.05); *A61P 13/12* (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018133648, 24.09.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
24.09.2018

Дата регистрации:  
07.08.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.09.2018

(45) Опубликовано: 07.08.2019 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),  
 Победа Анна Сергеевна (RU),  
 Щуровская Кристина Владимировна (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 2515914 C1, 20.05.2014. RU  
 2433181 C2, 10.11.2011. JP 20198002667 A,  
 11.01.2018. КОСТИНА Д.А. и др. "Роль  
 фармакологического прекодиционирования  
 при ишемических и реперфузионных  
 повреждениях почек". Урология 2017, no.5,  
 с.139-144. AIZAWA K et al. "Epoetin beta pegol  
 for treatment of anemia ameliorates deterioration  
 of erythrocyte quality (см. прод.)

(54) Способ профилактики нарушений микроциркуляции в почках асиалированным эритропоэтином в эксперименте

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к медицине, а именно, к экспериментальной фармакологии и урологии, и касается профилактики ишемически-реперфузионного повреждения почек в эксперименте. Для этого крысам-самцам линии Wistar однократно вводят асиалированный эритропоэтин. Затем моделируют патологию почек путем наложения атравматичных зажимов

на почечные ножки с последующей реперфузией кровотока через 40 минут. Асиалированный эритропоэтин вводят в дозе 2,4 мкг/кг внутривенно за 30 минут до моделирования патологии. Способ обеспечивает эффективную профилактику ишемических повреждений почек за счет улучшения процессов микроциркуляции. 1 пр., 1 табл.

(56) (продолжение):

associated with chronic kidney disease". BMC Nephrol 2018 Jan 27;19(1):19, реферат, найдено 23.05.2019 из PubMed PMID:29374477.

R U 2 6 9 6 8 6 4 C 1

R U 2 6 9 6 8 6 4 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 38/16* (2006.01)  
*A61K 38/18* (2006.01)  
*A61P 13/12* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 38/16 (2019.05); A61K 38/18 (2019.05); A61P 13/12 (2019.05)*(21)(22) Application: **2018133648, 24.09.2018**(24) Effective date for property rights:  
**24.09.2018**Registration date:  
**07.08.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **24.09.2018**(45) Date of publication: **07.08.2019** 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),  
Pobeda Anna Sergeevna (RU),  
Shchurovskaya Kristina Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj  
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU  
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR PREVENTING MICROCIRCULATION DISORDERS IN KIDNEYS WITH ASIALISED ERYTHROPOIETIN IN EXPERIMENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention refers to medicine, namely to experimental pharmacology and urology, and concerns preventing ischemia-reperfusion renal injury experimentally. That is ensured by administering asialised erythropoietin to male rats of Wistar line. Renal pathology is then simulated by applying atraumatic clamps on renal peduncles with subsequent

reperfusion of blood flow in 40 minutes. Asialised erythropoietin is administered in dose of 2.4 mcg/kg intraperitoneal by 30 minutes before simulating the pathology.

EFFECT: method provides effective prevention of renal ischemic injuries by improving microcirculation processes.

1 cl, 1 ex, 1 tbl

RU 2 696 864 C 1

RU 2 696 864 C 1

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]. Ухудшении почечной перфузии и микроциркуляции признано ключевым фактором в инициировании и развитии острого почечного повреждения [The role of the microcirculation in acute kidney injury. / Le Dorze M, Legrand M, Payen D, Ince C. // Curr Opin Crit Care. 2009. 15(6). P. 503-8. doi: 10.1097/MCC.0b013e328332f6cf; Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. // BMC Medicine. 2011. 9:11. doi:10.1186/1741-7015-9-11.] Комплексное взаимодействие между микрососудистыми изменениями и воспалительным ответом, повреждением почек и дисфункцией эндотелия сформировало концепцию о профилактике микроциркуляторных нарушений в качестве эффективной стратегии в предотвращении и/или лечении острого почечного повреждения.

Известен способ профилактики ишемически-реперфузионной травмы почек в эксперименте (Okada T, Sawada T, Kubota K. Asialoerythropoietin has strong renoprotective effects against ischemia-reperfusion injury in a murine model. // Transplantation. 2007 Aug 27; 84(4):504-10.), включающий моделирование патологии путем удаления левой почки и наложения атравматичного зажима на правую почечную ножку лабораторных мышей-самок на 60 минут. Для профилактики ишемически-реперфузионной травмы использовали однократное подкожное введение асиалированного эритропоэтина в дозе 500 МЕ/кг за 30 минут до ишемического стимула. Способ обеспечивает снижение концентрации креатинина и мочевины через 24 часа, уменьшение количества клеток в стадии апоптоза и улучшает выживаемость животных на 7 сутки эксперимента.

Основным недостатком способа является то, что используемая модель позволяет оценить изменения лишь при наличии одной почки, тогда как в условиях клинической практики ишемически-реперфузионные повреждения чаще встречаются у лиц с двумя почками, кроме того, отсутствие мониторинга микроциркуляторных изменений, которые предшествуют развитию канальцевой и клубочковой дисфункции. С другой стороны, использование в качестве лабораторных животных самок, не позволяет исключить усиление протективных свойств эстрогенов.

Другой способ профилактики микроциркуляторных нарушений в почках в эксперименте (Noha I, Hussien, Hanan T, Emam, The potential protective effects of erythropoietin and estrogen on renal ischemia reperfusion injury in ovariectomized rats. // Alexandria Journal of Medicine. 2016. Vol. 52, Is. 4. P. 325-335) включает моделирование патологии путем предварительной овариоэктомии с последующим наложением атравматичных зажимов на обе почечные ножки лабораторных крыс-самок на 50 минут. Для профилактики микроциркуляторных нарушений использовали однократное внутривентральное введение эритропоэтина в дозе 5000 МЕ/кг за 20 минут до ишемического стимула. Способ обеспечивает снижение концентрации креатинина и мочевины через 2 часа реперфузии, увеличение показателей микроциркуляции, нормализацию количества оксида азота, эндотелина-1 и провоспалительных маркеров в ткани почек, улучшение морфологической картины.

Основным недостатком способа является то, что используемая модель является труднопроизводимой (включает два последовательных этапа), а используемая доза эритропоэтина является эритропоэтической, что может осложнить течение

послеоперационного течения у пациентов (повышенный риск тромбозов, нарушений функции сердечно-сосудистой системы). С другой стороны, измерение показателей гемодинамики в крупной почечной артерии может не соответствовать уровню микроциркуляции в самой почке. Кроме того, отсутствует наблюдение за животными в динамике и срок реперфузии является недостаточным, так как через 2 часа имеются лишь начальные изменения почечной ткани.

Наиболее близким к заявленному является способ профилактики микроциркуляторных нарушений после ишемии-реперфузии в почках в условиях эксперимента (Rho kinase regulates renal blood flow by modulating eNOS activity in ischemia-reperfusion of the rat kidney / Amanda M. G. Versteilen, Iolente J. M. Korstjens, René J. P. Musters, A. B. Johan Groeneveld, and Pieter Sipkema // American Journal of Physiology-Renal Physiology 2006 291:3, F606-F611), включающий воспроизведение модели патологии и введение лабораторному животному ингибитора Rho-киназы Y27632 в дозе 1 мг/кг однократно до моделирования ишемии, продолжительность ишемического стимула составляет 60 минут, Y27632 вводят внутривенно за 60 минут до моделирования патологии и выраженность микроциркуляторных нарушений производят однократно через 1 час реперфузии.

Основным недостатком способа является то, что оценка микроциркуляторных изменений производится с использованием флуоресцентных микросфер, что является технически сложной методикой, не позволяет оценить состояние микроциркуляции в ткани почки, в том числе в динамике. С другой стороны, оценка изменений через 1 час реперфузии не может служить достоверным показателем эффективности вмешательства, так как максимум патологических изменений в почках при ишемии-реперфузии приходится на 1 и 3 сутки реперфузии. Кроме того, ингибирование Rho-киназы и блокада кальциевых каналов указанным препаратом может привести к системной гипотензии, которая негативно сказывается на течении и исходах острого почечного повреждения.

Задачей предлагаемого изобретения является создание более эффективного способа профилактики нарушений микроциркуляции в почках с использованием асиалированного эритропозтина в эксперименте.

Поставленная задача решается с помощью предложенного способа профилактики нарушений микроциркуляции в почках с использованием асиалированного эритропозтина в эксперименте, включающего профилактику лекарственным средством путем однократного введения его раствора крысам-самцам линии Wistar с последующим моделированием патологии путем наложения атравматичных зажимов на почечные ножки с последующей реперфузией кровотока в почках, причем продолжительность ишемического стимула составляет 40 минут, в качестве лекарственного средства используют асиалированный эритропозтин, вводимый в дозе 2,4 мкг/кг внутривенно за 30 минут до моделирования патологии, а оценку микроциркуляции проводят через 24 и 72 часа реперфузии.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ профилактики микроциркуляторных нарушений в почках с использованием асиалированного эритропозтина в эксперименте, подтверждаемый результатами измерения уровня микроциркуляции в почках методом лазерной доплеровской флоуметрии. Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что введение асиалированного эритропозтина в дозе 2,4 мкг/кг однократно за 30 минут до индукции ишемии приводит к выраженной профилактике нарушений микроциркуляции в почках в эксперименте.

Эритропозтин и его производные относят к стимуляторам эритропоеза и

цитопротекторным средствам. Асиалированный эритропоэтин является лишенной сиаловых кислот формой эритропоэтина, которая не имеет гематopoэтических свойств, но сохраняет цитопротекторные свойства [Mennini T, De Paolo M, Bigini P, et al. Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. Mol Med 2006; 12: 153; Wang X, Zhu C, Wang X, et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. J Neurochem 2004; 91: 900.].

#### СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

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.

Каждая группа включала 10 крыс. Первая группа – группа ложнооперированных животных (24 часа реперфузии), вторая группа – группа ложнооперированных животных (72 часа реперфузии); третья группа – с моделированием ишемически-реперфузионных повреждений почек (контроль, 24 часа), четвертая группа – с моделированием ишемически-реперфузионных повреждений почек (контроль, 72 часа), пятая группа – с коррекцией патологии асиалированным эритропоэтином (24 часа реперфузии), шестая группа – с коррекцией патологии асиалированным эритропоэтином (72 часа реперфузии), седьмая группа – с коррекцией патологии эритропоэтином (препарат сравнения, 24 часа реперфузии), восьмая группа – с коррекцией патологии эритропоэтином (препарат сравнения, 72 часа 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 40 минут под контролем микроциркуляции. Далее производили снятие зажимов, промывали брюшную полость 0,9% раствором натрия хлорида и послойно ушивали рану.

Асиалированный эритропоэтин (ООО «Протеиновый Контур») вводили в дозе 2,4 мкг/кг однократно внутривентриально за 30 мин до наложения сосудистых зажимов. Эритропоэтин вводили в дозе 50 МЕ/кг однократно внутривентриально за 30 мин до наложения сосудистых зажимов.

О выраженности протективного эффекта судили по результатам измерения уровня микроциркуляции, определяемого с помощью аппаратно-программного комплекса MP100 (Biopac System, Inc., США) с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и поверхностного датчика TSD143, который накладывался на среднюю часть почки, не затрагивая область ворот. Уровень микроциркуляции измеряли через 24 или 72 часа реперфузии в зависимости от экспериментальной группы. Регистрация и обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения AcqKnowledge версии 3.8.1. Значения показателей выражались в перфузионных единицах (ПЕ).

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

В группе ложнооперированных животных уровень микроциркуляции составлял  $870 \pm 96,48$  ПЕ и  $859 \pm 67,98$  ПЕ через 24 часа и 72 часа после начала эксперимента соответственно. Моделирование острого почечного повреждения приводило к статистически значимому снижению уровня микроциркуляции до  $418,1 \pm 46,02$  ПЕ и  $315,5 \pm 13,67$  ПЕ через 24 и 72 часа реперфузии соответственно.

Профилактическое применение асиалированного эритропоетина приводило к росту показателей микроциркуляции до  $725,6 \pm 47,41$  ПЕ и  $689,3 \pm 46,52$  ПЕ через 24 и 72 часа реперфузии соответственно, что достоверно превосходило показатели групп с моделированием ишемии-реперфузии и групп с профилактическим введением эритропоетина ( $662,9 \pm 22,71$  ПЕ и  $490,5 \pm 21,81$  ПЕ соответственно). Динамика показателей микроциркуляции представлена в таблице 1.

Таблица 1

Динамика показателей микроциркуляции в экспериментальных группах (ПЕ,  $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Экспериментальная группа	24 часа	72 часа
Ложнооперированные	$870,5 \pm 98$	$859 \pm 67,98$
Ишемия-реперфузия	$418,1 \pm 46,02^x$	$315,5 \pm 13,67^x$
Ишемия-реперфузия + асиалированный эритропоетин	$725,6 \pm 47,41^{xy}$	$689,3 \pm 46,52^{xy}$
Ишемия-реперфузия + эритропоетин	$662,9 \pm 22,71^{xy}$	$490,5 \pm 21,81^{xy}$

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 внутрибрюшинное введение асиалированного эритропоетина в дозе 2,4 мкг/кг однократно за 30 минут до индукции ишемии приводит к более выраженной профилактике ишемически-реперфузионных повреждений почек, чем введение эритропоетина в дозе 50 МЕ/кг, что подтверждается результатами измерения уровня микроциркуляции в почках методом лазерной доплеровской флоуметрии через 24 и 72 часа реперфузионного периода.

### (57) Формула изобретения

Способ профилактики ишемически-реперфузионного повреждения почек с использованием асиалированного эритропоетина в эксперименте, включающий профилактику лекарственным средством путем однократного введения его раствора крысам-самцам линии Wistar с последующим моделированием патологии путем наложения атравматичных зажимов на почечные ножки с последующей реперфузией кровотока в почках, отличающийся тем, что продолжительность ишемического стимула составляет 40 минут, в качестве лекарственного средства используют асиалированный эритропоетин, вводимый в дозе 2,4 мкг/кг внутрибрюшинно за 30 минут до моделирования патологии, а оценку микроциркуляции проводят через 24 и 72 часа реперфузии.