

# Коррекция дисфункции эндотелия – перспективное направление терапии ишемического повреждения почки

**В.В. Елагин<sup>1</sup>, О.И. Братчиков<sup>1</sup>, М.В. Покровский<sup>2</sup>, Д.А. Костина<sup>2</sup>, Т.Г. Покровская<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Кафедра урологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России,

<sup>2</sup> Кафедра фармакологии и клинической фармакологии Медицинского института ФГАОУ ВО НИУ «Белгородский государственный университет»

## Сведения об авторах:

Елагин В.В. – ассистент кафедры урологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: vlad.elagin2014@yandex.ru ORCID 0000-0001-6403-6131

Elagin V.V. – Assistant of the Department of Urology, Kursk State Medical University, e-mail: vlad.elagin2014@yandex.ru; ORCID 0000-0001-6403-6131

Братчиков О.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой урологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: bratov45@mail.ru;

ORCID 0000-0002-0906-9851

Bratnikov O.I. – Dr. Sc., Full Professor, Head of the Department of Urology, Kursk State Medical University, e-mail: bratov45@mail.ru; ORCID 0000-0002-0906-9851

Покровский М.В. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», НИУ «БелГУ», e-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru; ORCID 0000-0004-4895-1674

Pokrovskiy M.V. – Dr. Sc., Full Professor, Head of the Medical Institute's Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Director of the Research Institute of Living System's Pharmacology, Belgorod National Research University, e-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru; ORCID 0000-0004-4895-1674

Костина Д.А. – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», НИУ «БелГУ», e-mail: kostina\_da@bsu.edu.ru; ORCID 0000-0002-4505-3988

Kostina D.A. – Assistant of the Medical Institute's Department of Pharmacology, Belgorod National Research University, e-mail: kostina\_da@bsu.edu.ru; ORCID 0000-0002-4505-3988

Покровская Т.Г. – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», НИУ «БелГУ», e-mail: pokrovskaya-tg@mail.ru; ORCID 0000-0001-6802-5368

Pokrovskaya T.G. – Dr. Sc., Professor at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia; e-mail: pokrovskaya-tg@mail.ru; ORCID 0000-0001-6802-5368

Острое повреждение почек является важной клинической проблемой, затрагивающей 5-7% всех госпитализированных пациентов с высоким уровнем смертности и связанными с этим расходами на здравоохранение [1-4]. Ишемия с последующей реперфузией (ИР) является основной причиной острого почечного повреждения [3,5]. ИР почек инициирует изменения в почечном кровотоке, сосудистых эндотелиальных клетках, эпителиальных клетках почечных канальцев и лейкоцитах с гибелью клеток и истощением запасов АТФ, которые приводят к нарушению функции почек. Одним из ранних событий в ИР почек является повреждение эндотелия, что приводит к нарушению функционального состояния сосудов [6].

Таким образом, поиск инновационных молекул, влияющих на функциональное состояние эндотелия является одной из терапевтических стратегий нефропротекции для предупреждения развития острого почечного повреждения.

Целью нашего исследования являлось изучение возможности профилактики ишемически-реперфузионных повреждений почек селективным ингибитором аргиназы II – KUD975.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 180-220 г в соответствии с требованиями ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», с соблюдением «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123». Все крысы были разделены на следующие экспериментальные группы, по 10 животных в каждой:

I – ложнооперированные (л/о) (24 часа);

II – ложнооперированные (72 часа);

III – контрольная, моделирование 40-минутной ишемии-реперфузии почек (24 часа реперфузии);

IV – контрольная, моделирование 40-минутной ИР почек (72 часа реперфузии);

V – профилактическое однократное внутривенное введение селективного ингибитора аргиназы II – KUD975 в дозе 1 мг/кг за 120 минут до моделирования патологии (24 часа реперфузии);

VI – профилактическое однократное внутривенное введение селективного ингибитора аргиназы

II – KUD975 в дозе 1 мг/кг за 120 минут до моделирования патологии (72 часа реперфузии);

VII – профилактическое однократное внутривенное введение селективного ингибитора аргиназы II – KUD975 в дозе 3 мг/кг за 120 минут до моделирования патологии (24 часа реперфузии);

VIII – профилактическое однократное внутривенное введение селективного ингибитора аргиназы II – KUD975 в дозе 3 мг/кг за 120 минут до моделирования патологии (72 часа реперфузии);

IX – профилактическое однократное внутривенное введение L-норвалина в дозе 100 мг/кг однократно за 30 минут до моделирования патологии (24 часа реперфузии);

X – профилактическое однократное внутривенное введение L-норвалина в дозе 100 мг/кг однократно за 30 минут до моделирования патологии (72 часа реперфузии);

*Моделирование ишемии-реперфузии почек*

Под наркозом (хлоралгидрат, 300 мг/кг) выполнялась срединная лапаротомия. Петли кишечника отодвигали в сторону и с разницей в 5 минут производили наложение атравматичных сосудистых зажимов на почечные ножки на 40 минут. Ложноопериро-

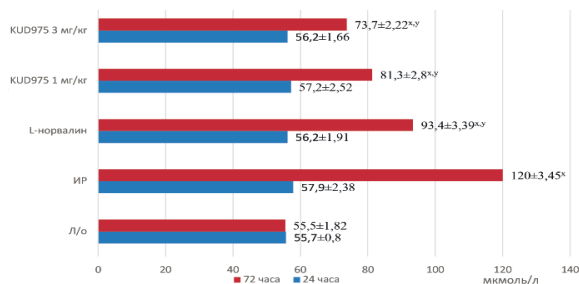


Рис. 1. Динамика сывороточной концентрации креатинина в экспериментальных группах  
Примечание: x –  $p < 0,05$  в сравнении с группой ложнооперированных животных; y –  $p < 0,05$  в сравнении с группой ишемии-реперфузии

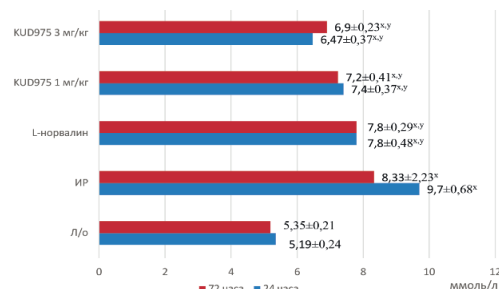


Рис. 2. Динамика сывороточной концентрации мочевины в экспериментальных группах  
Примечание: x –  $p < 0,05$  в сравнении с группой ложнооперированных животных; y –  $p < 0,05$  в сравнении с группой ишемии-реперфузии

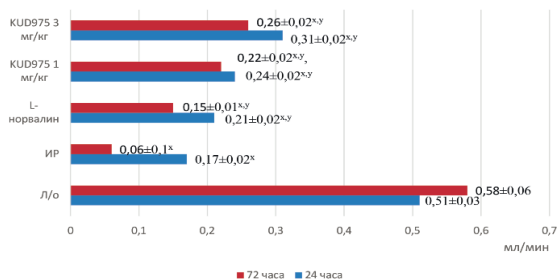


Рис. 3. Динамика скорости клубочковой фильтрации в экспериментальных группах  
Примечание: x –  $p < 0,05$  в сравнении с группой ложнооперированных животных; y –  $p < 0,05$  в сравнении с группой ишемии-реперфузии

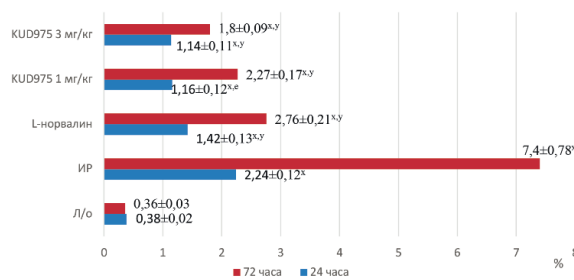


Рис. 4. Динамика фракционной экскреции натрия в экспериментальных группах  
Примечание: x –  $p < 0,05$  в сравнении с группой ложнооперированных животных; y –  $p < 0,05$  в сравнении с группой ишемии-реперфузии

ванные животные не подвергались двусторонней ишемии почек, им в брюшную полость вводился 0,9% раствор натрия хлорида (4-5 мл) и рана послойно ушивалась.

#### Измерение уровня микроциркуляции

Уровень микроциркуляции измеряли через 5 минут, 24 или 72 часа реперфузии в зависимости от экспериментальной группы, выражая значения в перфузионных единицах (ПЕ) и осуществляли с помощью аппаратно-программного комплекса MP100 (Biopac System, Inc., США) с модулем лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDF100C и поверхностного датчика TSD143. Регистрация и обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения AcqKnowledge версии 3.8.1.

#### Измерение концентрации креатинина, мочевины, натрия

В группах I, III, V, VII и IX сбор мочи осуществляли в метаболических клетках во временном промежутке 12 - 24 часа после окончания ишемии. В группах II, IV, VI, VIII и X сбор мочи осуществляли в метаболических клетках во временном промежутке 48- 72 часа после окончания ишемии. Далее под наркозом производили релaparотомию и отбирали кровь из правого желудочка для биохимических исследований. Измерялся суточный диурез.

Концентрацию уровня креатинина, мочевины и натрия в сыворотке крови и моче измеряли по общепринятой методике.

Расчет скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия Клиренс эндогенного креатинина (скорость клубочковой фильтрации (СКФ) рассчитывался следующим образом:

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

Фракционная экскреция натрия (ФЭН) рассчитывалась по следующей формуле:

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

#### Статистическая обработка данных

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее зна-

чение (M) и стандартная ошибка среднего (m). Межгрупповые различия анализировались параметрическими (t-критерий Стьюдента) или непараметрическими (критерий Манна-Уитни) методами, в зависимости от типа распределения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование ишемии-реперфузии почек приводило к росту креатинина и мочевины (рис. 1, 2). Параллельно росту креатинина падала скорость клубочковой фильтрации, уровень которой к третьим суткам составлял лишь  $0,06 \pm 0,01$  мл/мин (рис. 3). Канальцевые повреждения также нарастали от первых к третьим суткам эксперимента, что выражалось в значительном росте фракционной экскреции натрия (рис. 4). Микроциркуляторные нарушения также отмечались во всех временных точках эксперимента (табл. 1). ■

Таблица 1. Динамика уровня микроциркуляции при введении изучаемых веществ ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

| Экспериментальная группа           | 5 минут                  | 24 часа                  | 72 часа                  |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Ложнооперированные                 | 904,5±60,4               | 870,5±98                 | 859±68,0                 |
| Ишемия-реперфузия                  | 209±24,4 <sup>x</sup>    | 418,1±46,0 <sup>x</sup>  | 315,5±13,8 <sup>x</sup>  |
| Ишемия-реперфузия + L-норвалин     | 437,9±29,1 <sup>xy</sup> | 657,9±18,8 <sup>xy</sup> | 441,4±11,6 <sup>xy</sup> |
| Ишемия-реперфузия + KUD975 1 мг/кг | 431,1±32,9 <sup>xy</sup> | 691,8±23,5 <sup>xy</sup> | 485±16,4 <sup>xy</sup>   |
| Ишемия-реперфузия + KUD975 3 мг/кг | 604,7±43,5 <sup>xy</sup> | 718,2±44,5 <sup>xy</sup> | 653,6±62,0 <sup>xy</sup> |

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

Профилактическое введение селективного ингибитора аргиназы II на фоне моделирования ишемии-реперфузии почек приводило к значимому росту СКФ до  $0,24 \pm 0,02$  мл/мин и  $0,31 \pm 0,02$  мл/мин через 24 часа реперфузии в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг, соответственно. Неселективный ингибитор аргиназы L-норвалин оказывал менее выраженное влияние на СКФ, восстанавливая данный показатель до  $0,21 \pm 0,02$  мл/мин (рис. 3).

На 3-и сутки эксперимента также отмечалось дозозависимое улучшение фильтрационной способности почек, выражающееся в снижении концентрации сывороточного креатинина до  $81,3 \pm 2,8$  мкмоль/л и  $73,7 \pm 2,22$  мкмоль/л и восстановлении СКФ до  $0,22 \pm 0,02$  мл/мин и  $0,26 \pm 0,0$  мл/мин на фоне применения KUD975 в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг соответственно (рис. 1, 3).

Сывороточные значения концентрации мочевины подчинялись тем же закономерностям, что и сывороточная концентрация креатинина: снижались под действием KUD975 как на первые, так и третьи сутки эксперимента. Неселективный ингибитор аргиназы II оказывал менее выраженный эффект, причем фармакологическая коррекция L-норвалином на 3 сутки эксперимента не позволила достигнуть значений, достоверно отличающихся от группы ишемии-реперфузии (рис. 2).

На фоне применения KUD975 в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг отмечалось улучшение функционального состояния почечных канальцев, регистрируемое по снижению ФЭН которая была выражена в большей степени на 3-и сутки эксперимента и составляла  $2,27 \pm 0,17\%$  и  $1,8 \pm 0,09\%$  соответственно (рис. 4).

Однократное профилактическое применение селективного ингибитора аргиназы II KUD975 в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг за 120 минут до начала ишемии приводило к восстановлению уровня микроциркуляции во всех временных точках эксперимента, превосходя статистически достоверно показатели группы с применением неселективного ингибитора аргиназы II L-норвалина ( $p < 0,05$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аргиназы являются перспективными мишенями для коррекции дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях [7-11]. В недавнем исследовании было продемонстрировано, что как активность аргиназы в почках, так и экспрессия аргиназы II увеличиваются после ишемии-реперфузии почек [6]. Фармакологическая блокада или генетический дефицит аргиназы II опосредует защиту тканей почек после ишемии-реперфузии, что отражается в виде снижения в

плазме крови креатинина и мочевины, сохранении морфологической структуры почек, уменьшении апоптоза, инфильтрации воспалительными клетками и снижении уровня провоспалительных цитокинов. Таким образом, блокирование аргиназы возможно использовать в качестве терапевтического метода профилактики ОПП.

В настоящем исследовании мы продемонстрировали, что профилактическое применение селективного ингибитора аргиназы II улучшает функциональное состояние почек, превосходя по эффективности L-норвалин, что подтверждает гипотезу о блокировании аргиназы II в качестве терапевтического метода профилактики острого почечного повреждения. Результаты проведенного исследования показали, что профилактическое применение KUD975 дозозависимо приводит к снижению сывороточной концентрации маркеров почечного повреждения, росту скорости клубочковой фильтрации, снижению фракционной экскреции натрия и уменьшению микроциркуляторных нарушений во все временные точки эксперимента.

Таким образом, показано, что профилактика ишемически-реперфузионных повреждений почек селективным ингибитором аргиназы II – KUD975 является перспективной стратегией предупреждения острого почечного повреждения. ■

**Ключевые слова:** селективный ингибитор аргиназы II, ишемия-реперфузия, прекондиционирование, острое почечное повреждение.

**Key words:** selective inhibitor of arginase II, ischemia-reperfusion, preconditioning, acute kidney injury.

DOI 10.29188/2222-8543-2019-11-1-24-27

### Резюме:

*Введение.* Острое повреждение почек (ОПП), в основе которого лежат ишемически-реперфузионные повреждения, является широко распространенным жизнеугрожающим состоянием и остается серьезной проблемой здравоохранения в связи с высоким уровнем смертности пациентов. Несмотря на значительные достижения в различных областях медицины, профилактика и коррекция ишемически-реперфузионных повреждений почек еще далеки от желаемого уровня. Перспек-

### Summary:

**The correction of endothelial dysfunction is a promising direction for the therapy of acute kidney injury**

V.V. Yelagin, O.I. Bratchikov, M.V. Pokrovsky, D.A. Kostina, T.G. Pokrovskaya

*Introduction.* Acute kidney injury (AKI), which is based on ischemic-reperfusion damage, is a widespread life-threatening condition and remains a serious public health problem with a high

тивными направлениями в этой области являются фармакологическое preconditionирование и применение эндотелиопротекторов, поэтому целью настоящего исследования явилось изучение нефропротективных свойств селективного ингибитора аргиназы II KUD975 при ишемическом повреждении почек в эксперименте.

**Цель работы.** Изучить возможность профилактики ишемически-реперфузионных повреждений почек селективным ингибитором аргиназы II – KUD975.

**Материалы и методы.** В серии экспериментов на крысах-самцах линии Wistar изучали защитные эффекты профилактического применения ингибитора аргиназы II – KUD975 в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг в сравнении с неселективным ингибитором аргиназы L-норвалином на 40-минутной билатеральной модели ишемии-реперфузии почек (ИР). Ренопротективную активность оценивали по результатам биохимических маркеров почечного повреждения, динамики скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия, а также выраженности микроциркуляторных нарушений.

**Результаты.** Установлено, что профилактическое применение KUD975 дозозависимо приводит к снижению сывороточной концентрации маркеров почечного повреждения, росту скорости клубочковой фильтрации, снижению фракционной экскреции натрия и уменьшению микроциркуляторных нарушений во все временные точки эксперимента.

**Выводы.** Профилактика ишемически-реперфузионных повреждений почек селективным ингибитором аргиназы II – KUD975 является перспективной стратегией предупреждения острого почечного повреждения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

mortality rate among patients. Despite significant advances in various areas of medicine, the prevention and correction of ischemic-reperfusion kidney damage are still far from being at the desired level. Pharmacological preconditioning and the use of endotheliotectants are promising areas in this field, therefore the purpose of this study was to analyze the nephroprotective properties of selective inhibitor of arginase II KUD975 in ischemic kidney damage in the experiment.

**Objective.** To study the possibility of preventing ischemia-reperfusion kidney injury with the selective inhibitor of arginase II - KUD975.

**Materials and methods.** In a series of experiments on Wistar male rats, the protective effects of the prophylactic use of an inhibitor of arginase II-KUD975 at doses of 1 mg / kg and 3 mg / kg were compared with the non-selective arginase inhibitor L-norvaline on a 40-minute bilateral model of renal ischemia-reperfusion. Renoprotective activity was assessed by the results of biochemical markers of acute kidney injury, the dynamics of glomerular filtration rate and fractional sodium excretion, as well as the severity of microcirculatory disorders.

**Results.** It was found that the preventive use of KUD975 dose-dependently leads to a decrease in serum concentration of markers of acute kidney injury, an increase in glomerular filtration rate, a decrease in fractional sodium excretion, and a decrease in microcirculatory disorders at all time points of the experiment.

**Conclusions.** Prophylaxis of ischemia-reperfusion renal damage by selective inhibitor of arginase II - KUD975 is a promising strategy for the prevention of acute kidney injury.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet* 2012;380:756-766. doi:10.1016/S0140-6736(11)61454-2.
- Liangos O, Wald R, O'Bell JW, Price L, Pereira BJ, Jaber BL. Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1(1):43-51. doi:10.2215/CJN.00220605.
- Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):2199-2210.
- Shramenko KK, Gorodnik GA, Shano VP, Kuznetsova IV, Grigorenko AP, Potapov VV. Pharmacological correction of intercept hemodynamics in acute kidney damage (part 1). Research result: pharmacology and clinical pharmacology 2017;3(3): 110-120. doi: 10.18413/2313-8971-2017-3-3-110-120.
- Rabb H. Does statin pretreatment reduce the risk of contrast-induced nephropathy? *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2(3):124-125.
- Raup-Konsavage WM, Gao T, Cooper TK, Morris SM Jr, Reeves WB, Awad AS. Arginase-2 mediates renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 2017; 313(2): F522-F534. doi:10.1152/ajprenal.00620.2016.
- Kudryavtsev KV, Korokin MV, Gudyrev OS. Pharmacological efficacy of an inhibitor of arginase-2 KUD975 with L-NAME-induced endothelial dysfunction. Research result: pharmacology and clinical pharmacology 2017; 3(1): 10-17. doi: 10.18413/2500-235X-2017-3-1-10-17.
- Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang CI, Kuo L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J* 2001;15(7):1264-1266.
- Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, Burke S, et al. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 2003;108(16): 2000-2006.
- Koklin IS. Use of selective inhibitors of arginase 2 and tadalafil in combined compensation of homocysteine-induced endothelial dysfunction. Research result: pharmacology and clinical pharmacology 2015;1(1):13-19. doi: 10.18413/2500-235X-2015-1-4-15-20
- Yakushev VI, Pokrovskii MV. Cardiovascular effects of an arginase II selective inhibitor. Research result: pharmacology and clinical pharmacology 2016;2(3):28-46. doi: 10.18413/2500-235X -2016-2-3-28-45