



УДК: 616-005.4

DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-6

В.В. Елагин¹,
О.И. Братчиков¹,
А.А. Ульянова²

**ПОДХОДЫ К КОРРЕКЦИИ ИШЕМИЧЕСКИХ
И РЕПЕРFUЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПОЧЕК
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет», ул. К. Маркса, д. 3, г. Курск, 305041, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Миусская пл., д. 9, г. Москва, 125047, Российская Федерация
Автор для переписки: В.В. Елагин (vlad.elagin2014@yandex.ru)

Информация для цитирования: Елагин В.В., Братчиков О.И., Ульянова А.А. Подходы к коррекции ишемических и реперфузионных повреждений почек в эксперименте // Научные результаты биомедицинских исследований. 2018. Т. 4, N 3. С. 63-69. [Elagin VV, Bratchikov OI, Ulyanova AA. Approaches to correction of ischemic and reperfusion kidney injuries in experiment. Research Results in Biomedicine. 2018;4(3):63-69 (In Russian)]. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-6

Аннотация

Актуальность: Острое почечное повреждение является актуальной проблемой здравоохранения, находящейся на стыке специальностей с высоким уровнем инвалидизации и смертности пациентов. Актуальность исследования обусловлена противоречивыми данными о потенциальных механизмах профилактики данного рода повреждений и отсутствии единой терапевтической стратегии, несмотря на возможность проведения заместительной терапии. **Цель исследования:** Изучение возможности коррекции ишемических и реперфузионных повреждений почек в эксперименте асиалированным эритропоэтином и селективным ингибитором аргиназы II KUD975. **Материалы и методы:** В серии экспериментов на крысах-самцах линии Wistar изучали ренопротективные свойства профилактического применения комбинации асиалированного эритропоэтина (2.4 мкг/кг за 30 минут до индукции ишемии) и селективного ингибитора аргиназы II KUD975 (120 мг/кг за 120 минут до индукции ишемии) на 40-минутной билатеральной модели ишемии-реперфузии почек. Ренопротективные свойства оценивали по результатам биохимических маркеров острого почечного повреждения, динамики скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия, а также выраженности микроциркуляторных нарушений. **Результаты:** Установлено, что профилактическое применение комбинации асиалированного эритропоэтина KUD975 приводит к снижению сывороточной концентрации маркеров острого почечного повреждения, росту скорости клубочковой фильтрации, снижению фракционной экскреции натрия и уменьшению микроциркуляторных нарушений. **Заключение:** Коррекция ишемических и реперфузионных повреждений почек в эксперименте асиалированным эритропоэтином и селективным ингибитором аргиназы II KUD975 является эффективной стратегией профилактики и лечения острого почечного повреждения.

Ключевые слова: острое почечное повреждение; ишемия-реперфузия; асиалированный эритропоэтин; ингибитор аргиназы II, KUD975

Vladislav V. Elagin¹,
Oleg I. Bratchikov¹,
Anastasia A. Ulyanova²

APPROACHES TO CORRECTION OF ISCHEMIC AND REPERFUSION KIDNEY INJURIES IN EXPERIMENT

¹ Kursk State Medical University,
3 K. Marx St., Kursk, 305041, Russia

² Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia,
9 Miusskaya Sq., Moscow, 125047, Russia

Corresponding author: Vladislav V. Elagin (vlad.elagin2014@yandex.ru)

Abstract

Background: Acute kidney injury is an urgent health problem at the junction of specialties with a high level of disability and mortality of patients. The pertinence of the study stems from conflicting data on the potential mechanisms for preventing this type of injury and the lack of a single therapeutic strategy, despite the possibility of substitution therapy. **The aim of the study:** To study the possibility of correcting ischemic and reperfusion renal injuries in an experiment with asialo erythropoietin and a selective inhibitor of arginase II KUD975. **Materials and methods:** In a series of experiments on Wistar male rats, there were studied the renoprotective properties of the prophylactic application of the combination of asialo erythropoietin (2.4 µg/kg 30 minutes before the induction of ischemia) and the selective inhibitor of arginase II KUD975 (120 mg/kg 120 minutes before the induction of ischemia) on a 40-minute bilateral model of renal ischemia-reperfusion. Renoprotective properties were evaluated by the results of biochemical markers of acute renal damage, the dynamics of glomerular filtration rate and fractionated sodium excretion, as well as the severity of microcirculatory disorders. **Results:** It has been established that the prophylactic use of the combination of asialo erythropoietin KUD975 leads to a decrease in the serum concentration of markers of acute renal damage, an increase in the glomerular filtration rate, a decrease in fractional sodium excretion, and a decrease in microcirculatory disorders. **Conclusion:** Correction of ischemic and reperfusion renal injuries in the experiment with asialo erythropoietin and selective inhibitor of arginase II KUD975 is an effective strategy for the prevention and treatment of acute kidney injury.

Keywords: acute kidney injury; ischemia-reperfusion; asialo erythropoietin; inhibitor of arginase II; KUD975

Введение. Заболеваемость острым почечным повреждением в общей популяции неуклонно возрастает и составляет от 181 до 288 на 100000 населения [1]. Одним из ведущих механизмов острого почечного повреждения является ишемически-реперфузионная травма почек. Роль данного механизма важна в развитии осложнений кардиохирургических операций, трансплантации почек, рентгенконтрастных исследова-

ний, онкоурологических вмешательств [2, 3]. В связи с этим, поиск новых терапевтических стратегий является одним из актуальных направлений для профилактики острого почечного повреждения ишемически-реперфузионного генеза.

Основными механизмами, лежащими в основе ишемически-реперфузионной травмы являются микроциркуляторные нарушения, дисбаланс вазоактивных веществ,

окислительный стресс, эндотелиальная дисфункция и локальная активация воспаления, что приводит к структурным и функциональным нарушениям в почках [4, 5]. Таким образом, с связи с множеством взаимосвязанных патогенетических звеньев развития ишемии-реперфузии почек, фармакологическая коррекция одним препаратом не позволит устранить все последствия данного вида повреждений, в связи с чем комбинированная фармакотерапия будет предпочтительна в качестве одной из возможных терапевтических стратегий.

Эритропоэтин (ЭПО), гликопротеиновый гормон, не только стимулирует эритропоэз, но и обладает широким спектром плеотропных эффектов: антиоксидантными, антиапоптотическими и противовоспалительными [6], реализация которых связана с гетеродимерным рецептором ЭПОР- β CR [7, 8, 9]. Одними из производных ЭПО, имеющими высокое сродство к данному виду рецепторов и короткий период полувыведения являются асиалированные формы эритропоэтина (асиалоЭПО).

С другой стороны, другим важным аспектом в профилактике ишемических и реперфузионных повреждений является коррекция дисфункции эндотелия и микроциркуляторных нарушений. Одними из перспективных мишеней для коррекции дисфункции эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях являются ферменты – аргиназы, участвующие в регуляции продукции оксида азота и существующие в двух изоформах [10, 11, 12]. В одном из недавних исследований было продемонстрировано, что как активность аргиназы в почках, так и экспрессия аргиназы II увеличиваются после почечной ишемии-реперфузии [13].

В связи с этим актуальным является изучение потенциальных нефропротективных свойств асиалированного эритропоэтина и селективного ингибитора аргиназы II.

Цель исследования: изучение возможности коррекции ишемических и реперфузионных повреждений почек в эксперименте асиалированным эритропоэтином и селективным ингибитором аргиназы II KUD975.

Материалы и методы исследования.

Исследование проводили на крысах-самцах линии Wistar массой 180-220 г. Все крысы были разделены на следующие экспериментальные группы, по 10 животных в каждой:

I – ложнооперированные (24 часа);

II – ложнооперированные (72 часа);

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

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

V – предварительное внутрижелудочное введение KUD975 в дозе 3 мг/кг за 120 минут до моделирования патологии и внутрибрюшинное введение асиалированного эритропоэтина (асиалоЭПО) в дозе 0.4 мкг/кг за 30 минут до моделирования патологии (24 часа реперфузии);

VI – предварительное внутрижелудочное введение KUD975 в дозе 3 мг/кг за 120 минут до моделирования патологии и внутрибрюшинное введение асиалированного эритропоэтина (асиалоЭПО) в дозе 0.4 мкг/кг за 30 минут до моделирования патологии;

Моделирование ишемии-реперфузии почек

После 12-часовой пищевой депривации под наркозом (интраабдоминальным введением водного раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг) выполнялась срединная лапаротомия. Петли кишечника отодвигали в сторону и с разницей в 5 минут производили наложение атравматических сосудистых зажимов на почечные ножки на 40 минут. Ложнооперированные животные не подвергались двусторонней ишемии почек. В брюшную полость вводился 0,9% раствор натрия хлорида (4-5 мл) и рана послойно ушивалась.

Измерение уровня микроциркуляции

Осуществляли 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 сразу после снятия

сосудистых зажимов с почки в течение 5 минут, 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).

Измерение концентрации креатинина, мочевины, натрия

В зависимости от экспериментальной группы, через 12 или 48 часов реперфузии крыс помещали в метаболические клетки и осуществляли сбор мочи в течение 12 или

48 часов. Далее под наркозом производили релапаротомию 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 с использованием автоматических и полуавтоматических анализаторов.

Расчет скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия

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

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

Фракционная экскреция натрия (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 значение (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 их обсуждение. Моделирование ишемии-реперфузии почек приводило к росту биохимических маркеров острого почечного повреждения: креатини-

на и мочевины, причем уровень мочевины возрастал в большей степени на первые сутки эксперимента, а креатинин – на третьи (табл. 1). Параллельно росту креатинина падала скорость клубочковой фильтрации, уровень которой к третьим суткам составлял лишь 0.06 ± 0.01 мл/мин (табл. 2). Канальцевые повреждения также нарастали от первых к третьим суткам эксперимента, что выражалось в значительном росте фракционной экскреции натрия (табл. 2). Микроциркуляторные нарушения также отмечались во всех временных точках эксперимента (табл. 3).

Таблица 1

Динамика сывороточных концентраций креатинина и мочевины при введении изучаемых веществ (M±m; n=10)

Table 1

Dynamics of serum concentrations of creatinine and urea with the introduction of the studied substances (M±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
ИР	57.9±2.38	120±3.45 ^x	9.7±0.68 ^x	8.33±0.23 ^x
ИР + KUD975 + асиалоЭПО	54.4±1.83	61±2.17 ^y	5.67±0.19 ^y	6.13±0.16 ^y

Примечание: ^x – p<0.05 в сравнении с группой ложнооперированных животных; ^y – p<0.05 в сравнении с группой контроля.

Note: ^x – p<0.05 compared with the group of sham-operated animals; ^y – p<0.05 compared with the control group.

Таблица 2

Динамика скорости клубочковой фильтрации и фракционной экскреции натрия при введении изучаемых веществ (M±m; n=10)

Table 2

Dynamics of the glomerular filtration rate and fractional sodium excretion upon administration of the studied substances (M±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
ИР	0.17±0.02 ^x	0.06±0.01 ^x	2.24±0.12 ^x	7.4±0.78 ^x
ИР + KUD975 + асиалоЭПО	0.45±0.03 ^y	0.42±0.03 ^y	0.65±0.04 ^{x,y}	0.8±0.04 ^{x,y}

Примечание: ^x – p<0.05 в сравнении с группой ложнооперированных животных; ^y – p<0.05 в сравнении с группой контроля.

Note: ^x – p<0.05 compared with the group of sham-operated animals; ^y – p<0.05 compared with the control group.

Таблица 3

Динамика уровня микроциркуляции при введении изучаемых веществ (M±m; n=10)

Table 3

Dynamics of microcirculation level when introducing the studied substances (M±m; n=10)

Экспериментальная группа	5 минут	24 часа	72 часа
Ложнооперированные	904.5±60.43	870.5±98	859±67.98
ИР	209±24.42 ^x	418.1±46.02 ^x	315.5±13.67 ^x
ИР + KUD975 + асиалоЭПО	803.4±25.23 ^y	775.5±29.13 ^y	801.3±20.16 ^y

Примечание: ^x – p<0.05 в сравнении с группой ложнооперированных животных; ^y – p<0.05 в сравнении с группой контроля.

Note: ^x – p<0.05 compared with the group of sham-operated animals; ^y – p<0.05 compared with the control group.

Комбинированная терапия асиалированным эритропозтином в дозе 2.4мкг/кг и KUD975 в дозе 3 мг/кг способствовала улучшению фильтрационной способности почек и восстановлению функции канальцев. Так, на 1 сутки эксперимента СКФ воз-

растала до 0.45±0.03 мл/мин, достоверно не отличаясь от показателей ложнооперированных животных при отсутствии влияния на уровень креатинина в сыворотке крови, а ФЭН снижалась до 0.65±0.04%. На 3 сутки эксперимента комбинированная терапия

асиалированным эритропоезином и KUD975 приводила к нормализации уровня креатинина до 61 ± 2.17 мкмоль/л и увеличению скорости клубочковой фильтрации до 0.42 ± 0.03 мл/мин и снижению ФЭН до $0.8 \pm 0.04\%$.

Однократное профилактическое применение комбинации асиалированного эритропоезина и селективного ингибитора аргиназы II KUD975 также приводило к восстановлению уровня микроциркуляции во всех временных точках эксперимента, сопоставимых с показателями группы ложнооперированных животных.

Заключение. Таким образом, коррекция ишемических и реперфузионных повреждений почек в эксперименте асиалированным эритропоезином и селективным ингибитором аргиназы II KUD975 является эффективной стратегией профилактики и лечения острого почечного повреждения.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Acute kidney injury and mortality in hospitalized patients / H.E. Wang [et al.] // Am J Nephrol. 2012. N 35. P. 349-355. <https://doi.org/10.1159/000337487>
2. Роль фармакологического preconditionирования при ишемических и реперфузионных повреждениях почек / Д.А. Костина [и др.] // Урология. 2017. N 5. С. 139-144.
3. Ischemia-reperfusion: from cell biology to acute kidney injury / N. Chatauret [et al.] // Prog Urol. 2014. 24 (Suppl 1). P. S4-12. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(14\)70057-0](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(14)70057-0)
4. Hussien N.I., Emam H.T. The potential protective effects of erythropoietin and estrogen on renal ischemia reperfusion injury in ovariectomized rats // Alexandria Journal of Medicine. 2016. Vol. 52(4). P. 325-335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2015.12.001>
5. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney / M. Legrand [et al.] // Mol Med. 2008. Vol. 14(7-8). P. 502-516. doi: [10.2119/2008-00006.Legrand]
6. Banaei S., Ahmadiasl N., Alihemmati A. Comparison of the protective effects of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury [Electronic] Trauma Monthly. 2016. Vol. 21(3). Art e23005. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5124127/> (дата обращения: 13.08.2018)

7. Mofidi A., Bader A., Pavlica S. The use of erythropoietin and its derivatives to treat spinal cord injury // Mini Rev. Med. Chem. 2011. Vol. 11(9). P. 763-770. doi: <https://doi.org/10.2174/138955711796355267>

8. Peresyphkina A.A. Correction of ischemic optic neuropathy in rats by carbamylated darbepoetin. // Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology. 2018. Vol. 4(1). P. 43-50. doi: 10.3897/rpharmacology.4.25262

9. Search of new pharmaceuticals on the basis of darbepoetin in the treatment of ischemic stroke (review of literature) / K.M. Reznikov [et al.] // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2017. Vol. 3(1) P. 125-136. doi: 10.18413/2500-235X-2017-3-1-125-136.

10. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels / D.E. Berkowitz [et al.] // Circulation. 2003. N 108. P. 2000-2006. doi: 10.1161/01.CIR.0000092948.04444C7.

11. Pharmacological efficacy of an inhibitor of arginase-2 KUD975 with L-NAME-induced endothelial dysfunction / K.V. Kudryavtsev, M.V. Korokin, O.S. Gudyrev // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2017. Vol. 3(1). P. 10-17. doi: 10.18413/2500-235X-2017-3-1-10-17

12. Yakushev V.I., Pokrovskii M.V. Cardiovascular effects of an arginase II selective inhibitor // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2016. Vol. 2(3). P. 28-46. doi: 10.18413/2500-235X-2016-2-3-28-45

13. Arginase-2 mediates renal ischemia-reperfusion injury / W.M. Raup-Konsavage [et al.] // American Journal of Physiology – Renal Physiology. 2017. Vol. 313(2). P. F522-F534. doi:10.1152/ajprenal.00620.2016.

References

1. Wang HE, Muntner P, Chertow GM, et al. Acute kidney injury and mortality in hospitalized patients. Am J Nephrol. 2012;35:349-355. <https://doi.org/10.1159/000337487>
2. Kostina DA, Pokrovskaya TG, Olefir YuV, et al. [The role of pharmacological preconditioning in renal ischemic and reperfusion injury]. Urologiya. 2017;5:139-144. Russian.
3. Chatauret N, Badet L, Barroua B, et al. Ischemia-reperfusion: from cell biology to acute kidney injury. Prog Urol. 2014;24(1):S4-12. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(14\)70057-0](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(14)70057-0)
4. Hussien NI, Emam HT. The potential protective effects of erythropoietin and estrogen on renal ischemia reperfusion injury in ovariectomized

rats. Alexandria Journal of Medicine. 2016;52(4):325-335.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2015.12.001>

5. Legrand M, Mik EG, Johannes T, et al. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. Mol Med. 2008;14(7-8):502-516. doi: [10.2119/2008-00006.Legrand]

6. Banaei S, Ahmadiasl N, Alihemmati A. Comparison of the protective effects of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury. Trauma Monthly [Internet]. 2016 [cited 2018 August 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5124127/>

7. Mofidi A, Bader A, Pavlica S. The use of erythropoietin and its derivatives to treat spinal cord injury. Mini Rev. Med. Chem. 2011;11(9):763-770.

doi: <https://doi.org/10.2174/138955711796355267>

8. Peresyapkina AA. Correction of ischemic optic neuropathy in rats by carbamylated darbepoetin. Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology. 2018;4(1):43-50. doi: 10.3897/rpharmacology.4.25262

9. Reznikov KM, Gorbunova NS, Koleznichenko PD, et al. Search of new pharmaceuticals on the basis of darbepoetin in the treatment of ischemic stroke (review of literature). Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2017;3(1):125-136. doi: 10.18413/2500-235X-2017-3-1-125-136.

10. Berkowitz DE, White R, Li D, et al. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. Circulation. 2003;108:2000-2006.

doi:10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7

11. Kudryavtsev KV, Korokin MV, Gudyrev OS. Pharmacological efficacy of an inhibi

tor 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

12. 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

13. Raup-Konsavage WM, Gao T, Cooper TK, et al. Arginase-2 mediates renal ischemia-reperfusion injury. American Journal of Physiology – Renal Physiology. 2017;313(2):F522-F534. doi:10.1152/ajprenal.00620.2016.

Владислав Викторович Елагин, ассистент, кафедра урологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет».

Олег Иванович Братчиков, доктор медицинских наук, профессор, заведующий, кафедра урологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет».

Анастасия Александровна Ульянова, студент 4 курса по направлению подготовки 18.03.01 Химическая технология, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева».

Vladislav V. Elagin, Assistance Lecturer of the Department of Urology, Kursk State Medical University.

Oleg I. Bratchikov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Urology, Kursk State Medical University.

Anastasia A. Ulyanova, 4th-year Student of Direction 18.03.01 Chemical Technology, Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia.

Статья поступила в редакцию 7 апреля 2018 г.
Receipt date 2018 April 7.