



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **327**

(51) **6 A61K 38/30**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 96000328
(22) 15.09.93
(31) 07/949,594
(32) 22.09.92
(33) US
(46) Бюл.№4 (24), 24.12.2001
(86) PCT/US 93/08734, 15.09.93
(72) Росс Г. Кларк (US)
(71)(73) Дженентек, Инк. (US)
(56) 1. Патент США 5077276, 31.12.91;
2. WO 87/01038, 26.02.87;
3. WO 89/05822, 29.06.89;
4. EP 230869, 05.08.87;
5. EP 128733, 19.13.84
(54) СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ОСТРОЙ ПО-
ЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
(57) Настоящее изобретение относится к способу
предотвращения или уменьшения интенсивности

приступов острой почечной недостаточности у мле-
копитающих. Острая почечная недостаточность
может быть обусловлена уменьшенным почечным
кровотоком или нефротоксинами, вызывающими
некроз клеток и ослабление функции почек.

В заявке описан способ профилактического
лечения млекопитающих с повышенным риском
возникновения острой почечной недостаточности
вследствие ишемии почек или нефротоксического
поражения. Этот способ включает введение млеко-
питающему эффективного количества инсулиноподобного фактора роста IGF-I до момента или в мо-
мент, когда предполагается возникновение или воз-
никает ОПН. Предпочтительно IGF-I представляет
собой IGF-I взрослого человека с естественной по-
следовательностью.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения или уменьшения интенсивности приступов острой почечной недостаточности у млекопитающих. Острая почечная недостаточность может быть обусловлена уменьшенным почечным кровотоком или нефротоксинами, вызывающими некроз клеток и ослабление функции почек.

Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGP-I) представляет собой полипептид, содержащийся в жидкостях, входящих в состав человеческого тела, таких, например, как кровь или спинномозговая жидкость. Большинство тканей, включая почки, вырабатывает IGF-I вместе со специфическими IGF-связывающими протеинами. Доминирующее стимулирующее влияние на выработку IGF-I оказывает гормон роста (GH), а некоторые из IGF-связывающих протеинов также подвержены влиянию GH. См. Tanner et al., *Ada Endocrinol.*, 84: 681-696 (1977); Uthne et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39: 548-554 (1974). IGF-I был выделен из сыворотки крови человека, а также получен в рекомбинантной форме. См., например. Европейские патенты EP 123228 и 128733.

Гормон роста человека (hGH) представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из 191 аминокислоты (молекулярный вес 21500). Дисульфидные связи находятся в положениях 53 и 165 и в положениях 182 и 189. См. Niall, *New Biology*, 230: 90 (1971). hGH представляет собой потенциальный анаболик, прежде всего из-за своей способности удерживать азот, фосфор, калий и кальций. Лечение крыс с гипопизэктомией с помощью GH может по крайней мере частично восстановить скорость роста крыс. См. Moore et al., *Endocrinology*, 122: 2920-2926 (1988). Наиболее положительным влиянием на объекты с гипопитуитаризмом (дефицит GH) является значительное ускорение линейного роста пластинок костных хрящей, приводящее к увеличению роста. см. Kaplan, *Growth Disorders in Children and Adolescents* (Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1964).

В литературе сообщалось, что секреция GH уменьшается с возрастом, прежде всего у женщин после менопаузы. См. Millard et al., *Neurobiol. Aging*, 11: 229-235 (1990); Takahashi et al., *Neuroendocrinology*, 46:137-142 (1987). См. также Rudman et al., *J. Clin. Invest.*, 67,1361-1369 (1981) и Blackman, *Endocrinology and Aging*, 16: 981 (1987). Более того, сообщалось о том, что некоторые возрастные изменения, включая уменьшение мышечной массы тела, увеличение жировой ткани и истончение кожи, можно уменьшить, принимая GH три раза в неделю. см, например, Rudman et al., *N. Eng. J. Med.*, 323: 1-6 (1990) и соответствующую статью в том же журнале, опубликованную Dr. Vance (стр. 52-54).

В литературе сообщалось, что уровни IGF-I уменьшаются наполовину у 20-месячных крыс по сравнению с 6-месячными. См. Takahashi and Meiters, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 186: 229-233 (1987). См. также Florini и Roberts, *J. Gerontol.*, 35: 23-30 (1980); Florini et al., *Mech. Ageing Dev.*, 15:165-176 (1981); Chatelain et al., *Pediatric*, 44: 303-308 (1989); Florini et al., *J. Gerontol.*, 40: 2-7 (1985); Hall и Sara, *Clinics in Endocrin. and Metab.*, 13: 91

(1984); Baxter, *Advances in Clinical Chemistry*, 25: 49 (1986); Clemmons и Underwood, *Clinics in Endocrin. and Metab.*, 15: 629 (1986); Hintz, *Advances in Pediatrics*, 28: 293 (Year Book Medical Publishers, Inc., 1981), Johanson и Blizzard, *The Johns Hopkins Medical Journal*, 149: 115-117 (1981), причем в пяти последних публикациях описаны низкие уровни IGF-I у пожилых людей. Публикации авторов Hintz, Clemmons и Underwood, а также Baxter являются общими обзорами по IGF-I.

Более того, было установлено, что среди диплоидных фибропластов человека, способных проходить клеточный цикл, в культуре клеток пожилых людей *in vitro* происходило мало изменений при регуляции ростовой активности под действием тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и эпидермального фактора роста (EGF), однако регуляция под действием IGF-I значительно увеличивает скорость вступления в S-фазу. См. Chen и Rabinovitch, *J. Cell. Physiol.*, 144:18-25 (1990). Авторы делают вывод, что более медленный рост популяции делящихся клеток в культуре клеток пожилых людей можно объяснить тем, что необходимо значительно более высокое содержание IGF-I, чем то, которое поддерживается обычно. Это может быть связано с гиперпродукцией IGF-I-связывающего протеина, т.е. протеина IGFBP-3 (IGF-I binding protein) и, следовательно, с уменьшением количества IGF-I, взаимодействующего с рецептором. См. Goldstein et al., "Cellular and Molecular Applications to Biology of Aging", APCR Meeting abstract, Сиэтл, 4-5 мая 1991.

Проводилось определение различных видов биологической активности IGP-I для нестарых млекопитающих. Например, в литературе сообщалось, что IGF-I снижает уровень глюкозы в крови человека при лечении диабета. См. Guler et al., *N. Engl. J. Med.*, 317: 137-140 (1987); Froesch et al., патент США 4988675. Кроме того, имеются публикации, в которых сообщается о том, что IGF-I полезен при лечении нарушений сердечной деятельности (см. Международную заявку WO 92/11865, опубликованную 23 июля 1992 г.) и для промотирования роста при некоторых метаболических состояниях, характеризующихся низкими уровнями IGF-I, например, при гипопизэктомии крыс (Scottner et al., *J. Endocr.*, 112: 123-132 [1987]); диабете у крыс (Scheiwiller et al., *Nature*, 323: 169-171 [1986]) и карликовости крыс (Scottner et al., *Endocrinology*, 124: 2519-2526 30 [1989]). Анаболический эффект IGP-I у быстрорастущих новорожденных крыс был продемонстрирован *in vivo*. См. Philipps et al., *Pediatric Res.*, 23: 298 (1988).

Хорошо известно, что у недокормленных, больных или находящихся в состоянии стресса животных уровень IGF-I понижен.

Вес почки крыс с гипопизэктомией значительно увеличивается при пролонгированном подкожном введении IGF-I. См. Guler et al., *Proceedings of the 1st European Congress of Endocrinology*, 103: перепечат 12-390 (Копенгаген, 1987); Guler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4889-4893 (1988). Почки карликовых крыс линии Snell и карликовых крыс ведут себя одинаково. См. Van Buul-Offers et al., *Pediatr. Res.*, 20: 825-827 (1986); Scottner et al., *Endo-*

crinology, см. выше. Было обнаружено, что усеченная молекула IGF-I, называемая des-IGF-I, у которой удалены три первых N-концевых аминокислоты, по сравнению с IGF-I обладает более сильным действием в качестве фактора роста на крыс с дефицитом GH. см. Lemmey et al., *Am. J. Physiol.*, 260: E213-E219 (1991).

Проводилось большое количество исследований, показывающих, что введение GH человеку и животным увеличивает скорость клубочковой фильтрации, почечный кровоток, проксимальную тубулярную реабсорбцию фосфата и проксимальный тубулярный глюцеогенезис. См. Corvilain и Abramow, *J. Clin. Invest.*, 43: 1608-1612 (1964). В литературе сообщалось, что помимо этого действия на функцию почек избыток GH вызывает гипертрофию клубочков и проксимальных трубочек (Gershberg et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 17: 377-385 [1957]). Однако указано также, что некоторые из этих действий GH не являются непосредственными, так как при кратковременной инфузии GH функция почек человека остается неизменной. См. Parving et al., *Acta Endocrinol.*, 89: 796-800 [1978].

Ростовая и анаболическая активность нормальных тканей во всем теле также связаны с осью GH-IGF. Полагают, что влияние GH в значительной степени медируется факторами IGF, которые первоначально были названы как "соматомедины" или медиаторы роста. Уровень IGF-I увеличивается в сосудах почек через 1-2 дня после односторонней нефрэктомии у наблюдаемых диабетиков и при недостатке калия. См. Flyvbjerg et al., "Kidney IGF-I Accumulation Occurs in Four Different Conditions with Rapid Initial Kidney Growth in Rats", *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors*, изд. EM Spencer, Elsevier Publishing, NY, стр. 207-217 (1991); Stiles et al., *Endocrinology*, 117: 2397-2401 (1985). Было обнаружено, что GH стимулирует экспрессию гена IGF-I в выделенном прямом почечном канальце крысы. см. Rogers et al., *J. Amer. Phys.*, P474-P479 (1990). GH может корректировать большой недостаток кислотности в почках крыс с гипопизэктомией, при этом результат зависит от дозы. см. Welbourne и Cronin, *J. Amer. Phys.*, R1036-R10432 (1991).

Хотя некоторые из воздействий GH, которые обнаружены ранее, проявлялись при введении IGF-I в организм животных и человека (Guler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4889-4893 [1981]), инсулиноподобные факторы роста не обязательно регулируются GH. Как описано у Quigley и Baum, *J. Clin. Invest.*, 88: 368-374 (1991), были получены различные результаты действия GH и IGF-I на перенос через проксимальный извитый почечный каналец кролика. В этой публикации сказано, что в то время как GH не влияет на перенос фосфата, IGF-I непосредственно стимулирует перенос фосфата в проксимальном извитом почечном канальце.

В литературе были сообщения о том, что печень вырабатывает IGF в ответ на введение GH и что концентрация IGF-I в почечных тканях очень высока. См. McConaghey и Dehnel, *J. Endocrinol.*, 52: 587-588 (1972), D'Ercole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 935-939 (1984). При дальнейших наблюдениях соответственно было обнаружено, что уровень

мПНК инсулиноподобного фактора роста IGF-I в печени устойчив даже в отсутствии GH (Murphy et al., *Endocrinology*, 121: 684-691 [1985]) и что происходит локализация при иммуногистохимии протеина IGF-I в прямых почечных каналах. см. Andersson и Jennische, *Ada Physiol. Scand.*, 132: 453-457 (1988). Кроме того, мПНК IGF-I была идентифицирована в прямом почечном канале крысы (Fagin и Melmed, *Endocrinol.*, 120: 718-723 [1985]) и в зародыше человека. См. Han et al., *Science Wash. EDC*, 236: 193-198 (1987); Han et al., *Pediatric Res.*, 22: 245-247 (1987). Кроме того, эффективность действия IGF-I на рост почечных тканей не уменьшалась при одновременном введении GH. См. патент США 5126324, выданный 30 июня 1992 г.

В почке мПНК IGF-I вырабатывается автономно, т.е. независимо, а также в результате связывания GH с рецепторами в прямых канальцах, что увеличивает содержание мПНК IGF-I. Выработанный IGF-I затем поступает во внеклеточное пространство и взаимодействует с IGF-I-рецепторами в проксимальном канальце по типу паракринного эффекта. Было обнаружено, что GH стимулирует экспрессию гена IGF-I в выделенном прямом почечном канальце крысы. см. Rogers et al., *Am. J. Physiol.*, 259: F474-F479 (1990). Почечные ткани очень чувствительны к IGF-I вследствие высоких концентраций IGF-I-рецепторов на оболочке почечных клеток. См. Hammerman, *Am. J. Physiol.*, 257: F503-F514 (1989); Rogers и Hammerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6363-6366 (1989); Hammerman и Gavin, *Am. J. Physiol.*, 251: E32-E41 (1986), Pillion et al., *Am. J. Physiol.*, 255: E504-E512 (1988); Hammerman и Rogers, *Am. J. Physiol.*, 253: F841-F847 (1987). IGF-I-рецепторы локализуются также в гладкой мускулатуре артерий, эндотелии сосудов и базолатеральной мембране. см. Conti et al., *Am. J. Physiol.*, 255: F1214-F1219 (1988); Arnqvist et al., *Am. J. Physiol.*, 254: C411-C414 (1988).

Повышенную циркуляцию GH связывают с увеличением почечного и клубочкового кровотока. В действительности, показатели почечной гемодинамики возрастают через несколько часов после однократной инъекции GH, примерно за такое же время, за которое увеличивается концентрация IGF-I в сыворотке. Эти открытия подтверждают, что IGF-I может увеличивать почечный кровоток и скорость клубочковой фильтрации. Фактически было обнаружено, что IGF-I увеличивает клубочковую фильтрацию и почечный кровоток (Guler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2868-2872 [1989]) и стимулирует почечный перенос фосфата и 1,25-дигидроксивитамина D₃ плазмы. См. Caverzacio et al., *Endocrinol.*, 127: 453-459 (1990). Кроме того, было обнаружено, что кратковременная инфузия одного IGF-I крысам, голодавшим в течение 60-72 часов, увеличивает скорость клубочковой фильтрации (Hirschberg и Koppel, *J. Clin. Invest.*, 83: 326-330 [1989]; см. также Hirschberg et al., *J. Clin. Invest.*, 87:1200-1206 [1991] и что введение IGF-I людям увеличивает скорость клубочковой фильтрации и почечный кровоток. См. Guler et al., *Ada Endocrinol.*, 121:101-106 (1989), Froesch et al., *Trends in Endocrinology and Metabolism*, стр. 254-256, т. 1, 5-е изд.

(Elsevier Science Pub. Co., 1990). См. также патент США 5106832, выданный 21 апреля 1992 г.

Кроме того, было обнаружено, что EGF ускоряет восстановление деятельности почек, нарушенной в результате постишемической острой почечной недостаточности (Humes et al., *J. Clin. Invest.*, 84:1757-1761 [1989]; Norman et al., *Clin. Sci.*, 78: 445-450 [1990]) и в результате поражения нефротоксином - хлоридом ртути. См. Coimbra Am. *J. Physiol.*, 259: F438 (1990). Кроме того, в литературе сообщалось, что другой фактор роста, трансформирующий фактор- α роста (TGF- α), также ускоряет заживление почек и их восстановление после ишемического повреждения. см. Reiss et al., *Kidney Internat.*, 37: 492 (1990).

Поскольку было обнаружено, что введение GH увеличивает скорость клубочковой фильтрации и почечный кровоток (Haffner et al., *Clin. Nephrol.*, 32: 266-269 [1989]) Hirschberg et al., *Kidney Int.*, 35: 865-870 [1989]), было высказано предположение, что этот гормон можно применять в качестве фармакологического агента для активации деятельности почек в случае хронической почечной недостаточности. См. Gershberg, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20:1107-1119 (1960); White et al., *Am. J. Physiol.*, 157: 47-51 (1949). Однако в противоположность тому, что было обнаружено для нормальной почечной функции, введение GH взрослым людям (Beck et al., *Metabolism*, 13: 1108-1134 [1985]; Haffner, см. выше) или детям (Koch et al., *J. Pediatr.*, 115: 365-371 [1989]) с хронической почечной недостаточностью не увеличивает скорость клубочковой фильтрации. Эти исследования проводились на пациентах, страдающих хронической почечной недостаточностью различной степени тяжести и различной этиологии.

Решающая роль IGF-I в процессе роста или заживления почек является еще более спорной. Есть данные, которые свидетельствуют о том, что содержание протеина IGF-I увеличивается в почках, гипертрофированных в результате лечения GH, (D'Ercole et al., см. выше) или при гипертрофии оставшейся почки после односторонней нефрэктомии (Stiles et al., см. выше) или после ишемического поражения почки (Andersson and Jennische, см. выше). Кроме того, с 1991 года роль IGF-I при компенсаторной гипертрофии почки описывалась как спорная. См. Mulroneу и Haramati, 73rd Annual Meeting, The Endocrine Society, 19-22 июня 1991, стр. 141 книги Programs and Abstracts book, реферат 444. Однако поскольку IGF-I выполняет много функций в деятельности почек, увеличение содержания IGF-I в тканях в этих условиях не обязательно указывает на то, что он ответственен за рост почек.

Существует большая разница в локализации мРНК IGF-I и мРНК IGF-I- рецептора. IGF-I обнаружен в основном в прямых почечных канальцах "ниже по течению" от основной массы IGF-I-рецепторов почек, которые в основном обнаружены в проксимальных почечных канальцах и отсутствуют в прямых канальцах. См. Lajara et al., *Am. J. Physiol.*, 257: F252-F261 (1989). Это различное распределение рецепторов и лиганда необычно тем, что IGF-I- рецепторы обнаружены в корковом веществе почки, тогда как IGF-I обнаружен в мозговом веще-

стве почки. Возможно, местный почечный протеин IGF-I малоактивен в почке и что IGF-I-рецепторы в канальцах в основном чувствительны к эндокринному IGF-I из общего кровотока. Фундаментальное значение изменений в почечном IGF-I (концентрация мРНК или пептидов), вызванных, например, поражением почки, таким образом, остается под вопросом. См. также Miller и Hammerman, *Am. J. Physiol.*, F747-F751 (1990) и Martin et al., *Proc. 2nd Int. IGF Symposium*, стр. 142 (1991).

Осложнение в виде острой почечной недостаточности (ОПН) наблюдается у 5% всех госпитализированных больных и у 20% больных, находящихся в интенсивной терапии. В 1% случаев госпитализации наблюдается тяжелый случай почечной недостаточности, который в 6 раз увеличивает вероятность летального исхода. ОПН обычно возникает из-за пониженного почечного кровотока, вызванного разрушением проксимальных канальцев или нефротоксинами, приводящими к некрозу клеток. За этим следует задержка соединений азота, жидкостей и электролитов и состояние ускоренного катаболизма (разложения). Если ОПН протекает в тяжелой форме и в течение длительного времени, то при отсутствии лечения гемодиализом наступает смерть. Стандартная терапия включает раннюю диагностику и поддерживающее лечение, включая водный баланс, электролитный гомеостаз, лечение осложнений, диализ любых участвующих нефротоксинов и тщательное наблюдение. Во время этой последней фазы, которая может длиться в течение ряда недель, пациент подвергается очень большому риску. Необходим прием лекарств, которые предотвращают возникновение ОПН или по крайней мере ослабляют ее действие.

Следовательно, задачей настоящего изобретения является создание лекарства, которое применимо для предотвращения или ослабления ОПН у млекопитающих, которые подвержены риску возникновения ОПН.

В частности, задачей изобретения является предотвращение или ослабление, в более общем виде, острого некроза канальцев, ведущего к олигурии и гипертермии, обусловленной азотемией, что типично для ишемического поражения почек. Для выздоровления при подобном заболевании средней тяжести обычно необходим диализ в стационарных условиях, который занимает 4 - 6 недель и связан со значительной смертностью.

Еще одной задачей изобретения является устранение или снижение необходимости в диализе у больных ОПН.

Далее, еще одной задачей изобретения является предотвращение или уменьшение вероятности возникновения неолигурической почечной недостаточности.

Эти задачи очевидны для специалиста в данной области техники.

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен способ профилактики ОПН у млекопитающих с повышенным риском возникновения ОПН, включающий введение млекопитающему эффективного количества инсулиноподобного

фактора роста IGF-I до момента или в момент, когда предполагается возникновение или возникает ОПН.

Если IGF-I принимают до поражения почек или в то время, когда предполагается такое поражение почек, обусловленное ишемией или нефротоксинами, то по меньшей мере может быть уменьшена интенсивность симптомов ОПН либо ее возникновение может быть предотвращено.

На фиг. 1 показан график изменения в течение семи дней содержания азота мочевины крови у контрольной группы кроликов при почечной ишемии и восстановленной перфузии (квадраты) и у кроликов, которым вводили IGF-I, (ромбы).

На фиг. 2 показан график изменения в течение семи дней содержания креатинина в сыворотке крови у контрольной группы кроликов при почечной ишемии и восстановленной перфузии (прямоугольники) и у кроликов, которым вводили IGF-I, (ромбы).

На фиг. 3 показан график ежедневного изменения веса кроликов в течение семидневного периода, которым вводили des-IGF-I, и кроликов контрольной группы, подвергнутых окклюзии, при этом сплошные квадраты относятся к группе нормальных кроликов, незакрашенные квадраты относятся к группе подвергнутых окклюзии плюс обработанных des-IGF-I кроликов, сплошные ромбы относятся к контрольной группе подвергнутых окклюзии кроликов и незакрашенные ромбы относятся к группе перенесших лапаротомию и необработанных кроликов. Des-IGF-I является аналогом IGF-I.

На фиг. 4 показана диаграмма веса органов кроликов, которым вводили IGF-I, и подвергнутых окклюзии кроликов контрольной группы, при этом измеряли вес почек (сплошной прямоугольник), селезенки (заштрихованный диагональными линиями прямоугольник) и сердца (заштрихованный разнонаправленными диагональными линиями прямоугольник). Значение p , полученное с помощью дисперсионного анализа, является значимым для почек (0,0004) (контроль [кт.] $N=7$, des $N=9$) и для селезенки (0,028) (кт. $N=7$, des $N=8$), но статистически незначимым для сердца (0,84) (кт. $N=6$, des $N=4$).

На фиг. 5 показан график изменения содержания креатинина в сыворотке крови в течение 7 дней у группы подвергнутых окклюзии кроликов, которым вводили des-IGF-I, (незакрашенные квадраты) и у контрольной группы подвергнутых окклюзии кроликов (сплошные ромбы).

На фиг. 6 показан график изменения содержания азота мочевины в сыворотке в течение 7 дней у группы подвергнутых окклюзии кроликов, которым вводили des-IGF-I, (незакрашенные квадраты) и у контрольной группы подвергнутых окклюзии кроликов (сплошные ромбы).

На фиг. 7 показана диаграмма веса органов кроликов, которым вводили IGF-I, и контрольной группы кроликов, при этом сплошной прямоугольник относится к почкам, заштрихованный точками прямоугольник относится к сердцу, заштрихованный горизонтальными линиями прямоугольник относится к тимусу и закрашенный разнонаправленными диагональными линиями прямоугольник относится к селезенке.

На фиг. 8 показан график изменения содержания креатинина в сыворотке крови в течение 6 дней у группы подвергнутых окклюзии кроликов, которым вводили IGF-I, (сплошные квадраты) и у контрольной группы подвергнутых окклюзии кроликов (незакрашенные кружки).

На фиг. 9 показан график изменения содержания азота мочевины в сыворотке в течение 6 дней у группы подвергнутых окклюзии кроликов, которым вводили IGF-I, (сплошные квадраты) и у контрольной группы подвергнутых окклюзии кроликов (незакрашенные кружки).

На фиг. 10 изображен график изменения поглощения ^3H -п-аминогиппурата (^3H -ПАГ) в течение 90 мин кортикальными тканями почек. Незакрашенными прямоугольниками и сплошной линией обозначена группа нормальных животных, незакрашенными кружочками и пунктирной линией обозначена группа подвергнутых окклюзии плюс обработанных des-IGF-I животных, незакрашенными треугольниками и пунктирной линией обозначена группа подвергнутых окклюзии плюс обработанных IGF-I животных и наполовину закрашенными квадратами обозначена контрольная группа подвергнутых окклюзии животных.

На фиг. 11 показано поглощение ^{14}C -ТЭА кортикальными тканями почек в течение 90 мин. Незакрашенными прямоугольниками и сплошной линией обозначена группа нормальных животных, незакрашенными кружочками и пунктирной линией обозначена группа подвергнутых окклюзии плюс обработанных des-IGF-I животных, незакрашенными треугольниками и пунктирной линией обозначена группа подвергнутых окклюзии плюс обработанных IGF-I животных и наполовину закрашенными квадратами обозначена контрольная группа подвергнутых окклюзии животных.

На фиг. 12 показан график изменения веса почек в зависимости от дозы des-IGF-I (закрашенный квадрат) и IGF-I (незакрашенный квадрат) у крыс с гипофизэктомией. Крысам в течение 7 дней посредством подкожной инфузии с помощью мини-насоса вводили по 6 доз IGF-I или des-IGF-I, затем умерщвляли и определяли сырой вес обеих почек.

На фиг. 13 показан график увеличения веса крыс в течение 7 дней, которым вводили эксципиент (кружки) и des-IGF-I (квадраты).

На фиг. 14 показан график изменения содержания азота мочевины крови (АМК) у крыс в течение 7 дней, которым вводили эксципиент (кружки) или des-IGF-I (квадраты).

На фиг. 15 показан график изменения содержания креатинина в крови крыс в течение 7 дней, которым вводили эксципиент (кружки) или des-IGF-I (квадраты).

На фиг. 16 показан график изменения веса крыс в течение 4 дней у контрольной группы (незакрашенные кружки), через 30 мин после пережатия (сплошные кружки) и через 60 минут после пережатия (квадраты).

На фиг. 17 показан график изменения содержания азота мочевины крови 20 крыс в течение 4 дней у контрольной группы (кружки), через 30 минут

после пережатия (сплошные кружки) и через 60 минут после пережатия (квадраты).

На фиг. 18 показан график изменения содержания азота креатинина в крови крыс в течение 4 дней у контрольной группы (кружки), через 30 минут после пережатия (сплошные кружки) и через 60 минут после пережатия (квадраты).

На фиг. 19 показан график изменения веса крыс с пораженными почками (60 минут пережатия) в течение 7 дней, которых обрабатывали следующим образом: симуляция (незакрашенные кружки), эксципиент (незакрашенные квадраты), эксципиент + IGF-I (сплошные квадраты) и эксципиент + des-IGF-I (сплошные кружки).

На фиг. 20 показан график изменения содержания азота мочевины в крови крыс с пораженными почками (60 минут пережатия) в течение 7 дней, которых обрабатывали следующим образом: симуляция (незакрашенные кружки), эксципиент (незакрашенные квадраты), эксципиент + IGF-I (сплошные квадраты) и эксципиент + des-IGF-I (сплошные кружки).

На фиг. 21 показан график изменения содержания креатинина в крови крыс с пораженными почками (60 минут пережатия) в течение 7 дней, которых обрабатывали следующим образом: симуляция (незакрашенные кружки), эксципиент (незакрашенные квадраты), эксципиент + IGF-I (сплошные квадраты) и эксципиент + des-IGF-I (сплошные кружки).

Используемое в настоящем описании понятие "острая почечная недостаточность" или "ОПН" означает состояние, вызванное пониженным почечным кровотоком (ишемическое поражение почек) вследствие разрушения проксимального канальца почки или из-за нефротоксиков, приводящих к некрозу клеток. Это понятие охватывает различные формы ОПН от средней до тяжелой, включая острый некроз канальца, приводящий к олигурии и гипертермии, обусловленной азотемией, и неолитической почечной недостаточности. Оно характеризуется такими симптомами, как задержка соединений азота, жидкостей и электролитов и состояние ускоренного катаболизма. Если ОПН протекает в тяжелой форме, то в случае отсутствия лечения гемодиализом наступает смерть.

ОПН вызывает поражение почек, которое характеризуется острым отеком канальца, некрозом или интерстициальным либо тубулярным отеком после их ишемического поражения. Почечная ишемия может быть вызвана различными причинами, включая пониженное кровяное давление, прежде всего продолжительную гипотензию, хирургическую операцию на сердце и установку аппарата искусственного кровообращения или трансплантацию почки. Кроме того, ее может вызвать, например, физическая травма или повреждение почек. Таким образом, IGF-I может применяться для поддержания целостности почки до или во время трансплантации почки.

Примеры нефротоксинов, приводящих к некрозу клеток, включают циклоспорин, отравление тяжелыми металлами, введение внутривенно контрастной жидкости, антибиотики, такие, как аминогликозиды, например, тобрамицин, гентамицин,

амикацин и стрептомицин, и антифунгициды, такие, как амфотерицин.

"Профилактика" ОПН означает предотвращение или по меньшей мере уменьшение интенсивности симптомов ОПН.

Млекопитающие "с повышенным риском" возникновения ОПН означают тех млекопитающих, включая млекопитающих, имеющих хозяйственное значение, таких, как коровы, овцы, свиньи, а также людей, причем предпочтительно последних, которые предрасположены к возникновению ОПН в результате операций либо трансплантации или в результате запущенных болезней.

Используемое в настоящем описании понятие "IGF-I" относится к инсулиноподобному фактору роста, выделенному из любых видов, включая быков, овец, свиней, лошадей, птиц и предпочтительно человека, с естественной последовательностью или в вариантной форме и из любого источника, в том числе к естественному, синтетическому или рекомбинантному. В предпочтительном варианте для животного применяют форму IGF-I, полученную из тех видов, которые подлежат лечению, так, например, IGF-I, выделенный из свиней, применяют для лечения свиней, овечьий IGF-I - для лечения овец, бычий IGF-I - для лечения крупного рогатого скота и т.д. Для лечения человека предпочтительно используют человеческий с естественной последовательностью зрелый IGF-I, более предпочтительно без метионина на его N-конце, полученный, например, с помощью способа, описанного в EP 230869, опубликованном 5 августа 1987 г.; EP 128733, опубликованном 19 декабря 1984 г.; или EP 288451, опубликованном 26 октября 1986 г. Более предпочтительно этот IGF-I с естественной последовательностью получают рекомбинантным путем, и для клинических исследований его поставляет фирма Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния. Также для применения предпочтительны IGF-I, имеющий удельную активность выше приблизительно 14000 единиц/мг, что определяют с помощью радиорецепторного анализа с использованием плацентарных мембран, таких, как поставляемые фирмой KabiGen AB, Стокгольм, Швеция.

Наиболее предпочтительными вариантами IGF-I являются таковые, описанные в патенте США 5077276, выданном 31 декабря 1991 г., в заявке PCT WO 87/01038, опубликованной 26 февраля 1987 г., и в PCT WO 89/05822, опубликованной 29 июня 1989 г., т.е. такие, в которых по крайней мере в положении 3 от N-конца зрелой молекулы отсутствует остаток глутаминовой кислоты, или с деленной до пяти аминокислот на N-конце. В наиболее предпочтительном варианте отсутствуют первые три от N-конца аминокислоты (названные в настоящем описании с целью различия как мозговой IGF, tIGF-I, des(l-3)-IGF-I или des-IGF-I).

Профилактику заболевания проводят путем введения IGF-I до момента или в момент, когда предполагается возникновение или возникает поражение почек (ОПН).

Например, применение IGF-I для предотвращения поражения почек или для уменьшения интенсивности симптомов заболевания либо для предот-

вращения отторжения трансплантированной почки начинают до момента или в момент, когда предполагается возникновение или возникает ОПН, т.е. до или во время рекомендуемой грудной операции или операции на сердце, до или во время применения нефротоксина, до или во время трансплантации почки.

Если лечение было начато до того, как ожидается поражение почек, или когда оно уже произошло, то такое лечение должно проводиться в течение промежутка времени, составляющего от примерно 48 часов до примерно 0,5 часов, до ожидаемого начала поражения или когда оно уже наступило. Введение IGF-I необязательно можно продолжать соответственно после того, как ожидалось возникновение ОПН или когда это заболевание уже наступило. Клинические симптомы поражения почек, которые обычно возникают не сразу во время поражения, но могут проявляться через 24 часа или более, включают увеличение содержания азота мочевины либо креатинина в крови или уменьшение переноса органического иона.

Для различных целей настоящего изобретения IGF-I непосредственно вводят млекопитающему любым приемлемым способом, в том числе парентерально, и его можно вводить локально или системно. Конкретный путь введения зависит, например, от анамнеза болезни пациента, включающего любые известные или предполагаемые побочные эффекты при применении IGF-I. Примеры парентерального введения включают подкожное, внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное и внутрибрюшинное введение.

Предпочтительно осуществлять введение путем непрерывной инфузии (с применением, например, мини-насосов, такие, как осмотический насос и подкожное введение) или путем однократной инъекции или многократных (например 2-4) инъекций с применением, например, внутривенного или подкожного способов введения перед или во время начала приступа, который возможно приведет к поражению почки. Предпочтительно подкожное введение IGF-I. Применение можно осуществлять также путем однократного внутривенного введения большого объема или в виде депо с замедленным высвобождением.

Кроме того, IGF-I вводят соответственно вместе с одним любым или несколькими из связывающих его протеинов, например, с известными в настоящее время, т.е. IGFBP-1, IGPBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 или IGPBP-6. Для введения IGF-I также может быть соответственно связан с рецептором или антителом или фрагментом антитела. Предпочтительным связывающим протеином для IGF-I в настоящем изобретении является IGFBP-3, который описан в Международной заявке WO 89/09268, опубликованной 5 октября 1989 г., и у Martin и Baxter, J. Biol. Chem., 261: 8754-8760 (1986). Этот 25 гликозилированный протеин IGPBP-3, как было установлено с помощью нередуцированного электрофореза в ПААГ-ДСН, является кислотоустойчивым компонентом с молекулярной массой приблизительно 53 кДа гликопротеинового комплекса с молекулярной массой 125-150 кДа, обнаруженного в

плазме человека и несущего большую часть эндогенных IGF, и также регулируется GH.

Введение IGF-связывающего протеина вместе с IGF-I соответственно может быть осуществлено с помощью способа, описанного в Международной заявке WO92/13556, опубликованной 20 августа 1992 г. Вкратце IGF-I и IGFBP вводят в эффективных количествах с помощью быстрой подкожной инъекции большого объема в молярном соотношении от приблизительно 0,5:1 до приблизительно 3:1, предпочтительно приблизительно 1:1. Для применения в терапии IGF-I должен быть приготовлен в виде композиции и дозирован в форме, согласующейся с проверенной медицинской практикой, с учетом клинического состояния конкретного пациента (прежде всего побочных эффектов лечения с применением только IGF-I), мест введения композиции IGF-I, способа введения, графика введения и других факторов, известных практикующим врачам. "Эффективное количество" IGF-I по настоящему изобретению, таким образом, определяются с учетом этих обстоятельств.

В качестве общей рекомендации можно предложить, чтобы вводимое парентерально суммарное фармацевтически эффективное количество IGF-I на дозу составляло от приблизительно 1 мкг/кг веса тела пациента/день до 10 мг/кг веса тела пациента/день, хотя, как отмечалось выше, это должно определяться терапевтической целесообразностью. Более предпочтительно эта доза составляет по крайней мере 0,01 мг/кг/день и для людей более предпочтительно для гормона она составляет приблизительно 0,01-1 мг/кг/день. В случае непрерывного введения IGF-I обычно применяют со скоростью дозирования приблизительно от 1 мкг/кг/час до приблизительно 50 мкг/кг/час, либо с помощью 1-4 инъекций в день, либо с помощью непрерывных подкожных инфузий с использованием, например, мини-насоса. Можно также применять внутривенный баллон с раствором. Ключевым фактором при выборе приемлемой дозы является результат, определяемый регенерацией эпителия проксимального канальца, предотвращением ускоренного катаболизма, предотвращением избытка накопления соединений азота, жидкостей и электролитов и т.д.

IGF-I также целесообразно вводить с помощью систем с непрерывным высвобождением. Примерами композиций с непрерывным высвобождением, приемлемыми для данного случая, являются полупроницаемые полимерные матрицы в виде изделий определенной формы, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с непрерывным высвобождением включают полилактиды (патент США 37739191 EP 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman и др., Biopolymers, 22: 547-556 [1983]), поли(2-гидроксипропилметакрилата) (Langer и др., J. Biomed. Mater. Res., 15:167- 277 [1981], и Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 [1982]), этиленвинилацетата (Langer и др., см. выше) или поли-D-(-)-3-гидроксимасляной кислоты (EP133988). Композиции с непрерывным высвобождением IGF-I также включают захваченный липосомой IGF-I. Липосомы, содержащие IGF-I, получают известными спо-

собами: DE 3218121; Epstein и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 134949; EP 142641; заявка на патент Японии 83-118008; патенты США 4485045 и 4544545 и EP 102324. Обычно липосомы являются малыми (примерно 200-800Е) однослойными образованиями, в которых содержание липидов выше, чем приблизительно 30 мол. процентов холестерина, причем выбранные пропорции можно соответствующим образом откорректировать для оптимальной терапии с IGF-I.

Согласно одному из примеров выполнения изобретения для парентерального введения обычно готовят композицию IGF-I путем смешения каждого компонента необходимой степени чистоты в виде стандартной дозируемой пригодной для инъекции формы (раствора, суспензии или эмульсии) с фармацевтически приемлемым носителем, т.е. с нетоксичным для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и совместимым с другими ингредиентами композиции. Например, предпочтительно композиция не должна включать окислители и другие соединения, известные своей способностью разрушать полипептиды.

Обычно композиции получают путем смешения IGF-I до однородности с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или с ними обоими. Затем при необходимости продукт формируют в виде требуемой композиции. Предпочтительно носитель представляет собой парентеральный носитель, более предпочтительно раствор, изотоничный с кровью реципиента. Примеры таких носителей-наполнителей включают воду, физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Также применимы по изобретению неводные наполнители, такие, как нелетучие масла и этилолеаты, а также липосомы.

Носитель может содержать небольшие количества добавок, таких, как вещества, повышающие изотоничность и химическую стабильность. Такие материалы нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие, как фосфатный. Нитратный, сукцинатный, на основе уксусной кислоты и других органических кислот или их солей, антиокислители, такие, как аскорбиновая кислота; полипептиды с низкой молекулярной массой (менее, чем приблизительно десять остатков), например, полиаргинины или трипептиды протеины, такие, как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие, как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие, как глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота или аргинин; моносахариды, дисахариды и другие углеводороды, в том числе целлюлозу и ее производные, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие, как ЭДТК; сахарные спирты, такие, как маннит или сорбит; противоионы, такие, как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие, как полисорбаты, полочсамеры или ПЭГ.

Обычно IGF-I включают в композицию с такими носителями в концентрации приблизительно от 0,1 мг/мл до 100 мг/мл, предпочтительно 1-10 мг/мл

при значениях pH приблизительно от 3 до 8. Полномасштабный IGF-I обычно стабилен при значениях pH не выше приблизительно 6,0; des(l-3)-IGF-I стабилен при значениях pH приблизительно от 3,2 до 5. Очевидно, что применение определенных вышеупомянутых эксципиентов, носителей или стабилизаторов будет приводить к образованию солей IGF-I.

Кроме того, IGF-I, предпочтительно полномасштабный IGF-I, может быть включен в композицию вместе с приемлемым носителем-наполнителем для образования фармацевтической композиции, которая в предпочтительном варианте не содержит клеток. В одном из примеров выполнения изобретения выбор буфера, применяемого для композиции, будет зависеть от того, будет ли композиция использована сразу после смешения либо будет храниться для последующего применения. При использовании сразу после смешения полномасштабный IGF-I может быть включен в композицию с маннитом, глицерином и фосфатным буфером с pH 7,4. Если эта смесь подлежит хранению, ее включают в композицию с буфером, pH которого приблизительно равен 6.

ГН также соответственно вводят вместе с одним или более связывающих его протеинов. Одним из детально охарактеризованных таких связывающих протеинов является связывающий гормон роста протеин (GHBP) с высоким сродством к ГН, образующему внеклеточный домен ГН-рецептора, который циркулирует в крови и функционирует в качестве GHBP у некоторых видов (Ymer и Herington, Mol. Cell. Endocrinol., 41:153 [1985]; Smith и Talamantes, Endocrinology, 123: 1489-1494 [1988], Emtner и Roos, Acta Endocrinologica (Copenh.), 122: 296-302 [1990]), включая человека. См., например, Baumann и др., J. Clin. Endocrinol. Metab. 62: 134-141 (1986); EP 366710, опубликованный 9 мая 1990 г.; Herington и др., J. Clin. Invest., 77: 1817-1823 (1986); Leung и др., Nature, 330: 537-543 (1987). Также был описан второй связывающий протеин (BP - binding protein) с низким сродством к ГН, который очевидно не является структурно связанным с ГН-рецептором. См., например, Baumann и Shaw, J. Clin. Endocrinol. Metab. 70: 680-686 (1990).

Дозы ГН и IGF-I при совместном введении могут быть меньше, чем в тех случаях, когда IGF-I вводят индивидуально. Необходимо отметить, что практикующие врачи, которые назначают IGF-I и ГН, должны принимать во внимание побочные эффекты, возникающие при приеме этих гормонов. Для hGH побочные эффекты включают задержку натрия и увеличение внеклеточного объема (Ikko et al., Acta Endocrinol. (Copenhagen), 32: 341-361 [1959]; Biglieri et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 21: 361-370 [1961]), а также гиперинсулинемию и гипергликемию. Главным побочным эффектом IGF-I является гипергликемия. См. Guler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), выше. В действительности, комбинация IGF-I и ГН может привести к уменьшению нежелательных побочных эффектов обоих агентов (например, гипергликемии для IGF-I и повышение концентрации инсулина для ГН) и к восстановлению выделения ГН, которое подавляется под действием IGF-I.

Кроме того, приемлемым является введение IGF-I в комбинации с другими терапевтическими агентами для предотвращения или уменьшения интенсивности симптомов ишемических или нефротоксических повреждений. Веществами, пригодными для этой цели, являются перекись дисмутаза и антагонисты (например, антитела) к VLA-4, LFA-1, Mac-1, p150,95, EGF, TGF- α и т.д. Эти агенты можно вводить одновременно с введением IGF-I, до или после введения IGF-I и тем же путем, которым вводят IGF-I, или иначе.

Ниже изобретение более подробно поясняется на примерах. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕР I

Первый эксперимент по терапии кроликов

Введение

Для наблюдения за прогрессирующей ОПН у животных и их последующей реакцией во времени на введение эксципиента или IGF-I либо des-IGF-I измеряют содержание азота мочевины в крови (АМК) или креатинина в сыворотке крови. Содержание креатинина, продукта метаболизма мышечной активности, остается относительно постоянным в плазме при условии, что измерения не проводят после максимальных нагрузок. Измерение азота в моче менее достоверно, так как на него влияет метаболическое состояние, диета, гидратация и другие факторы. Однако, клиренс азота мочевины, равно как и креатинина заметно уменьшаются во время почечной недостаточности и острого поражения почек независимо от метаболического и физиологического состояния. Эти две составляющих принимаются за показатели почечной функции, и их содержание в крови отражает содержание других соединений, которое увеличивается при нефропатии. Креатинин фильтруется почкой, но не секретируется и не реабсорбируется; азот мочевины фильтруется и реабсорбируется пассивно. Вместе они являются мерой функции почек и ключевыми лабораторными параметрами при наблюдении почечной недостаточности.

Протокол

Во всех экспериментах с IGF-I, подробно описанных в примерах, применяют рекомбинантный IGF-I человека [поставляется фирмой KabiGen AB, Стокгольм, Швеция (удельная активность >14000 ед./мг, что определено посредством радиорецепторного анализа с использованием мембран из плаценты) или поставляется для клинических испытаний фирмой Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско]. Для данного примера IGF-I растворяют в концентрации 5 мг/мл в 10 мМ растворе Нитратного буфера и 126 мМ NaCl при pH 6,0.

Во всех экспериментах используют самцов новозеландского белого кролика весом 2,5-3 кг. После предварительной внутривенной анестезии с помощью 0,1 мл Нурпорм™ (раствор Fluanisone™ 1,0 мг/мл) из ушной артерии берут 1 мл образца крови. Кровь сразу же помещают в пробирки для отделения сыворотки Vacutainer™. Затем животное окончательно анестезируют с помощью 0,68 мл/кг Нурпорм™, внутримышечно. Животное закрепляют

на столе и готовят к стерильной хирургической операции, зажимая скобами мех на животе, намазывая йодом место надреза, обезжиривая спиртом и повторно намазывая йодом. В стерильных условиях проводят лапаротомию. Чтобы открыть левую почку, раздвигают кишки с помощью марли, пропитанной физиологическим раствором. Рассекают левую почечную артерию и зажимают скобой Serrfin™ (Baby Dieffenbach Serrefin; Harvard Apparatus; Кат. №52-3241 или 52-3258). Затем процедуру повторяют с правой почечной артерией. После перекрытия (окклюзии) обеих почечных артерий на обеих сторонах полости желудка помещают два осмотических насоса Alzet™ (фирма Alza Corporation, Пало Альто, Калифорния, модель 2ML-1 объемом 2144 мкл), содержащих 5 мг/мл рекомбинантного IGF-I человека. Эти насосы заполняют таким образом, что они начинают действовать сразу же после установки. Производительность каждого насоса составляет 11,75 мкл/ч. Таким образом каждое животное получает 2,82 мг/день/животное или примерно 1 мг/кг/день. Повреждение (рану) в результате лапаротомии накрывают марлей, пропитанной физиологическим раствором, и стерильными салфетками. В течение двухчасового периода ишемии анестезию поддерживают дополнительным внутривенным введением Нурпорм™ (0,2-0,5 мл).

Через два часа ишемии зажимы удаляют. Лапаротомию закрывают, применяя шов 4,0 Prolene™ для мышц живота и 2,0 Prolene™ для кожи. Затем животным давали восстановиться после операции в обогреваемом водой инкубаторе для интенсивной терапии до тех пор, пока не восстановится положение грудины. Затем животных помещают индивидуально в отдельные клетки, и они имеют свободный доступ к стандартной лабораторной пище и воде.

Операция проведена всего на 12 животных за два дня: шести животным (2 контрольным и 4 подопытным) в один день и 6 животным (3 контрольным и 3 подопытным) через 11 дней.

Образцы крови

Образцы крови по 1 мл берут из ушной артерии или вены через 24 часа, а затем каждые 24 часа в течение 6 дней. Образцы коагулируют в пробирках для отделения сыворотки и центрифугируют при 10°C для отделения сыворотки. Сыворотку отделяют, помещают в пробирки Эпиндорфа и хранят при -20°C до анализа. Этот период составляет обычно 24-36 часов (редко более 48 часов). Образцы оттаивают и проводят определение содержания АМК, креатинина в сыворотке и глюкозы в крови на центрифужном анализаторе Monarch, модель 76.

Статистический анализ

Статистические различия между группами определяют, используя двухфакторный дисперсионный анализ (анализ ANOVA (от англ. Analysis of variance)) для повторяющихся измерений с последующей проверкой с помощью наименьшей значимой разности (НЗР) для определения значимых различий между отдельными временными точками.

Результаты

Все пять контрольных животных живы в течение семи дней; из семи подопытных животных один умер на 4 день (3 дня после операции). Разумеется, это животное исключено из исследования.

АМК

У контрольных животных содержание АМК до операции составляет $16 \pm 0,89$ 25 мг/дл; оно увеличивается до максимума 109 ± 25 мг/дл (в 5,81 раза) на 4 день. См. Таблицу 1.

Таблица 1

Значение АМК у контрольных животных, которым вводили физиологический раствор

День №	Среднее значение	Стандартное отклонение	СКО
1	16,00	2,00	0,89
2	81,80	15,97	7,14
3	106,80	35,60	15,92
4	109,00	56,03	25,06
5	97,60	64,43	28,82
6	86,00	71,83	32,12
7	79,20	72,12	32,25

СКО = среднеквадратичная ошибка

У выбранных случайным образом животных, которым вводили IGF-I, содержание АМК до операции близко к таковому у контрольных животных. Максимальное увеличение содержания АМК у этих животных несколько меньше ($73 \pm 15,6$ мг/дл) на 3 день (таблица 2 и фиг. 1). Кроме того, значения АМК у этих животных упали почти до контрольных значений на 7 день. См. таблицу 2.

Таблица 2

Значение АМК у животных, которым вводили IGF-I

День №	Среднее значение	Стандартное отклонение	СКО
1	15,17	2,32	0,95
2	62,17	13,47	5,50
3	73,00	36,90	15,06
4	70,83	46,08	18,81
5	50,33	36,72	14,99
6	30,00	19,18	7,83
7	21,00	9,72	3,97

Содержание азота мочевины в крови подопытных животных значительно ниже на 6 день и 7 день. См. фиг. 1.

Креатинин в сыворотке крови

Не наблюдают значительного различия в содержании креатинина в сыворотке контрольных и подопытных животных (таблицы 3 и 4, фиг. 2), хотя значения на 5, 6 и 7 дни у подопытных животных составляют половину значения для контрольных животных.

Таблица 3

Содержание креатинина в сыворотке крови у контрольных животных, которым вводили физиологический раствор

День №	Среднее значение	Стандартное отклонение	СКО
1	1,06	0,48	0,22
2	5,16	1,46	0,65
3	5,86	2,34	1,09
4	4,92	2,58	1,15
5	3,96	2,25	1,01
6	2,84	1,51	0,86
7	2,32	0,87	0,39

Таблица 4

Содержание креатинина в сыворотке крови у животных, которым вводили IGF-I

День №	Среднее значение	Стандартное отклонение	СКО
1	1,03	0,14	0,06
2	4,58	1,60	0,65
3	5,02	2,94	1,20
4	3,75	2,17	0,89
5	2,45	1,31	0,54
6	1,65	0,72	0,29
7	1,27	0,42	0,17

Глюкоза в крови

Содержание глюкозы в крови в обеих группах падает примерно на 60 мг/дл в первый день после операции и держится примерно на уровне 130-160 мг/дл для обеих групп в оставшееся время эксперимента. Между обеими группами не наблюдается статистическое различие (таблицы 5 и 6).

Таблица 5

Содержание глюкозы в крови контрольных животных

День №	Среднее значение	Стандартное отклонение	СКО
1	182,40	22,23	9,94
2	119,60	13,24	5,92
3	142,60	21,20	9,48
4	155,80	22,61	10,11
5	148,20	34,22	15,30
6	156,60	32,30	14,45
7	165,40	32,75	14,64

Таблица 6

Содержание глюкозы в крови животных, которым вводили IGF-I

День №	Среднее значение	Стандартное отклонение	СКО
1	181,00	33,39	13,63
2	124,83	20,44	8,34
3	134,00	10,37	4,23
4	140,83	7,91	3,23
5	134,33	12,56	5,13
6	130,50	14,72	6,01
7	146,00	21,89	8,94

Вывод

Введение IGF-I во время индукции ишемии значительно уменьшает содержание АМК и очевидно уменьшает содержание креатинина у кроликов, которые в течение двух часов были подвержены

почечной ишемии с последующим восстановлением перфузии в течение шести дней. Содержание АМК у обработанных животных более быстро и полностью возвращается к дооперационному значению, и оно значительно ниже, чем у контрольных животных, подвергнутых введению физиологического раствора, на 6 день. Это показывает, что IGF-I способен предотвращать или по крайней мере уменьшать интенсивность симптомов поражения почек у млекопитающих с повышенным риском ОПН.

ПРИМЕР II

Второй эксперимент по терапии кроликов

Введение

В этом эксперименте используют большее количество кроликов и измеряют не только концентрацию АМК и креатинина, но и определяют поглощение органических ионов клетками проксимальных канальцев, чтобы изучить *in vitro* деятельность клеток почек. Перенос катионов почечными канальцами был продемонстрирован на примере многих животных, включая кроликов и человека (Besseghir et al., Am. J. Physiol., 241: F308-F314 [1981]; Rennick et al., Am. J. Physiol., 232: F443-F447 [1977]); и он играет существенную роль в выделении эндогенных и синтетических катионов.

Чтобы поступить в полость канальца, молекулы должны пересечь базолатеральную мембрану и мембрану с щеточной каемкой (БЛМ и МЩК соответственно). Прохождение катионов через БЛМ очевидно происходит под влиянием электрического градиента; перенос через МЩК представляет собой взаимный обмен между катионом и протоном. см. Dantzler et al., Am. J. Physiol., 256: F290-F297 (1989); Montrose-Rafizadeh et al., Am. J. Physiol., 257: F243-F251 (1989). Согласно описанной ниже модели *in vitro* концентрированный катион наиболее вероятно входит в БЛМ аналогичным образом, но также возможен обратный перенос через встречные переносчики МЩК, вторичный по отношению к градиенту концентрации. Теоретически допускается, что секреция аниона является комбинацией активного переноса через БЛМ и последующей диффузии через полостную жидкость. См. Tune et al., Am. J. Physiol., 217: 1057-1063 (1969).

В данном исследовании эти переносчики изучаются *in vitro* с помощью ^{14}C -ТЭА (тетраэтиламмоний) и ^3H -ПАГ. ТЭА не разлагается внутри клеток и поэтому служит хорошей мерой поглотительной способности. ПАГ участвует в обмене веществ, но очень медленно. Методика кортикальных шлифов, впервые примененная в 1930 г., широко используется в течение десятилетий. Требуется контролировать несколько переменных: толщину ткани, содержание кислорода в среде, содержание ионов в среде и перемешивание во время инкубационного периода. В этом примере, как описано ниже, учитываются эти переменные.

Веса органов и веса тела в группе, также как и содержание азота мочевины и креатинина в сыворотке регистрируются как среднее для группы $\pm$ СКО (среднеквадратичная ошибка). Данные результатов по кортикальным шлейфам записывают как средние шлиф/среда для конкретного времени и

кролика. Эти соотношения затем объединяют по группам, получая среднее и СКО для каждой группы. Определяют значения p для одно- или двухфакторного анализа ANOVA. Часто переменными для двухфакторного анализа ANOVA являются день опыта и величина конкретного измерения для подопытной группы. В тех случаях, когда используют день, день 0 не включают, так как это контрольное измерение, и при расчетах иногда исключают первый день (так как действие лекарства очевидно проявляется более значительно в последующие дни) и последний день опыта (так как те кролики, которые выживают, в последний день обычно возвращаются к практически нормальному состоянию, а те, которые умирали от почечной недостаточности, более не участвовали в эксперименте).

В этом примере изучают влияние IGF-I и усеченной молекулы des-IGF-I на функцию почки после поражения почки, вызванного почечной ишемией. Ниже показано, что IGF-I, равно как des-IGF-I являются эффективными агентами при регенерации почки после ишемического повреждения.

Протокол

Подготовка модели животного

Самцам белого новозеландского кролика (2-3 кг) дают акклиматизироваться в лабораторных условиях в течение семи дней, а затем их подвергают исследованиям. Их помещают в помещение с контролируемой температурой и освещением и дают орехи и воду *ad libitum* (по желанию).

Экспериментальные группы

Животных произвольно делят на шесть групп: окклюзия почечной артерии плюс IGF-I (ОПН + IGF-I) либо плюс des-IGF-I (ОПН + des-IGF-I) или окклюзия почечной артерии плюс эксципиент (ОПН-контроль); только лапаротомия плюс IGF-I (ЛАП + IGF-I) либо только лапаротомия плюс эксципиент (ЛАП-контроль); также включена группа кроликов, которых не подвергают терапии (нормальная группа). В эксперименте участвуют только те кролики, которые остаются живы на 2 день; их подвергают флеботомии и ежедневно взвешивают. Кроме того, кроликов, выживших на 7 день, умерщвляют, определяют сырой вес органов, почки используют для измерений поглощения ионов кортикальными тканями. В связи со смертью и сложностью хронометрирования из эксперимента по ионному поглощению исключают пять животных, которым вводили IGF-I, и трех животных, которым вводили эксципиент. (См. следующую таблицу по группированию, сокращениям и количеству образцов).

Подопытные группы

		<u>Химический анализ сыворотки* (N=)</u>	<u>Кортикальный шлиф (N=)</u>
I.	Окклюзия почечной артерии + эксципиент (ОПН-контроль)	11	6
II.	Окклюзия почечной артерии + des-IGF-I (ОПН + des-IGF-I)	10	3

III.	Окклюзия почечной артерии + IGF-I (ОПН + IGF-I)	13	10
IV.	Лапаротомия + IGF-I (ЛАП + IGF-I)	3	3
V.	Лапаротомия + эксципиент (ЛАП + контроль)	2	2
VI.	Нормальный необработанный контроль (нормальная группа)	2	4
* Включает кроликов, которые не умерли до или в день 2			
** Включает кроликов, которые живы до дня 7, когда проводится эксперимент с кортикальным шлифом			

Подготовка модели животного

Весы регистрируют до операции и далее ежедневно. Кровь (1 мл) берут из ушной артерии. Группам из шести кроликов делают анестезию, вводят внутримышечно по 1,7 мл Нурпорм™ за 20 минут до операции, а затем еще три раза во время операции, так что общее количество Нурпорм™ составляет 2,3 мл или 0,4 мг/кг/ч.

После анестезии животных бреют, дезинфицируют, обкладывают простынями и открывают полость брюшины с помощью срединного надреза. Применяя тупое отделение, освобождают правую, а затем левую почечные артерии и зажимают их скобой Serrefin™ (Baby Dieffenbach Serrefin; Harvard Apparatus; Кат. № 52-3241 или 52-3258). Одновременно с окклюзией артерий в брюшную полость помещают один осмотический насос Alzet™ (фирма Alza Corporation, Пало Альто, Калифорния, модель 2 ML-I), содержащий 2 мл раствора 3,3 мг des-IGF-I/мл уксусной кислоты (100 мл, pH 4,5) либо 2 осмотических насоса Alzet™, каждый из которых содержит 2,0 мл рекомбинантного IGF-I человека, как описано выше (5,0 мг/мл в буферном растворе хлористый натрий/ацетат натрия, pH 6,0) или его эксципиент. Эти насосы начинают действовать сразу же после установки. Расход каждого насоса составляет 10,58 мкл/ч, за счет чего подопытные животные в целом получают примерно 0,34 мг/день/день des-IGF-I или 1,1 мг/кг/день IGF-I на животное. Таким образом, доза вводимого des-IGF-I составляет одну треть от дозы IGF-I. Контрольным животным устанавливают насосы, заполненные эксципиентом. Затем животных накрывают пропитанной физиологическим раствором марлей и кладут на стол на два часа до восстановления перфузии.

Через два часа зажимы для окклюзии артерии снимают и визуально проверяют восстановление перфузии. Стенки брюшины зашивают швом 0,0 Prolene™, на кожу накладывают шов 2,0 Prolene™, при этом во избежание раздражения узелки оставляют под кожей. Затем животное переносят на грелку с подушечкой (35°C), кладут на живот и выдерживают до прихода в сознание (примерно 4-5 часов), после чего их помещают в поддерживающую камеру, обеспечивая водой и пищей до окончания периода эксперимента.

Сбор данных

В постокклюзионные дни 1-6 из ушной вены берут 1 мл крови, центрифугируют и хранят сыворотку при -80°C. Когда собирают образцы у всей

группа из шести кроликов, то эти образцы оттаивают при комнатной температуре и анализируют на приборе Monarch 2000 Chemical Systems Instrument (фирма Allid Instrument Laboratories, Лексингтон, МА) на креатинин, азот мочевины, глюкозу, натрий, калий, кальций, холестерол, альбумин, щелочную фосфатазу (ALP) и гамма-глутамил-трансферазу (GGT). На день 7 их умерщвляют, правую почку, печень, селезенку, сердце и тимус высушивают и взвешивают. Органы помещают в формалин и отсылают на гистологическую экспертизу. Кроме того, левую почку высушивают и взвешивают, а кортикальные шлифы используют для изучения ионного поглощения *in vitro*, как описано ниже.

Полная и последовательная окклюзия почечной артерии при исследовании животных подтверждается повышением содержания азота мочевины и креатинина в сыворотке крови. У животных, перенесших только лапаротомию, уровень креатинина в сыворотке остается относительно постоянным и составляет ниже 1,6 мг/дл во всех случаях, а концентрация азота мочевины в сыворотке остается во всех случаях ниже 10 мг/дл. У животных, которых подвергают окклюзии, содержание креатинина в крови поднимается выше 3,5 мг/дл, а содержание азота мочевины поднимается выше 65 мг/дл (N=48).

Приготовление почечной кортикальной ткани

Сразу после умерщвления левые почки подвергают декапсуляции и их разрезают по горизонтальной оси на полоски толщиной 1 см и помещают в охлажденный забуференный фосфатом физиологический раствор (ЗФР). Кортикальный слой почки срезают по периметру каждой горизонтальной секции и помещают в контейнер для срезов Stadie-Riggs™, восемнадцать 0,3-0,4-миллиметровых срезов весом примерно 30-100 мг отрезают от каждой почки, причем наиболее удаленные от центра шлифы отбраковывают. Затем шлифы отдельно выдерживают при 25°C в среде ¹⁴C-ТЭА и ³H-ПАГ в атмосфере 100% O₂ и постоянно перемешивают со скоростью 70 об/мин. В каждый из моментов времени 0, 15, 30, 45, 60 и 90 минут отбирают три среза. Инкубационная среда состоит из 20 мл ПАГ-буфера Cross и Taggart (72,8 мкг/л ПАГ, 10,78 г/л Na₂HPO₄•7H₂O, 1,33 г/л KH₂PO₄, 1,48 г/л MgSO₄•7H₂O, 35,07 г/л NaCl, 1,49 г/л KCl), как описано Cross and Taggart в Am. J. Physiol., 161: 181-190 (1950), 10 мл лактата (0,90 г/100 мл) и 55 мл деионизированной воды, pH доводят до 7,4 с помощью 1M NaOH). Затем добавляют два мл CaCl₂•2H₂O (0,736 г/100 мл) и доводят до конечного объема 100 мл с помощью деионизированной воды. До помещения почечной ткани среду подвергают аэрации, продувая 100% кислородом в течение 30 минут. Непосредственно перед использованием добавляют ¹⁴C-ТЭА и ³H-ПАГ в количестве 0,334 мКи/3 мл среды.

В определенное время шлифы вынимают из инкубационной среды, промокают досуха, взвешивают, растворяют в 1,0 мл Protoso™ (фирма New England Nuclear, Бостон, МА), нейтрализуют соляной кислотой. Радиоактивность в каждом срезе почки и 1,0 мл среды измеряют с помощью системы для измерения сцинтилляции в жидкостях LS5000TD

Liquid Scintillation System (фирма Beckman Instruments, Фуллертон, Калифорния). Результаты регистрируют в виде количества распадов в минуту на 100 мг инкубируемой ткани, деленное на количество распадов в минуту 100 мкл инкубационной среды. Для каждого кролика вычисляют среднее и СКО для каждой группы из трех срезов за определенный период. Из этих значений вычисляют соотношения образец/среда и СКО для групп ОПН+IGF-I, ОПН+des-IGF-I, ОПН- контроль, нормальная группа и ЛАП+IGF-I.

Статистический анализ

Данные по группам на каждый день анализируют с помощью студентизированного Т-критерия и выделяют шести- и трех-дневный тренды, поскольку они играют важную роль при использовании двухфакторного анализа ANOVA повторяющихся показателей с использованием лечения (обработки) и дней в качестве двух группировок. Гистологические экспертизы образцов ткани классифицируют по шкале от нормального до тяжелого изменения в каждой из нескольких категорий, при этом вычисляют статистические различия, используя критерий Фишера.

Данные по группам кроликов анализируют индивидуально и, если нет различия, связанного с весом, данные суммируют. Эффективную почечную ишемию наблюдают визуально в момент операции, а также по послеоперационному увеличению содержания креатинина. У кроликов, не подвергнутых окклюзии, содержание креатинина после операции остается ниже 1,6 мг/дл во все дни. С другой стороны, у кроликов, которым проводили зажим почечной артерии, содержание креатинина в день 1 составляет 2,00-7,10 мг/дл, а в день 7 при гистологическом анализе почки обнаруживают признаки ОПН. Так как зажим почечной артерии приводит к значительным изменениям, соответствующим ОПН, у всех кроликов признана достоверность экспериментальной модели.

Результаты: des-IGF-I по сравнению с контролем

дем

Вес тела кролика

После операции необработанные кролики теряют в весе в среднем 15% в течение 7 дней (см. таблицу 7 и фиг. 3). Это составляет более, чем 350 мг в день 6 у необработанных животных, подвергавшихся окклюзии. Когда вводят des-IGF-I, то животные также теряют в весе, однако потеря веса значительно меньше, чем у животных из группы без обработки, и составляет в среднем только 200 мг, что почти на 40% лучше.

Анализ ANOVA дает незначительные величины p , за исключением дня 2, когда $p=0,0055$. Однако, двухфакторный анализ ANOVA с использованием зависимости "день и вес от группы" дает общее значение p , равное 0,048. В группах, в которых проведена лапаротомия без окклюзии, также наблюдают значительную потерю в весе после операции, она достигает почти той же общей потери в весе на день 6, что и в группе необработанных кроликов, подвергнутых окклюзии. В необработанной группе,

перенесшей лапаротомию, при $N=2$ средняя потеря в день 6 составляет 335 мг. В обработанной IGF-I группе с лапаротомией в день 6 потеря составляет 243 мг. При этом не наблюдают значительного различия между обработанной IGF-I группой с лапаротомией и необработанной группой с лапаротомией, также нет значительного отличия между обработанной IGF-I группой с лапаротомией и необработанной группой с окклюзией. Важное значение этого открытия описано ниже.

Таблица 7

Ежедневная потеря в весе (кг): обработанные des-IGF-I по сравнению с контролем

День X - день 0	des	СКО	Конт- роль	СКО	N=(кт.+ des)	ЛАП	СКО
День 1-0	-0,07	0,028	-0,15	0,022	(4,4)	-0,19	0,03
День 2-0	-0,13	0,02	-0,23	0,015	(4,4)	-0,27	0,05
День 3-0	-0,17	0,033	-0,27	0,028	(4,4)	-0,31	0,06
День 4-0	-0,20	0,042	-0,34	0,047	(4,4)	-0,31	0,1
День 5-0	-0,20	0,077	-0,34	0,08	(4,4)	-0,34	0,15
День 6-0	-0,25	0,061	-0,38	0,076	(9,8)*	-0,34	0,21
День 7-0	-0,06	0,023	-0,23	0,08	(3,4)**	-0,27	0,24

* В день 6 эта величина включает еще 9 кроликов из того же протокола, чей ежедневный вес не определялся, но чей вес на день 6 известен.

** Один контрольный (кт.) кролик умер в день 6.

Вес органов

У животных, обработанных des-IGF-I, анализ веса почки (только правой почки) показывает, что значение веса почки у животных, получавших des-IGF-I ($N=9$) в 1,5 раза больше, чем у контрольных необработанных животных, подвергнутых окклюзии ($N=7$) ($14,87 \pm 0,774$ г по сравнению с $10,21 \pm 0,61$ г соответственно, $p=0,0004$). Вес селезенки у обработанных животных вдвое больше, чем у контрольной группы ($2,43 \pm 0,44$ г по сравнению с $1,17 \pm 0,21$ г соответственно, $p=0,028$). В данном случае нет разницы между группами в отношении веса сердца, а вес тимуса в этой первой группе исследуемых не определяют. См. фиг. 4.

Содержание креатинина в сыворотке крови

У всех кроликов содержание креатинина в сыворотке крови поднимается от контрольной средней $1,14 \pm 0,8$ мг/дл до (после окклюзии) до высокой в день 2 $7,8 \pm 0,77$ и $6,9 \pm 0,63$ мг/дл для обработанной des-IGF-I и контрольной группы соответственно ($p=0,7$). В обеих группах эти повышенные значения вернулись к нормальным значениям $0,9 \pm 0,15$ и $1,18 \pm 0,12$ мг/дл в день 7 и ни в одной точке значения содержания креатинина в сыворотке крови статистически между двумя группами не отличаются (таблица 8 и фиг. 5).

Содержание азота мочевины

Концентрация азота мочевины в сыворотке поднимается от нормальных значений $17,7 \pm 0,7$ мг/дл до высокой в день 2 и составляет $125 \pm 9,3$ мг/дл в контрольной группе и $110 \pm 9,3$ мг/дл в обработанной группе. В контрольной группе эти значения падают до низкого в день 6 и составляют $74 \pm 29,6$ мг/дл, тогда как в обработанной des-IGF-I группе они возвращаются к $58 \pm 25,6$ мг/дл. Хотя результаты анализа ANOVA между группами в лю-

бой заданный день не являются статистически значимыми, двухфакторный анализ для повторяющихся показателей “содержание азота мочевины и день в зависимости от группы” дает значение $p=0,058$, а

29

средние значения концентраций в каждый заданный день для обработанной группы всегда ниже, чем у необработанной группы. См. таблицу 8 и фиг. 6.

Содержание глюкозы в сыворотке крови

Концентрация глюкозы в крови в подвергнутой окклюзии обработанной des-IGF-I группе и в контрольной подвергнутой окклюзии группе уменьшается после операции от среднего начального уровня 173 ± 22 мг/дл до значения в день 1, равного $101 \pm 8,5$ мг/дл и $125 \pm 15,4$ мг/дл соответственно. После дня 1 концентрация поднимается до 140 мг/дл в обеих группах и остается между 127 и 165 мг/дл в оставшееся время эксперимента. У обработанных IGF-I животных наблюдается такое же падение содержания глюкозы в крови после операции. Начальное значение 164 мг/дл падает в день 1 до $103 \pm 4,0$ мг/дл в обработанной IGF-I группе и до $129 \pm 7,0$ мг/дл в контрольной группе. В последующем значения остаются в интервале от 122 до 170 мг/дл.

Таблица 8

Содержание креатинина, азота и глюкозы в крови обработанных des-IGF-I кроликов по сравнению с контрольным подвергнутыми окклюзии кроликами

День	0	1	2	3	4	5	6	7
Креатинин								
Среднее для des-IGF-I	1,18	6,45	7,80	5,45	4,24	3,16	2,72	0,90
СКО для des-IGF-I	$\pm 0,10$	$\pm 0,39$	$\pm 0,77$	$\pm 0,83$	$\pm 1,07$	$\pm 1,10$	$\pm 1,06$	$\pm 0,15$
Среднее для контроля	1,09	6,44	6,94	6,16	5,03	3,92	2,93	1,18
СКО для контроля	$\pm 0,05$	$\pm 0,52$	$\pm 0,63$	$\pm 0,97$	$\pm 1,11$	$\pm 1,07$	$\pm 1,00$	$\pm 0,12$
N = (кт., des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9*	8,9**	4,3
Двухфакторный анализ ANOVA для показателей “обработка и день 1 - день 7 в зависимости от группы” дает значение $p = 0,29$								
Азот мочевины								
Среднее для des-IGF-I	18	91	110	98	82	62	58	15
СКО для des-IGF-I	$\pm 0,09$	$\pm 0,57$	$\pm 9,3$	$\pm 14,0$	$\pm 20,7$	$\pm 22,1$	$\pm 25,6$	$\pm 3,2$
Среднее для контроля	17	102	125	126	111	93	74	19
СКО для контроля	$\pm 0,8$	$\pm 6,0$	$\pm 9,3$	$\pm 18,6$	$\pm 24,4$	$\pm 27,2$	$\pm 29,6$	$\pm 1,8$
N = (кт., des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9	8,9	5,4
Двухфакторный анализ ANOVA для показателей “обработка и день 1 - день 7 в зависимости от группы” дает значение $p = 0,058$								
Глюкоза								
Среднее для des-IGF-I	177	101	143	137	131	131	139	127
СКО для des-IGF-I	$\pm 20,1$	$\pm 8,5$	$\pm 8,0$	$\pm 4,2$	$\pm 6,4$	$\pm 7,5$	$\pm 15,8$	$\pm 3,7$
Среднее для контроля	168	125	148	148	165	160	154	133
СКО для контроля	$\pm 9,5$	$\pm 15,4$	$\pm 8,0$	$\pm 3,8$	$\pm 18,6$	$\pm 20,0$	$\pm 16,5$	$\pm 5,5$
N = (кт., des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9	8,9	5,4

Двухфакторный анализ ANOVA для показателей “обработка и день 1 -

день 7 в зависимости от группы” дает значение $p = 0,09$

-

* Обработанный кролик №4 умер

** Контрольный кролик №7 умер

327

30

Результаты: IGF-I по сравнению с контролем

Вес тела кролика

Данные для контрольных кроликов, используемых в экспериментах с IGF-I, не объединяют с данными для контрольных кроликов, используемых в 35 экспериментах с des-IGF-I, даже несмотря на то, что протокол для обеих контрольных групп один и тот же. Как ожидалось, ОПН приводит к значительной потере веса после операции у всех кроликов. У ОПН-контроля обнаружен средний дефицит 376 ± 84 г в день 6, т.е. потеря 15% от первоначального веса тела. Однако в отличие от des-IGF-I IGF-I в применяемых дозировках не приводит к значительному уменьшению веса. Обработанные IGF-I кролики теряют 250 ± 50 г на день 6, т.е. потеря составляет 9,5%, $p=0,34$. Результаты анализа ANOVA дают незначительные величины p для всех дней, а двухфакторный анализ ANOVA с применением показателей “день и обработка в зависимости от группы” дает значение 0,62. См. таблицу 9. Также нет значительной разницы между группами ОПН+IGF-I и ЛАП+IGF-I.

Таблица 9

Ежедневная потеря в весе (кг): обработанные des-IGF-I по сравнению с контролем

День X - День 0	IGF-I	СКО	Контроль	СКО	N=(кт. + IGF-I)
День 1-0	-0,10	0,01	-0,11	0,02	(11, 13)*
День 2-0	-0,25	0,03	-0,26	0,02	(11, 13)
День 3-0	-0,29	0,03	-0,30	0,03	(6, 10)**
День 4-0	-0,30	0,03	-0,35	0,04	(9, 12)
День 5-0	-0,32	0,04	-0,36	0,05	(9, 12)
День 6-0	-0,25	0,05	-0,38	0,08	(9, 12)
День 7-0	-0,21	0,07	-0,30	0,14	(4, 6)***

* Включает кроликов 25-42 и 44-49

** Контрольные № 40, 42 и 44 и обработанный IGF-I умерли в день 3. Кроме того, кроликов 45-49 не взвешивают в день 3.

*** Включает только веса кроликов 31-42. Предыдущие были умерщвлены в день 6.

Весы органов

У обработанных IGF-I животных вес почек в день 7 равен весу почек в контрольной группе. Средний вес почки обработанного IGF-I кролика составляет $11,85 \pm 0,62$ г, а вес почки необработанного кролика составляет $10,19 \pm 0,65$ г, при этом значимый результат анализа ANOVA $p=0,10$.

Средний сырой вес тимуса у обработанной IGF-I группы почти вдвое больше, чем вес тимуса у контрольной группы, и составляет $4,7 \pm 0,4$ г и $2,0 \pm 0,5$ г соответственно, при этом значимый результат анализа ANOVA $p=0,02$. Если размер тимуса корректируется в соответствии с весом кролика, то увеличивается ($p=0,01$) вероятность того, что сред-

ние веса тимуса являются показателем разницы, в значительной степени зависящей от обработки. Однако сравнение между весом тимусом нормального кролика и весом ОПН+IGF-I-тимуса показывает, что обработанный и нормальный кролики имеют близкую массу тимусов.

Селезенки в двух группах имеют близкий вес, который составляет $1,7 \pm 0,3$ г и $2,0 \pm 0,5$ г для обработанной IGF-I и контрольной групп соответственно. Касательно des-IGF-I, то размер сердца остается таким же независимо от обработки, а разница в размерах печени у обработанных IGF-I животных не обнаружена. См. таблицу 10 и фиг. 7. Шесть животных не взвешивали, а четыре других умерли ранее дня 7, следовательно, эти данные включают десять обработанных и шесть контрольных животных.

Таблица 10

Весы органов у обработанных IGF-I и des-IGF-I и контрольных подвергнутых окклюзии кроликов

Группа	Почка	Селезенка	Тимус	Сердце	Печень	N=(K, S, T, H, L)*
IGF-I	11,9	1,7	4,7	6,3	61,6	(10, 10, 6, 10, 10)**
СКО	$\pm 0,06$	$\pm 0,3$	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 2,9$	
ОПН-кт.	10,2	2,0	2,7	6,3	72,3	(6, 6, 4, 6, 6)**
СКО	$\pm 0,7$	$\pm 0,5$	$\pm 0,6$	$\pm 0,3$	$\pm 6,5$	
des	14,9	2,4	-	6,9	-	(9, 8, 0, 4, 0)***
СКО	$\pm 0,8$	$\pm 0,4$	$\pm 0,2$	-	-	
des-кт.	10,1	11,2	-	6,8	-	(7, 7, 0, 6, 0)
СКО	$\pm 0,6$	$\pm 0,2$	-	$\pm 0,5$	-	
Нормальн.	7,0	1,4	5,2	5,8	87,0	N=2
СКО	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 1,7$	$\pm 0,7$	$\pm 25,2$	

* K = почки, S = селезенка, T = тимус, H = сердце, L = печень

** У кроликов 31-42, обработанных IGF-I животных (N=6) и контрольных животных (N=4), взвешены все органы. У кроликов 25-30, обработанных IGF-I (N=4) и контрольных животных (N=2), взвешены все органы, кроме тимуса.

*** У обработанных des-IGF-I кроликов 1-23, у всех 9 обработанных des-IGF-I животных и всех 7 контрольных, умерщвленных ко дню 7, взвешены почки. У обработанного кролика №13 не записан вес селезенки, а у 5 обработанных и 1 контрольного кролика не взвешено сердце, хотя никакой разницы в размере и гистологии не отмечено. В этой группе животных не зафиксированы веса тимуса и печени, но визуально не замечено разницы в размерах между группами.

Содержание креатинина в сыворотке крови

У животных в обработанной IGF-I и необработанной группах также наблюдают послеоперационное увеличение содержания креатинина в крови по сравнению с нормальными в день 1 от $1,00 \pm 0,09$ до величины в день 2 $5,8 \pm 0,7$ мг/дл и $6,5 \pm 0,8$ мг/дл соответственно. В обеих группах эти повышенные значения возвращаются в день 7 почти к нормальным значениям, составляющим $1,17 \pm 0,12$ и $1,2 \pm 0,06$ в обработанной и контрольной группах соответственно. В дни 5 и 6 у обработанных IGF-I живот-

ных значительно более низкое содержание креатинина в сыворотке крови, чем у контрольной группы, $p=0,04$ и $0,016$ соответственно. В эти дни у обработанных животных содержание креатинина на 40% ниже, чем в контрольной группе. Хотя результаты общего двухфакторного анализа ANOVA незначительны ($p=0,192$ в дни 1 и 6), действие лекарства очевидно проявляется на более поздних стадиях выздоровления, т.е. в дни 4-6. Результат двухфакторного анализа ANOVA в эти дни значителен ($p=0,0334$). См. таблицу 11 и фиг. 8.

Содержание азота мочевины в сыворотке

У животных в обработанных IGF-I и не обработанных группах наблюдают повышенное постокклюзионное содержание азота мочевины в сыворотке.

Среднее значение основной линии, равное $15,5 \pm 0,7$ мг/дл в день 0, поднимается до $122,4 \pm 12,1$ мг/дл в день 2 для ОПН-контроля и $89,9 \pm 12,0$ мг/дл для животных ОПН+IGF-I-группе. В день 7 в обеих группах животных происходит возврат почти к нормальному значению ниже $W \pm 5,5$ мг/дл для каждой группы. Анализ ANOVA показывает, что ежедневные различия статистически значимы в дни 1, 4, 5 и 6, а двухфакторный анализ ANOVA обработки в отношении как дня, так и содержания азота мочевины в сыворотке, начиная с дня 1 до дня 6, дает значение $p=0,0348$. См. таблицу 11 и фиг. 9.

Таблица 11

Содержание креатинина, азота мочевины и глюкозы в сыворотке крови у обработанных IGF-I по сравнению с контрольными подвергнутыми окклюзии кроликами

День	0	1	2	3	4	5	6	7
Креатинин								
Среднее для des-IGF-I	1,0	5,2	5,8	3,9	2,3	1,7*	1,3*	1,2
СКО для des-IGF-I	0,03	0,4	0,7	0,6	0,3	0,2	0,1	0,1
Среднее для контроля	1,0	5,4	6,5	5,4	3,7	2,7	2,1	1,2
СКО для контроля	0,1	0,4	0,8	1,0	0,7	0,5	0,3	0,06

Двухфакторный анализ ANOVA для показателей "обработка и день 4 - день 6 в зависимости от группы" дает значение $p = 0,03$

Азот мочевины

Среднее для des-IGF-I	15,3	74,2	89,9	79,2	49,4	32,8	24,4	19,0
СКО для des-IGF-I	0,6	4,7	12,0	11,2	9,3	6,3	5,5	5,5
Среднее для контроля	15,9	87,3	122,4	119,7	94,6	80,3	72,8	14,5
СКО для контроля	0,7	4,1	12,1	19,5	20,6	21,6	21,3	0,5

Значение p
N = (кт., IGF-I)

Двухфакторный анализ ANOVA для показателей "обработка и день 1 - день 6 в зависимости от группы" дает значение $p = 0,0348$

* $p < 0,05$. Точные значения см. в тексте описания.

** Контрольные кролики 40 и 42 умерли в день 3 и день 4 соответственно. Обработанный кролик 45 умер в день 4. Последние значения для креатинина

трех кроликов перед смертью составляли 10,00, 11,30 и 7,70 мг/дл соответственно, а последние значения для содержания азота мочевины составляли 158, 215 и 147 мг/дл, что наряду с подтвержденной гистологической экспертизой значительной грануляцией почки и некрозом клеток осложняет 35 почечную недостаточность, вызывая смерть.

*** В день 7 величины для сыворотки не рассчитаны для кроликов 25-30 и 43-48 (для обработанных IGF-I N=3, для контрольных N=3). Кроме того, контрольный кролик

№36 умер в день 7 до того, как у него взяли кровь. Более того, данные для контрольного кролика 32 в день 7 показали содержание азота мочевины в сыворотке, равное 14 мг/дл, тогда как в день 6 оно составляло 150 мг/дл. Это неправдоподобно низкое значение не учитывают. N для содержания креатинина в этот день составляет N=3 для контрольной группы, тогда как в день 7 не наблюдали неожиданных эффектов.

³H-ПАГ

Поглощение органического аниона кортикальными шлифами почечной ткани, которое определяется отношением меченого радиоактивной меткой аниона в ткани к аниону в среде, поднимается с 0 в нулевой момент в нормальной группе кроликов до уровня $7,15 \pm 1,78$ за 90 минут (N=4). После почечной окклюзии эффективность поглощения аниона падает до отношения поглощений $4,61 \pm 0,82$ за 90 минут у подвергнутых окклюзии контрольных животных ($p=0,16$). Значения через 45 и 60 минут значительно ниже ($p=0,052$ и $0,043$ соответственно), а двухфакторный анализ ANOVA близок к значимому при $p=0,077$. Отношение через 90 минут у подвергнутых окклюзии обработанных IGF-I животных поднимается до значения $5,09 \pm 0,56$, но незначительно отличается от 90-минутного отношения подвергнутой окклюзии контрольной группы ($p=0,64$).

У обработанных des-IGF-I групп также наблюдают повышенную концентрирующую способность по сравнению с контрольными, но значительной разницы не наблюдают ни в один момент времени. См. таблицу 12 и фиг. 10.

¹⁴C-ТЭА

Поглощение органического катиона ТЭА достигает величины $7,36 \pm 1,40$ за 90 минут в кортикальных срезах печени нормального кролика. У подвергнутых окклюзии контрольных животных это значение резко падает до $4,83 \pm 0,50$, что соответствует 35%-ному уменьшению концентрирующей способности.

У обработанных IGF-I животных отношение через 90 минут составляет $7,21 \pm 0,80$ и имеет повышенные значения во все моменты времени по сравнению с подвергнутыми окклюзии контрольными животными со значимостью во всех временных точках, а по результатам двухфакторного анализа ANOVA при сравнении показателей "время и группы в зависимости от отношения" $p=0,0014$.

Кроме того, в данном случае нет различия между отношениями у подвергнутых окклюзии обработанных IGF-I животных и нормальных животных во всех временных точках, а по результатам

двухфакторного анализа ANOVA с использованием тех же параметров $p=0,71$.

Отношение через 90 минут в группе des-IGF-I составляет $8,48 \pm 1,04$, что значительно превышает отношение поглощения ТЭА у подвергнутых окклюзии контрольных животных. См. таблицу 12 и фиг. 11.

Таблица 12

Поглощение органического катиона и аниона нормальными, подвергнутыми окклюзии контрольными и обработанными des-IGF-I и IGF-I животными

Группа	0 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	N
³ H-РАН							
Нормальн.	0	1,50	2,84	4,22	5,76	7,15	4
СКО	0	0,08	0,46	0,86	1,14	1,78	
ОПН-кт.	0	1,08	1,90	2,48*	3,22*	4,61	10
СКО	0	0,14	0,28	0,39	0,54	0,82	
des-IGF-I	0	1,57	2,84	4,08**	4,34	6,68	3
СКО	0	0,10	0,21	0,34	0,23	0,65	
ОПН+IGF-I	0	1,31	2,18	3,42	3,57	5,09	0
СКО	0	0,12	0,18	0,33	0,30	0,56	
ЛАП+ IGF-I	0	1,21	2,15	3,09	3,50	4,78	3
СКО	0	0,02	0,15	0,21	0,02	0,54	
* Оба эти значения немного ниже, чем у нормальной группы.							
** * Отношение срез/среда через 45 мин для обработанных IGF-I значительно выше, чем у контрольной группы.							
¹⁴ C-ТЭА							
Нормальн.	0	2,13	4,04	4,97	6,58	7,46	4
СКО	0	0,31	0,76	0,92	0,95	1,40	
ОПН-кт.	0	1,31	2,23	2,86	3,60	4,83	10
СКО	0	0,10	0,19	0,26	0,37	0,50	
des-IGF-I	0	2,49	3,95	6,11	6,47	8,48	3
СКО	0	0,84	0,88	1,17	0,88	1,04	
ОПН+IGF-I	0	2,01	3,25	4,85	5,18	7,21	10
СКО	0	0,15	0,25	0,54	0,32	0,80	
Значение р***		0,0012	0,0049	0,0036	0,0045	0,0192	
ЛАП+ IGF-I	0	1,60	3,41	5,18	5,72	6,80	3
СКО	0	0,19	0,39	0,06	0,29	1,32	

Данные выражены как отношение иона в срезе ткани к иону в среде в любом указанном временном интервале.

*** Значение между обработанной IGF-I и контрольной группами. По результатам двухфакторного анализа ANOVA $p=0,0014$. Нет разницы между IGF-I- и нормальной группами.

Гистопатология

Животных, выживших к седьмому дню, умерщвляют и органы отдают на гистологическую экспертизу (таблица 13).

Таблица 13

Показатели гистологии почки * у ОПН+IGF-I- кроликов по сравнению с ОПН-контрольными кроликами

Группа	Дегенерация	Застой	Цистиды	Нефрит	Отек	Кальциноз	Гипертрофия	Дилатация
--------	-------------	--------	---------	--------	------	-----------	-------------	-----------

							фия	
ОПН+	2,4	0,2	0,9	0,4	1,8	1,7	2,6	1,9
IGF-I	±0,5	±0,1	±0,3	±0,2	±0,1	±0,4	±0,2	±0,4
ОПН-	1,5	0,3	1,1	0,8	2,4	2,2	2,4	2,3
кт.	±0,3	±0,2	±0,3	±0,3	±0,3	±0,4	±0,3	±0,3

* Шкала от 0 до 4.4 означает “тяжелое” поражение и 0 “нормал.”

Между группами в гистологии сердца, селезенки или печени не обнаружено статистически значимых различий. Несмотря на значительное увеличение веса тимуса в результате экспертизы тимусов одиннадцати контрольных и шести обработанных IGF-I животных не обнаружено значительных морфологических изменений. Разрезы почек всех животных с ОПН выявляют кальциноз, дилатацию и дегенерацию канальцев.

Экспертиза в группах проводилась с целью обнаружения: хронического интерстициального многоочагового нефрита, отека, подострого воспаления оболочки, медуллярной эпителиальной гипертрофии, а также минерализации, дилатации, дегенерации и застоя в канальцах и гиалиновых цилиндров. Разрезам оценивают по шкале от 0 до 4 на основании отсутствия, слабых, средних, заметных или тяжелых изменений. Эти значения являются средними для каждой категории, а значение для каждой группы сравнивают, используя неспаренный двухсторонний Т-критерий. Ни в одной из этих категорий не наблюдают значительных различий, но в среднем в группе обработанных IGF-I кроликов обнаруживается тенденция к меньшему значению величин, касающихся застоя, цилиндров, нефрита, отека, минерализации и дилатации, и в группе обработанных кроликов имеется тенденция к большей гипертрофии.

Выводы

На основании вышеприведенных данных можно предположить, что IGF-I и des-IGF-I оказывают явно положительное воздействие на ишемическую функцию почек у кроликов. При этом наблюдают благоприятное влияние, которое des-IGF-I оказывает на потерю в весе, которая у обработанных des-IGF-I кроликов улучшена на 40% ($p=0,048$). Влияние IGF-I на потерю веса не является ни ярко выраженным, ни статистически значимым.

По многим критериям в отношении анаболического влияния des-IGF-I проявляет втрое большую эффективность по сравнению с имеющим полную последовательность IGF-I. Однако даже с учетом уменьшенной на две трети дозировки, применяемой в приведенных экспериментах, у обработанных des-IGF-I кроликов вес почек был на 50% больше, чем у контрольных кроликов за семидневный период ($p=0,0004$). У обработанных IGF-I почек не наблюдают такого же увеличения массы, однако IGF-I, равно как и des-IGF-I улучшают восстановление функции почек. Важным при этом является то, что IGF-I оказывает очевидно благоприятное влияние на восстановление функции почек без значительного увеличения веса.

Распространенными показаниями в обеих группах являются некроз, грануляция и общее поражение клеток. Некоторые почки имеют кальци-

нозные участки, образовавшиеся в результате отмирания клеток, и в данном случае обнаружены симптомы внеклеточного отложения белков, являющегося причиной отека в обеих группах. Гистологическая экспертиза показывает, что у обработанных IGF-I животных почки поражены в меньшей степени и имеют более явные признаки выздоровления.

Об определенном улучшении деятельности почек в обработанных как des-IGF-I, так и IGF-I группах свидетельствуют не только данные по увеличению веса селезенки, тимуса и почек, но также и показатели содержания креатинина и азота мочевины в сыворотке крови. В обработанной IGF-I группе обнаружены значительно более низкие уровни как креатинина, так и азота мочевины по сравнению с контрольными кроликами. У обработанных IGF-I кроликов содержание азота мочевины в среднем на 50% ниже, чем контрольные значения, в дни 2-6. Избыточный азот мочевины нежелателен, и максимально быстрое возвращение к нормальной концентрации надо рассматривать как положительную реакцию. У обработанных IGF-I животных содержание креатинина также быстрее возвращается к нормальному уровню, чем у контрольных, и это также свидетельствует о том, что лечение с помощью IGF-I улучшает фильтрацию и последующее осуществление ультрафильтрации почками. У кроликов, которым вводили des-IGF-I, уровни креатинина в крови не ниже, чем в контрольной группе. Однако содержание азота мочевины в сыворотке крови было маргинально значимо ниже ($p=0,058$). Таким образом, эти данные позволяют сделать вывод о том, что IGF-I более эффективен по сравнению с усеченным протеином в отношении увеличения функциональной массы почки, необходимой для уменьшения концентрации в сыворотке. Очевидно, что IGF-I фактически восстанавливает нормальную функцию почек при ОПН более быстро, чем эксципиент, а изменения начинаются, вероятно, на 24 часа раньше.

Действие IGF-I на почки также обнаружено в экспериментах с органическими катионами и анионами. Как указано выше, переработка в почке катионов и анионов как базальной, так и апикальной мембранами имеет клиническое значение. Из приведенных в настоящем описании исследований следует, что ишемическое поражение явственно уменьшает способность кортикальных срезов почек концентрировать как анион, так и катион в зависимости от градиента (поля) в экспериментальной установке, что подтверждается значительной разницей отношений срез/среда у нормальных кроликов и у подвергнутых окклюзии контрольных кроликов. Уменьшение функциональной способности на единицу массы уменьшается на 35% для обоих ионов.

Если животным вводят IGF-I, то у них не наблюдается значительного улучшения способности почечных тканей концентрировать анион (хотя тренд позволяет предположить, что при большем количестве субъектов ошибки могут быть уменьшены, а также может быть достигнута значимость). Однако у обработанных IGF-I животных наглядно видно более высокое по величине отношение срез/среда для катиона, при этом в обеих пролеченных группах наблюдается нормальная концентри-

рующая способность. Таким образом, введение IGF-I в течение семи дней после острого поражения приводит к фактическому восстановлению концентрирующей способности: поглощение ТЭА увеличилось на 70%, а поглощение ПАГ увеличилось на 50% по сравнению с ОПН-контролем. Другими словами, когда вводят IGF-I или des-IGF-I, то под их действием клеточный состав почечных кортикальных срезов вновь приобретает нормальную эффективность переносчика катиона для данной массы. Улучшенный *in vitro* ионный перенос у обработанных IGF-I крыс позволяет предположить, что количество функциональной ткани увеличилось.

Заключение

В вышеприведенной модели почечной ишемии кроликов подвергали четкому и измеряемому поражению, которое приводило к уменьшению функциональной способности почки, проявляющейся в увеличении содержания в сыворотке креатинина и азота мочевины и уменьшении переноса органического иона. Кроме того, постишемическая потеря в весе может, по-видимому, служить приемлемым показателем функции почек, хотя термин “послеоперационная” потеря веса является более пригодным.

Лечение с помощью IGF-I с полной последовательностью во время поражения почки благотворно влияет на кроликов во время исследования, снижая содержание креатинина и азота мочевины в сыворотке. У кроликов, которым вводили IGF-I, также обнаружено увеличение массы тимуса и возможное, хотя и незначительное уменьшение потери веса. У животных, которым вводили des-IGF-I, также наблюдают уменьшение содержания азота мочевины в сыворотке и нормальную способность к концентрированию ионов. Более того, масса почки и селезенки у этих животных увеличивалась, а потеря веса уменьшалась. Следовательно, IGF-I и des-IGF-I являются потенциально приемлемыми агентами для предотвращения или уменьшения интенсивности симптомов почечной ишемии у кроликов и могут быть применены на других моделях животных.

Кроме того, данные свидетельствуют, что смертность среди кроликов, которым вводили IGF-I и des-IGF-I, составляет половину смертности среди контрольных, не обработанных таким образом животных.

ПРИМЕР III

Лечение крыс

Введение

Данное исследование проводили с целью определения, могут ли des-IGF-I и IGF-I предотвратить или по крайней мере уменьшить поражение почек у другого вида, т.е. у крыс, и могут ли эти факторы роста уменьшить ожидаемый ускоренный катаболизм, вызванный почечной недостаточностью.

Протокол

Проводили три исследования, в которых ОПН вызывали хирургическим путем с помощью зажима (перекрытия) обеих почек у анестезированных самцов Sprague-Dawley крыс (Charles River Laboratories,

Вилмингтон, МА). Анестезию (кетамин/ксилазин, интрапарентерально) поддерживали во время эксперимента и вводили дополнительно, чтобы поддерживать операционный уровень. Образец дооперационной базальной крови отбирали пери-орбитально под анестезией и затем делали небольшой подкожный латеральный разрез над каждой почкой. Затем почку обнажали через разрез в стенке брюшины. Далее почку вынимали наружу, находили почечную артерию и вену зажимали на 30 или 60 минут, используя 2,5-сантиметровый зажим для аневризмы Schwartz™. С животными с симуляцией операции работали аналогичным образом, за исключением того, что почки не зажимали. Затем удаляли зажимы, разрезы зашивали и животным давали прийти в сознание на подогреваемой подушечке. Химический анализ крови делали с использованием анализатора типа Monarch 2000 Clinical Chemistry Analyzer.

Описание эксперимента

Эксперимент 1: В первом эксперименте зажимы применяли к 16 крысам на 30 минут каждой. Им вводили 259 мкг/день des-IGF-I либо его эксципиента (100 мм уксусная кислота, pH 4,5) с помощью осмотического мини-насоса Alza™ 2001, помещенного подкожно, причем каждый насос начинал действовать сразу же после установки. Всем крысам вводили 50 мкг des-IGF-I или его эксципиента в течение 90 мин после удаления зажимов. Крыс взвешивали, ежедневно отбирали пробу крови через хвостовую артерию и умерщвляли на 7 день.

Эксперимент 2: Данное исследование проводили с целью определить наиболее эффективное время для зажима, в течение которого может быть вызвано поражение почки. Эксперимент 1 показал, что зажим на 30 минут вызывает только слабое поражение почки. Шести крысам осуществляли зажим на 30 минут, 6 крысам - на 60 минут, а 4 оставшиеся крысы служили контрольными с “симуляцией” операции. Крыс взвешивали, ежедневно брали пробу крови через хвостовую вену и умерщвляли на 4 день.

Эксперимент 3: Восемнадцать крысам осуществляют зажим на 60 минут каждой, и 4 оставшиеся крысы служили контрольными с симуляцией операции. В группах из шести крыс каждой вводили 264 мкг/день des-IGF-I, 436 мкг/день IGF-I или эксципиент с помощью осмотического мининасоса Alza™ 2001, помещенного подкожно, причем насосы начинали работать сразу же после установки. Всем крысам подкожно вводили по 100 мкг des-IGF-I, IGF-I или его эксципиента после удаления зажимов. Крыс взвешивали ежедневно, у них ежедневно через хвостовую вену брали кровь до 4 дня и умерщвляли на 7 день.

Результаты

На фиг. 12 сравниваются IGF-I и des-IGF-I в качестве стимуляторов роста почки у крыс с гипопизэктомией. Усеченный IGF-I в 9 раз более действенный, чем IGF-I в качестве фактора роста почки. Вследствие этого значительного воздействия IGF-I и des-IGF-I испытывали на животной модели поражения почки.

Эксперимент 1: Протекание почечной недостаточности, обусловленной окклюзией почечной артерии на 30 минут у контрольных и обработанных des-

IGF-I крыс, показано на фиг. 13-15, на которых представлены прибавление веса, содержание АМК и креатинина соответственно. Увеличение веса значительно больше у обработанной группы, начиная с 5 дня после поражения.

Содержание АМК поднимается до близкого предела в обеих пораженных группах, но затем держится на более низком уровне в обработанной группе. Это влияние des-IGF-I достигает статистической значимости на 6 и 7 дни и отражает анаболическое действие молекулы. Содержание креатинина в сыворотке поднимается и падает аналогичным образом в обеих группах. Это свидетельствует о том, что эта болезнь обладает способностью протекать в слабой степени в течение определенного срока без лечения. Уровень креатинина в крови принимают за показатель функции почек, прежде всего в качестве косвенного показателя скорости клубочковой фильтрации. АМК принимают за показатель обеих функций почек и катаболического состояния крыс.

Эксперимент 2: Протекание почечной недостаточности после окклюзии почечных артерий в течение 30 или 60 минут наблюдали с целью определить время зажима, которое приводит к тяжелому поражению почки, не вызывая летального исхода. См. фиг. 16-18. Во всех группах на вес значительное влияние оказывает хирургическое вмешательство, однако только у животных, у которых зажим проводили в течение 60 минут, обнаружен устойчивый катаболизм.

Явный подъем АМК наблюдается только в группе, в которой зажим проводили в течение 60 мин. Тяжелые последствия 60 - минутного зажима видны также по содержанию креатинина в крови.

Очевидно, что зажим почечной артерии на 60 минут вызывает более тяжелую степень почечной недостаточности по сравнению с 30 - минутным зажимом, однако она не привела к летальному исходу во время экспериментов.

Эксперимент 3: Протекание почечной недостаточности, вызванной окклюзией почечных артерий в течение 60 минут с последующим введением животным мини-насосов с эксципиентом, des-IGF-I или IGF-I. См. фиг. 19-21.

Необработанным крысам с почечной недостаточностью не удавалось набрать вес. Напротив, после 3 дней лечения посредством des-IGF-I вес увеличивался. По сравнению с ним IGF-I в применяемой дозировке давал слабый эффект.

Содержание АМК поднималось до близких величин в подвергнутых окклюзии группах. Однако лечение с помощью IGF-I можно очевидно связать с более быстрым падением содержания АМК.

Содержание креатинина в крови также падало в группах, в которых проводили зажим, однако лечение с помощью des-IGF-I очевидно приводит к более быстрому падению по сравнению с другими группами, в которых проводили зажим.

Заключение

Зажим почечной артерии в течение 60 минут приводил к тяжелой форме ОПН у крыс. Лечение с помощью des-IGF-I и IGF-I во время зажима (перекрытия) очевидно предотвращает значительное

поражение почек, подвергнутых ишемической почечной недостаточности. Des-IGF-I очевидно проявляет анаболическое рост-промотирующее воздействие на молодых крыс с ОПН благодаря, по крайней мере частично, фактору роста, ускоряющему восстановление почечной функции. В применяемой дозировке IGF-I не оказал того заметного влияния на выздоровление почки или увеличение веса тела, который наблюдался при меньшей дозировке des-IGF-I. Однако ожидается, что регулирование применяемых доз IGF-I или способа применения обеспечит повышенное воздействие на выздоровление почки у крыс, так как такой эффект наблюдался на модели кроликов.

Эти результаты позволяют предположить, что IGF-I действует в качестве профилактического лекарства для млекопитающих с повышенным риском возникновения ОПН с целью предотвращения заметного повреждения почки. IGF-I характеризуется тем, что при длительном применении он приводит к большей эффективности у принимающих его пациентов.

Ожидается, что данные для кролика и крысы можно экстраполировать на лошадей, коров и других млекопитающих, вводя поправки на вес тела млекопитающего в соответствии с признанными ветеринарными и клиническими процедурами. Используя стандартные протоколы и процедуры, ветеринары или практикующие врачи могут изменять дозы, схему и способы введения IGF-I и его вариантов для достижения максимального эффекта у соответствующих животных, которые подлежат лечению. Полагают, что то же самое можно отнести и к людям.

1. Способ профилактики острой почечной недостаточности (ОПН) у млекопитающих с повышенным риском возникновения ОПН, включающий введение млекопитающему эффективного количества инсулиноподобного фактора роста IGF-I до момента или в момент, когда предполагается возникновение или возникает ОПН.

2. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что млекопитающим является человек.

3. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что IGF-I комбинируют с IGF-связывающим протеином.

4. Способ по п.3, *отличающийся* тем, что связывающий протеин представляет собой IGFBP-3.

5. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что эффективное количество IGF-I составляет от 0,01 до 1 мг/кг/день.

6. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что введение IGF-I продолжают после момента ожидаемого возникновения ОПН или после наступления ОПН.

7. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что ОПН возникает в результате ишемического поражения почек.

8. Способ по п.2, *отличающийся* тем, что человека подвергают операции на сердце.

9. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что млекопитающее подвергают трансплантации почки.

10. Способ по п.9, *отличающийся* тем, что IGF-I вводят перед трансплантацией.

11. Способ по п.9, *отличающийся* тем, что IGF-I вводят во время трансплантации.

12. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что ОПН возникает вследствие поражения нефротоксинами.

13. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что дополнительно включает введение млекопитающему эффективного количества гормона роста.

14. Применение эффективного количества IGF-I для приготовления медикамента для профилактики острого почечного поражения или недостаточности, причем введение медикамента начинают до момента или в момент, когда предполагается возникновение или возникает ОПН.

15. Применение по п.14, *отличающееся* тем, что IGF-I представляет собой IGF-I человека.

16. Применение по пп.14 или 15, *отличающееся* тем, что IGF-I вводят с IGF-I - связывающим протеином.

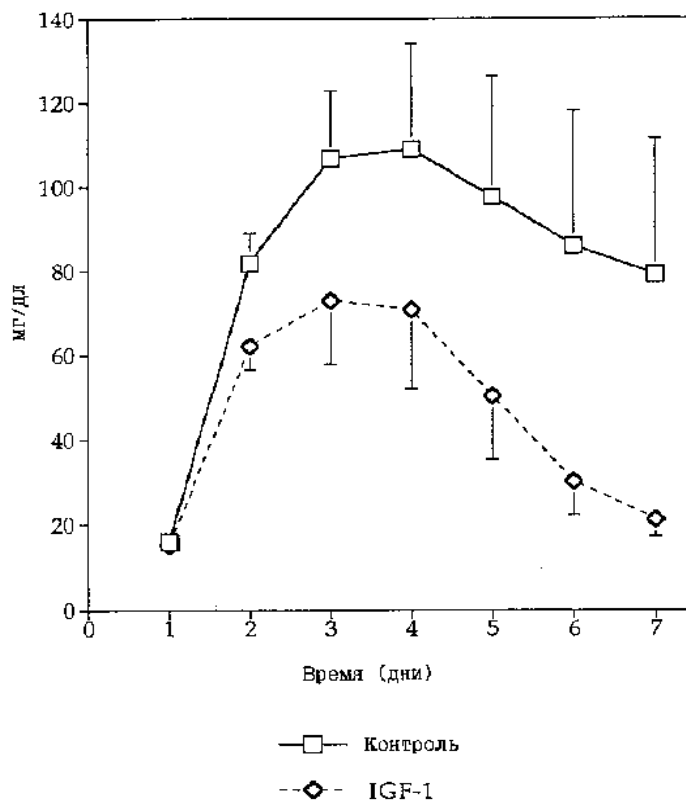
17. Применение по п.16, *отличающееся* тем, что связывающий протеин представляет собой IGFBP-3.

18. Применение по любому из пп.14-17, *отличающееся* тем, что эффективное количество IGF-I составляет от 0,01 до 1 мг/кг/день.

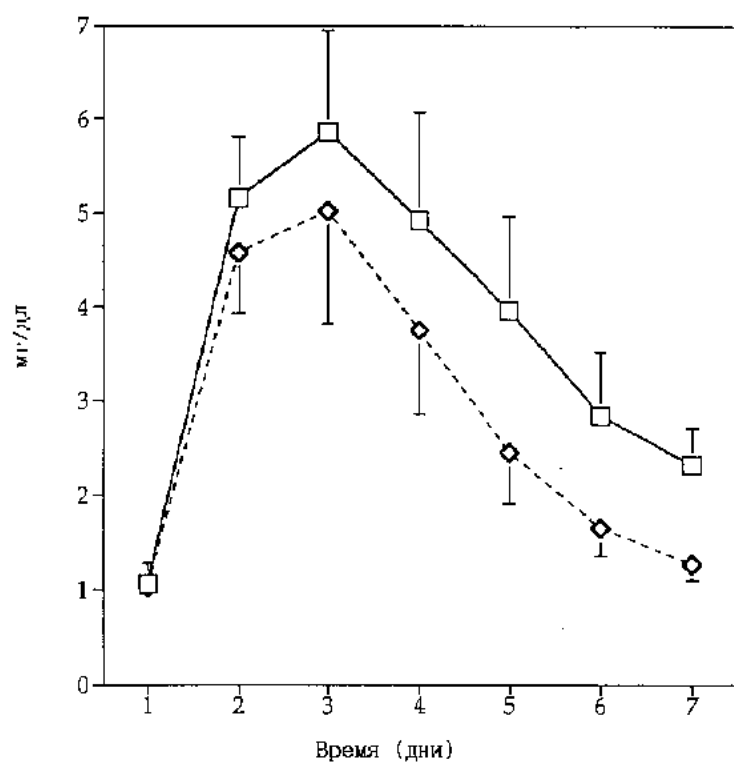
19. Применение по любому из пп.14-17, *отличающееся* тем, что IGF-I вводят непрерывно, причем эффективное количество составляет от 1 до 50 мкг/кг/ч.

20. Применение по любому из пп.14-19, *отличающееся* тем, что медикамент дополнительно содержит эффективное количество гормона роста.

327



Фиг. 1

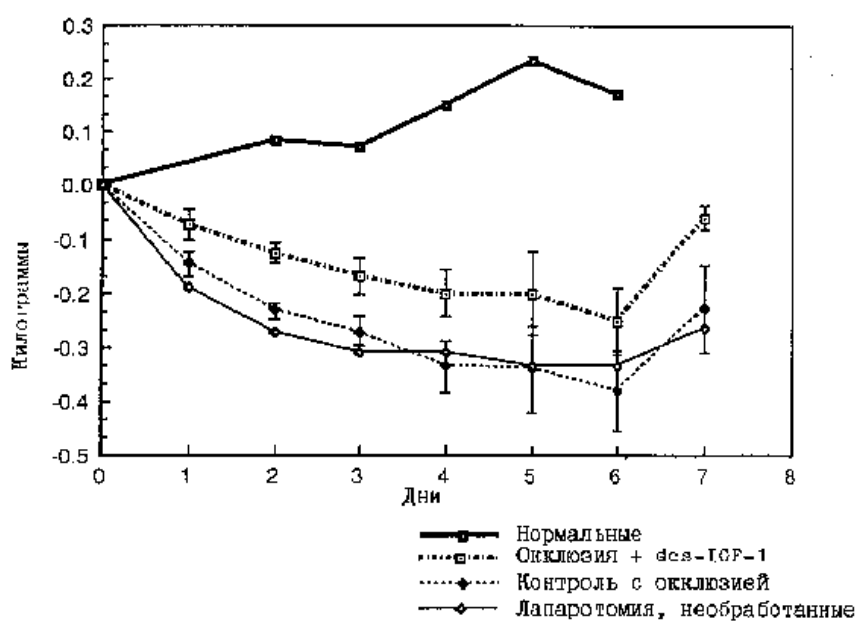


—□— Контроль

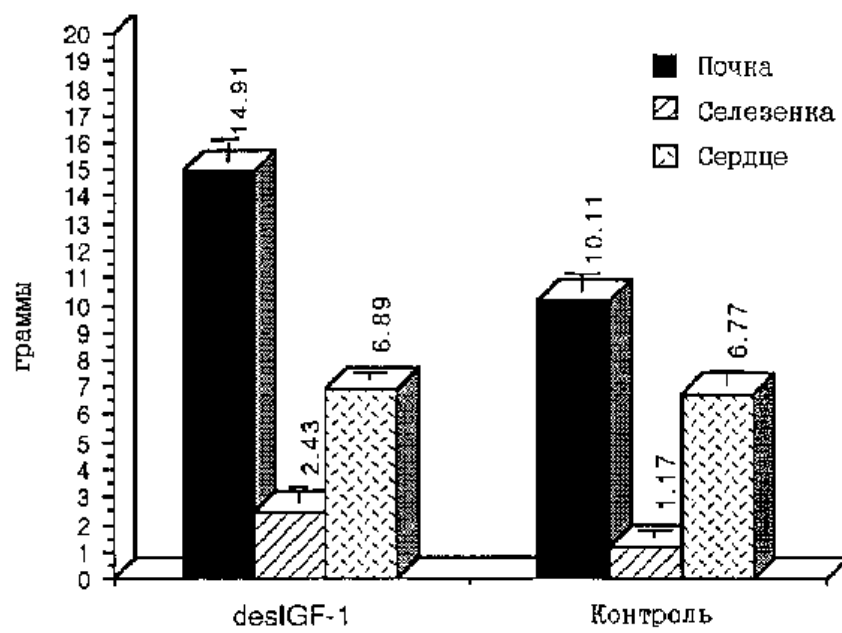
--◇-- IGF-1

Фиг. 2

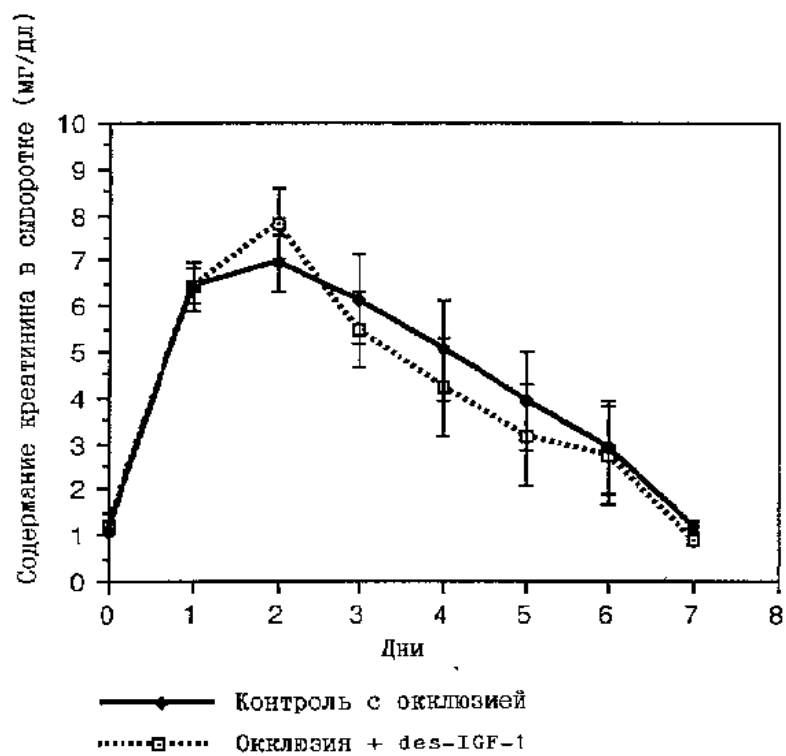
327



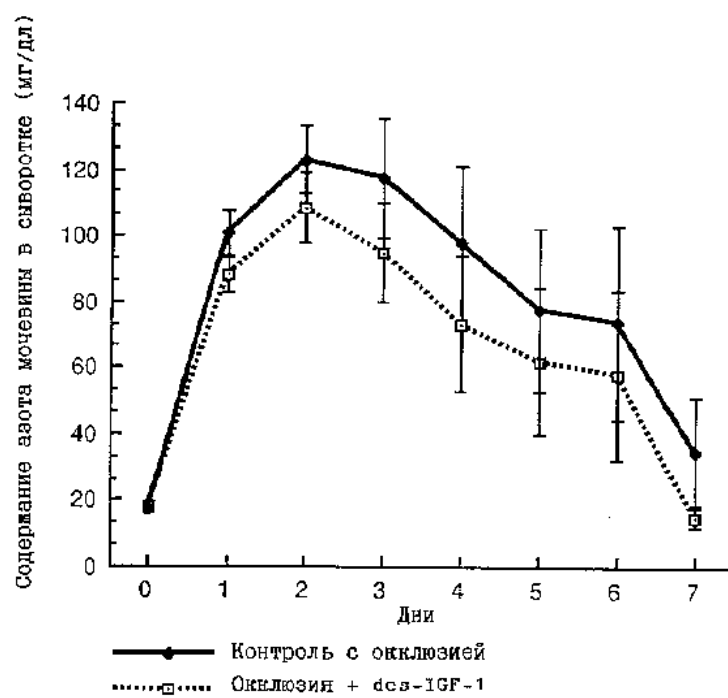
Фиг. 3



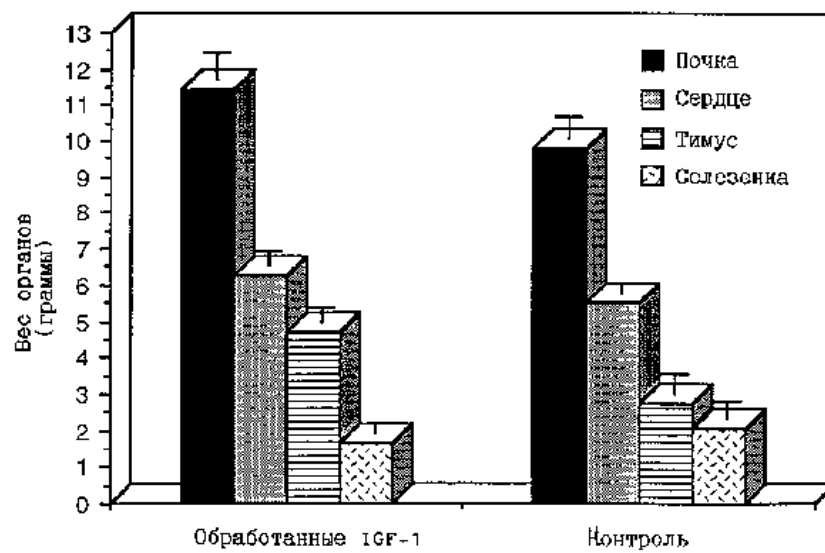
Фиг. 4



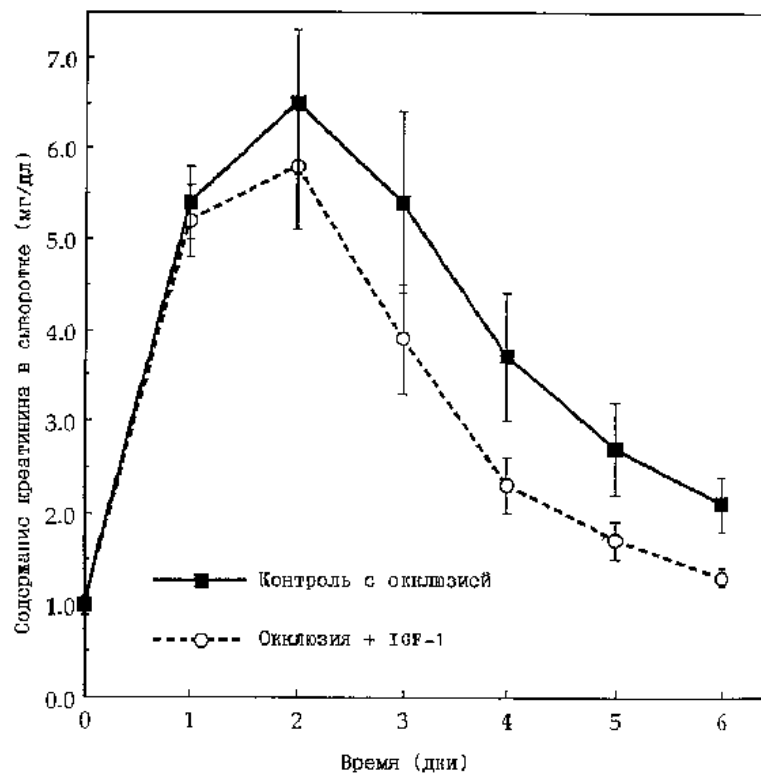
Фиг. 5



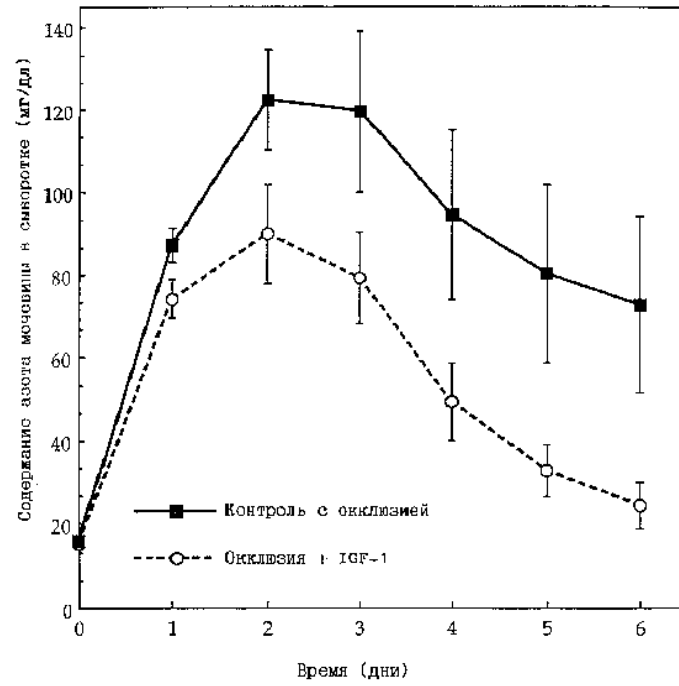
Фиг. 6



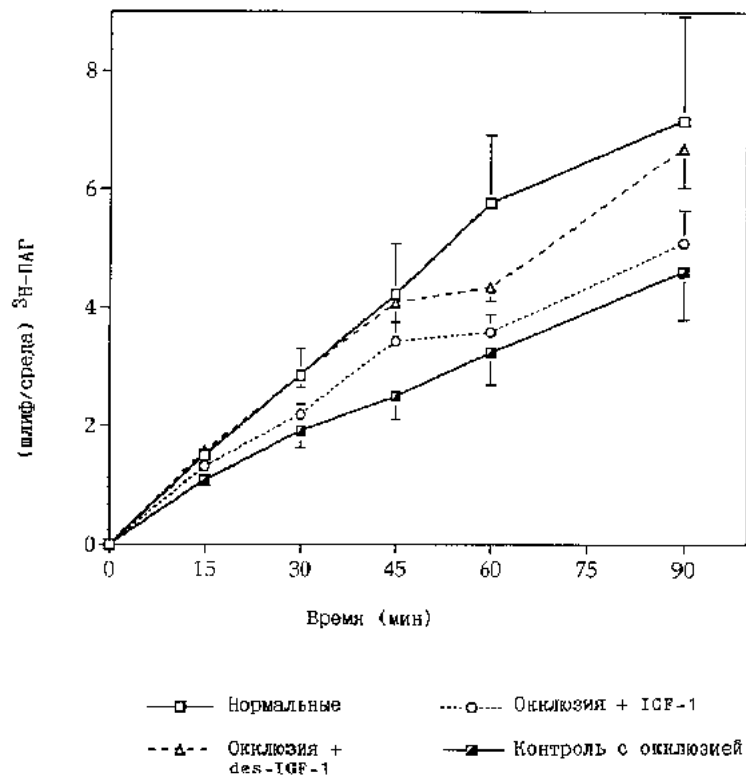
Фиг. 7



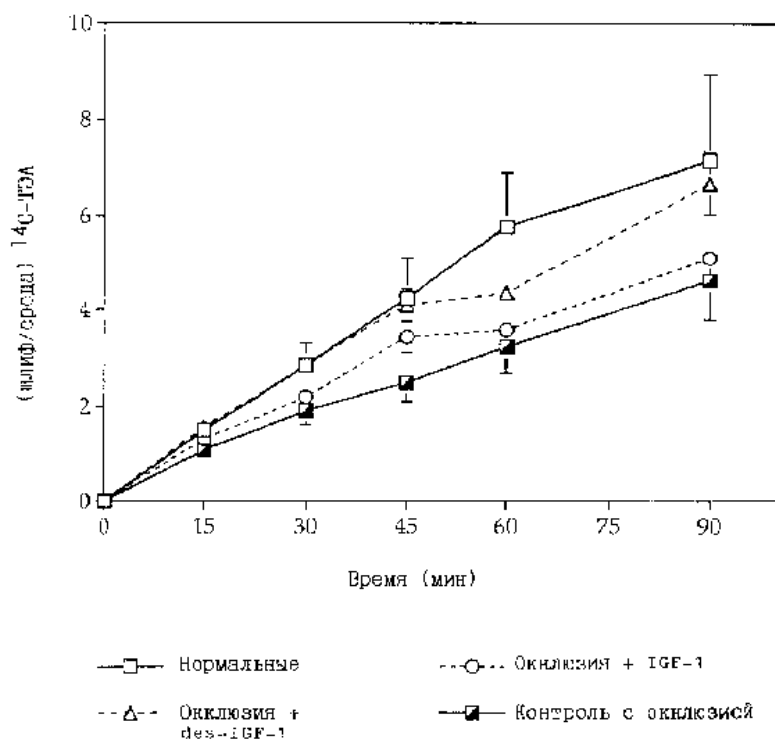
Фиг. 8



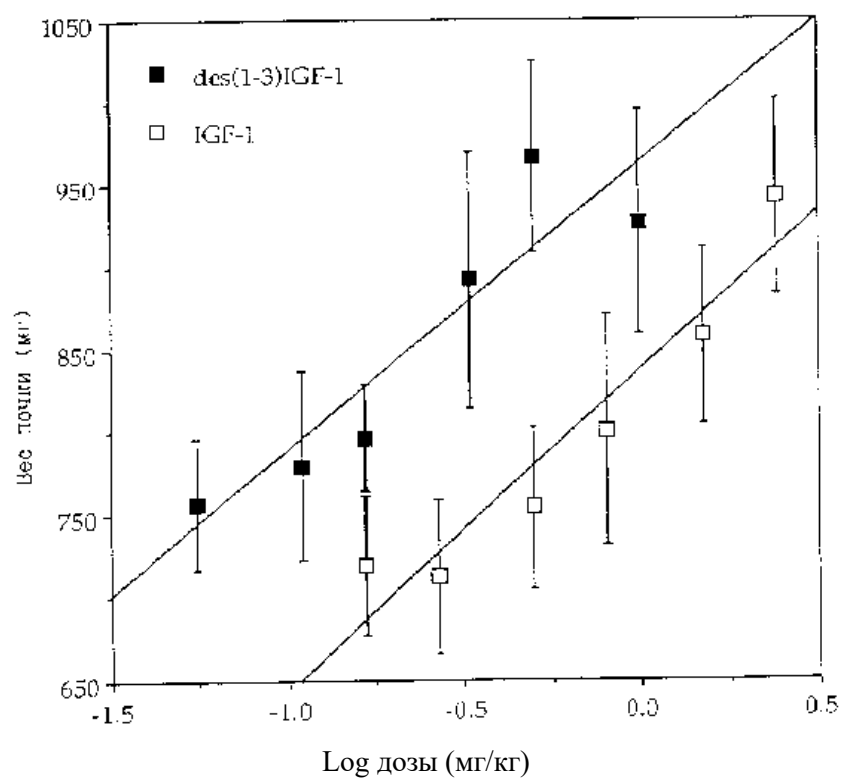
Фиг. 9



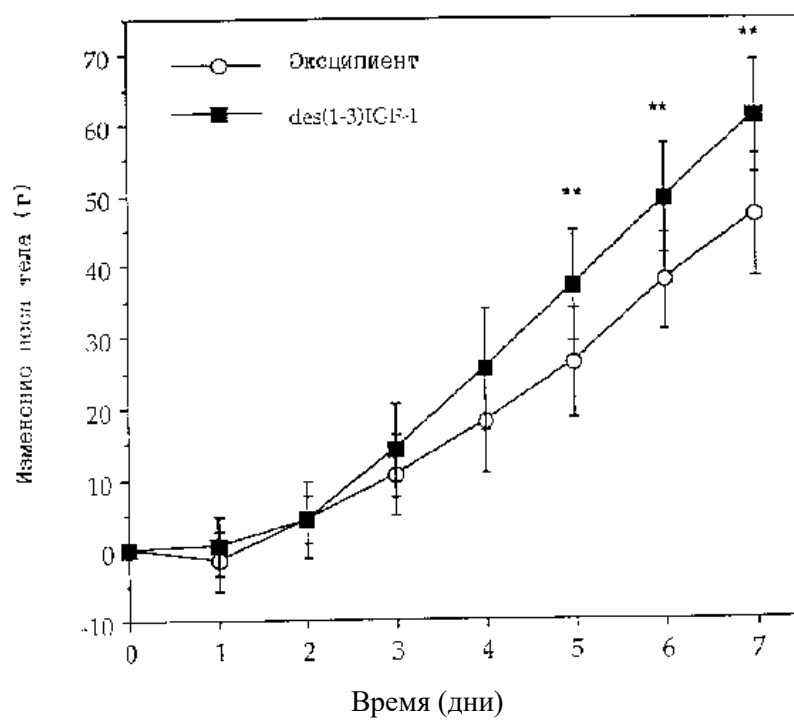
Фиг. 10



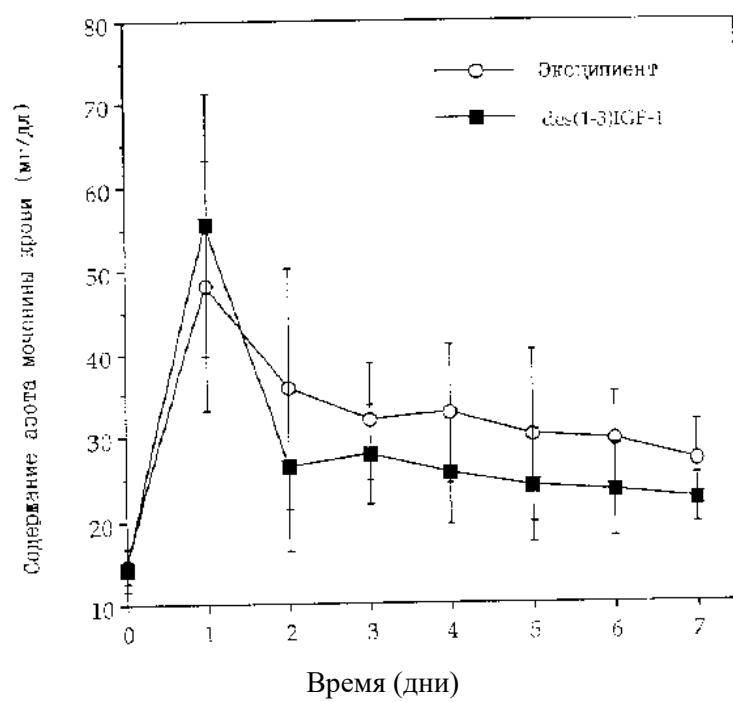
Фиг. 11



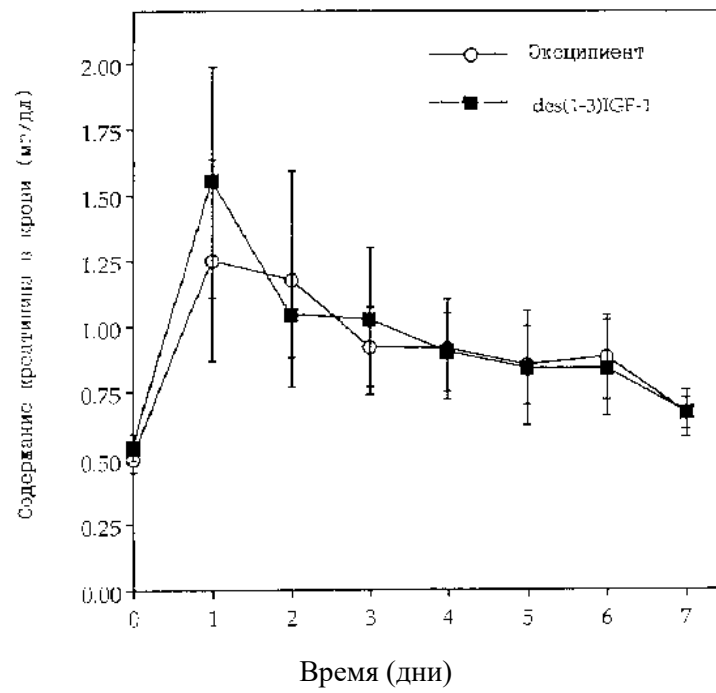
Фиг. 12



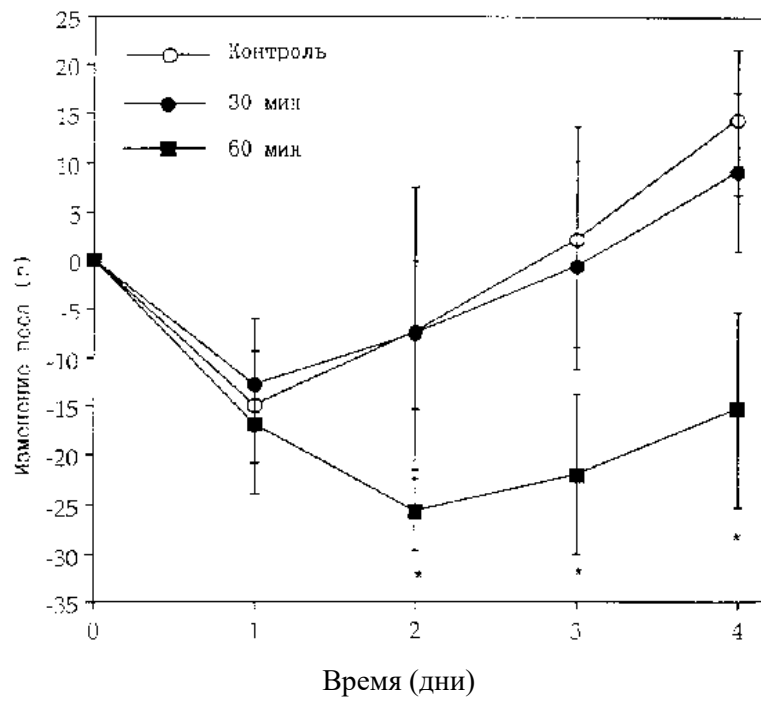
Фиг. 13



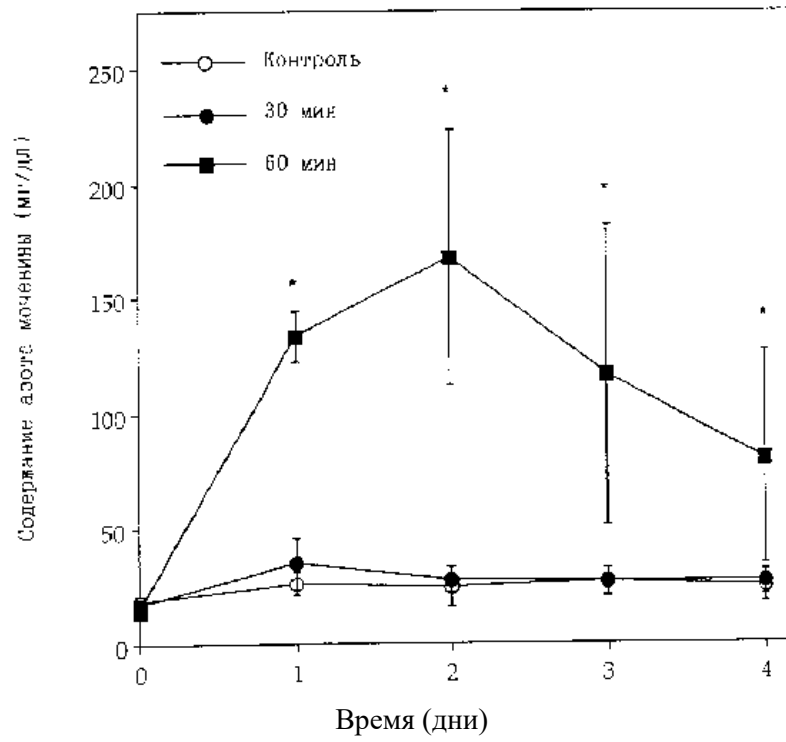
Фиг. 14



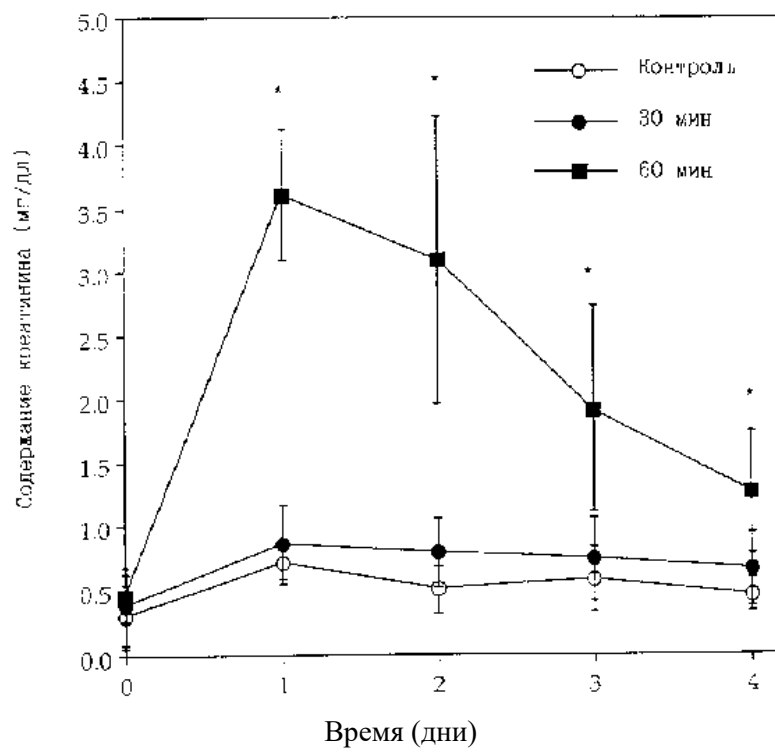
Фиг. 15



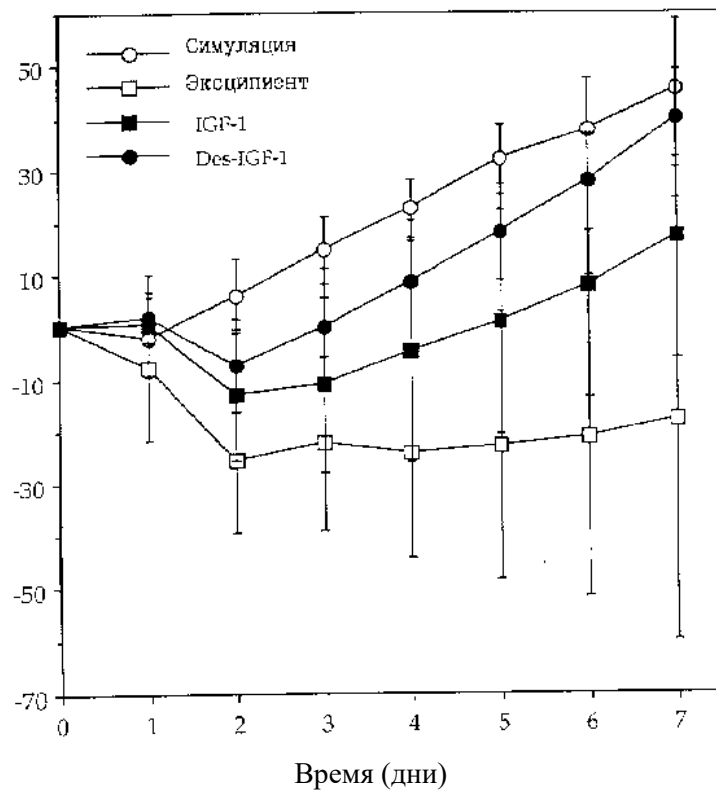
Фиг. 16



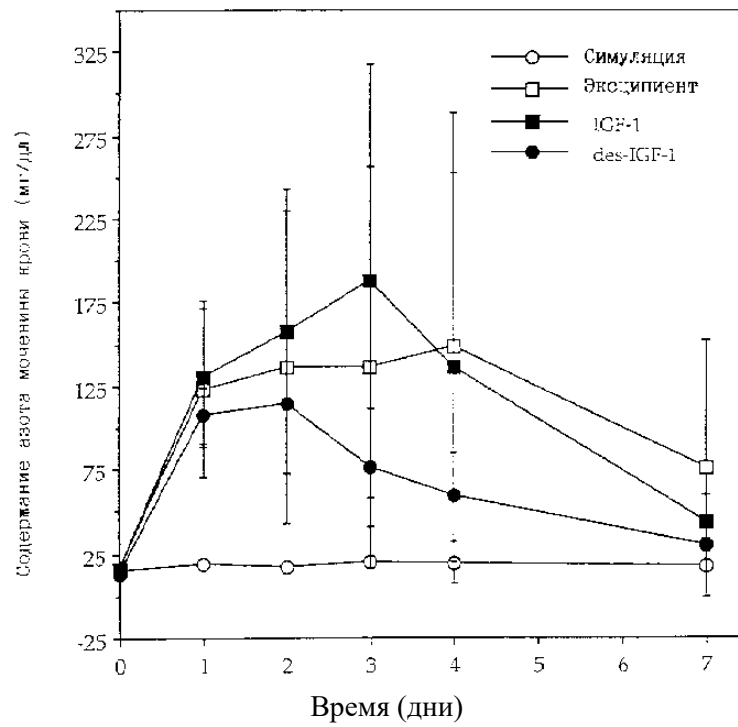
Фиг. 17



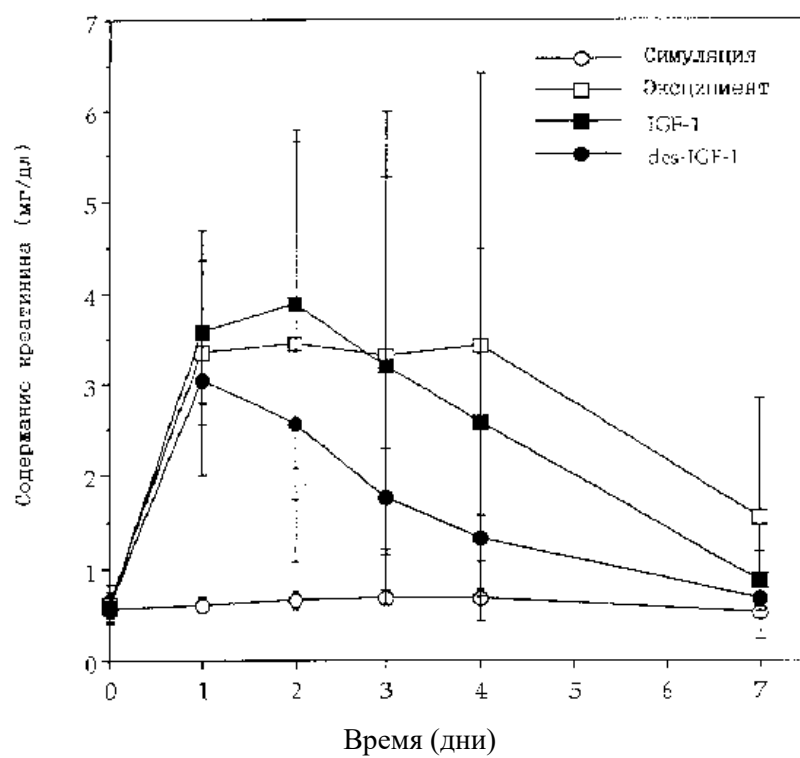
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21