



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009141713/15**, **11.04.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.04.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
12.04.2007 US 60/911,460
05.02.2008 US 61/026,321(43) Дата публикации заявки: **20.05.2011** Бюл. № 14(45) Опубликовано: **27.08.2012** Бюл. № 24(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Научное издательство «Большая Российская энциклопедия», 2001 [Найдено в Интернете, <<http://slovari.yandex.ru/~книги/БСЭ/Кетоновые%20тела/>>Найдено 27.09.2011]. US 5700828 A 23.12.1997. SMITH et al., KTX0101: a potential metabolic approach to cytoprotection in major surgery and neurological disorders, CNS Drug Rev 2005, 11, p.p.113-40. Abstract.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **12.11.2009**(86) Заявка РСТ:
US 2008/060100 (11.04.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/128095 (23.10.2008)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364**

(72) Автор(ы):

**ЭНДРЮС Мэттью Т. (US),
ДРЮС Лестер Р. (US),
БЕЙЛМАН Грег (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
МИННЕСОТА (US)****(54) ЗАЩИТНЫЕ КОМПОЗИЦИИ ОТ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к защитным композициям от ишемии/реперфузии, содержащим по меньшей мере одно кетонное тело, выбранное из β -гидроксипутрата, ацетоацетата и их фармацевтически приемлемых солей и мелатонина. Изобретение также предоставляет

способы применения таких композиций для уменьшения или предотвращения ишемического/реперфузионного нарушения в результате потери крови, апоплектического удара или кардиопульмонального шока или хирургического вмешательства. 6 н. и 37 з.п. ф-лы, 6 пр., 4 табл., 32 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/4045 (2006.01)**A61K 31/12** (2006.01)**A61K 9/08** (2006.01)**A61P 9/10** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009141713/15, 11.04.2008**(24) Effective date for property rights:
11.04.2008

Priority:

(30) Convention priority:
12.04.2007 US 60/911,460
05.02.2008 US 61/026,321(43) Application published: **20.05.2011 Bull. 14**(45) Date of publication: **27.08.2012 Bull. 24**(85) Commencement of national phase: **12.11.2009**(86) PCT application:
US 2008/060100 (11.04.2008)(87) PCT publication:
WO 2008/128095 (23.10.2008)

Mail address:

129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364

(72) Inventor(s):

EhNDRJuS Meht'tju T. (US),
DRJuS Lester R. (US),
BEJLMAN Greg (US)

(73) Proprietor(s):

RIDZhENTS OF DZE JuNIVERSITI OF
MINNESOTA (US)**(54) PROTECTIVE COMPOSITIONS FOR ISCHEMIA/REPERFUSION AND METHODS FOR USING THEM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to medicine,
namely protective compositions for
ischemia/reperfusion containing at least one ketone
body specified in β -hydroxybutyrate, acetoacetate and
their pharmaceutically acceptable salts and melatonin.EFFECT: invention represents methods for using
such compositions for reducing or preventing an
ischemic/reperfusion disorder caused by blood loss,
apoplexy or cardiopulmonary shock, or surgical
intervention.

43 cl, 6 ex, 4 tbl, 32 dwg

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка заявляет приоритет патентной заявки США No 60/911460, поданной 12 апреля 2007 года, и No 61/026321, поданной 5 февраля 2008 года, раскрытия которых включены в описание в полном объеме.

ИССЛЕДОВАНИЯ ИЛИ РАЗРАБОТКИ, ПОДДЕРЖАННЫЕ НА ФЕДЕРАЛЬНОМ УРОВНЕ

Правительство США имеет определенные права на данное изобретение в соответствии с грантом No. W911NF-05-1-0432 и W911NF-06-1-0088, выделенным Управлением перспективных исследовательских проектов министерства обороны США (DARPA).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к ишемическому повреждению и реперфузионному нарушению, а конкретнее к композициям и способам лечения или предупреждения нарушения и повреждения вследствие ишемии и/или реперфузии. Ишемия и/или реперфузионное нарушение могут возникнуть в результате, например, геморрагического шока.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ишемия обычно представляет собой ограничение кровоснабжения, с вытекающим повреждением или нарушением функции ткани. Ишемия относится к полному или относительному недостатку кровоснабжения органа. Относительный недостаток кровоснабжения означает рассогласование кровоснабжения (доставки кислорода) и необходимости в адекватной оксигенации ткани.

Реперфузионное нарушение относится к повреждению, причиненному ткани, когда кровоснабжение восстанавливается в ткани после периода ишемии. Отсутствие кислорода и питательных веществ из крови создает условия, при которых восстановление циркуляции приводит к воспалению и окислительному или пероксидальному повреждению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Одно или более кетоновых тел и мелатонин можно вводить индивидууму для защиты индивидуума от ишемического повреждения и/или реперфузионного нарушения.

В одном аспекте изобретение предоставляет защитную композицию от ишемии/реперфузии. Защитная композиция от ишемии/реперфузии содержит или состоит в основном из одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина. Одно или более кетоновых тел могут представлять собой, например, D-β-гидроксибутират или его фармацевтически приемлемую соль (напр., Na-D-β-гидроксибутират), ацетоацетат или его фармацевтически приемлемую соль, или D-β-гидроксибутират и ацетоацетат в комбинации. Мелатонин может представлять собой, например, 5-метокси-N-ацетилтриптамин. В некоторых вариантах осуществления композиция в значительной степени свободна от неорганических анионов.

В некоторых вариантах осуществления защитная композиция от ишемии/реперфузии представляет собой жидкую композицию. В случае составления в виде жидкости защитная композиция от ишемии/реперфузии может содержать от около 0,1 М до около 8 М кетоновых тел и от около 4 мкМ до около 150 мМ мелатонина. В одном конкретном варианте осуществления защитная композиция от ишемии/реперфузии может содержать около 4 М Na-D-β-гидроксибутирата и около 43 мМ мелатонина. В некоторых вариантах осуществления защитная композиция от ишемии/реперфузии в значительной степени свободна от Cl⁻. В

определенных вариантах осуществления жидкой композиции растворитель представляет собой воду. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция включает солюбилизатор (например, ДМСО) и/или стабилизатор.

5 В других вариантах осуществления защитная композиция от ишемии/реперфузии представляет собой сухую порошковую композицию. При составлении в качестве сухого порошка защитная композиция от ишемии/реперфузии может иметь молярное соотношение кетоновых тел к мелатонину от около 100 до 1.

10 Такие защитные композиции от ишемии/реперфузии могут дополнительно включать один или более антибиотиков, одну или более свободных жирных кислот, одно или более анальгетических веществ, один или более гормонов, один или более метаболитов, одну или более молекул обмена веществ, и/или одно или более соединений, которые изменяют клеточный метаболизм (например, полипептиды, молекулы антисмысловых РНК или сиРНК, лекарственные средства или малые
15 молекулы).

В одном аспекте изобретение предоставляет изделие, которое включает защитную композицию от ишемии/реперфузии. В одном варианте осуществления изделие может представлять собой IV-упаковку, содержащую защитную композицию от
20 ишемии/реперфузии (например, жидкий состав или сухой порошковый состав). В другом варианте осуществления изделие может включать первый и второй флакон, где первый флакон может содержать защитную композицию от ишемии/реперфузии и второй флакон может содержать растворитель. В таком варианте осуществления изделие можно сконфигурировать таким образом, что растворитель второго флакона
25 можно контролируемым образом приводить в контакт с композицией первого флакона. В другом варианте осуществления изделие включает цилиндр шприца, который содержит защитную композицию от ишемии/реперфузии. В еще одном варианте осуществления изделие может включать упаковочный материал и защитную композицию от ишемии/реперфузии, где упаковочный материал может
30 включать этикетку или вкладыш в упаковку, содержащий инструкции для лечения индивидуума, который испытывает или перенес кровопотерю, который испытывает или перенес удар или который готовится подвергнуться или подвергается медицинской процедуре (например, хирургическому вмешательству).

35 В другом аспекте изобретение предоставляет способы лечения индивидуума, который испытывает или перенес кровопотерю. Такие способы включают введение одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина индивидууму. В некоторых вариантах осуществления одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят
40 совместно в единой композиции. В определенных вариантах осуществления индивидуум, нуждающийся в лечении, имеет уровни StO_2 , которые составляют менее чем 75%. Как правило, стадия введения приводит к возвращению уровней StO_2 индивидуумов к величине более чем 75%, которая является характерной для индивидуума, подвергавшегося лечению. В определенных вариантах осуществления
45 индивидуум, нуждающийся в лечении, имеет уровни лактата, которые выше чем 2,1 мг/дл. Обычно стадия введения приводит к возвращению уровней лактата индивидуумов к величине меньшей чем 2,1 мг/дл, которая является характерной для индивидуума, подвергавшегося лечению. Обычно стадия введения предотвращает
50 достижение дефицита основания у индивидуума величины 6 мЭк/л.

В определенных вариантах осуществления индивидуум испытывает или перенес обширное геморрагическое событие (например, индивидуум потерял объем крови, по меньшей мере, около 10%, по меньшей мере, около 20%, по меньшей мере,

около 30%, по меньшей мере, около 40%, по меньшей мере, около 50% или, по меньшей мере, около 60%). В некоторых вариантах осуществления кровопотеря у индивидуума приводит к систолическому давлению крови около 70 мм рт. ст. (например, 65 мм рт.ст., 60 мм рт.ст.) или менее. В определенных вариантах

5 осуществления одно или более кетоновых тел вводят индивидууму в количестве, достаточном для достижения концентрации в крови от около 3 мМ до около 15 мМ, и мелатонин вводят индивидууму в количестве, достаточном для достижения концентрации в крови от около 20 мкМ до около 150 мкМ. В определенных

10 вариантах осуществления одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят в объеме от около 0,3 до около 2 миллилитров (мл) на килограмм (кг) массы индивидуума. В определенных вариантах осуществления одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят в объеме от около 0,3 до около 2 мл на кг массы индивидуума в час. В определенных вариантах осуществления одно или более

15 кетоновых тел и мелатонин вводят в объеме от около 0,3 до 2 мл на кг массы индивидуума, после чего следует введение одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина в объеме от около 0,3 до 2 мл на кг массы тела индивидуума в час. Типичными способами введения одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина являются внутривенный и внутрикостный.

20

В другом аспекте изобретение предоставляет способ лечения индивидуума, уровни StO₂ которого находятся ниже 75%, и/или который обладает уровнем дефицита основания выше чем 6 мЭк/л, включающий выявление такого индивидуума, уровни StO₂ которого находятся ниже 75% или уровень дефицита основания

25 которого выше чем 6 мЭк/L; и введение одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина индивидууму.

В еще одном аспекте изобретение предоставляет способы защиты индивидуума от ишемического повреждения или реперфузионного нарушения. Такие способы

30 обычно включают введение одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина индивидууму. Характерные индивидуумы - те, кто получил удар или рискует получить удар, те, кому предстоит подвергнуться хирургическому вмешательству (например, нейрохирургическому). В некоторых вариантах осуществления одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят в количестве 1 мл на кг массы

35 индивидуума. В определенных вариантах осуществления такое введение может следовать за медленной инфузией одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина.

В еще одном аспекте изобретение предоставляет способы лечения органа перед

40 изъятием органа у донора органа. Такие способы обычно включают введение одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина донору органа (например, внутривенно). Посредством примера, одно или более кетоновых тел и мелатонин можно вводить донору органа в количестве, по меньшей мере, около 1 мл на кг массы донора органа. В определенных случаях донор органа находится в

45 устойчивом вегетативном состоянии.

Если не указано особо, все используемые технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевает любой специалист в области, к которой данное изобретение относится. Хотя способы и материалы, сходные или

50 эквивалентные описанным способам и материалам, можно использовать на практике или при проверке настоящего изобретения, применимые способы и материалы описаны ниже. Кроме того, материалы, способы и примеры носят лишь иллюстративный характер и не являются ограничивающими. Все отмеченные в

описании публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки или ссылочные материалы включены в качестве ссылки во всей полноте. В случае конфликта настоящую спецификацию, включая определения, следует считать регулирующей.

5 Подробные описания одного или нескольких вариантов осуществления изобретения изложены в прилагаемых ниже чертежах и описании. Другие характеристики, предметы и преимущества изобретения станут очевидными из чертежей и подробного описания и из пунктов формулы изобретения.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

10 Фигура 1 демонстрирует структуру [1-¹³C]глюкозы.

Фигура 2 демонстрирует структуру [2,4-¹³C]D-β-гидроксипутирата.

Фигура 3 представляет собой кривую, демонстрирующую базовые уровни ¹³C-глюкозы в мозге.

15 Фигура 4 представляет собой меченый спектр выбранных метаболитов земляных белок в состоянии спячки, проанализированный на спектрофотометре 14,1 Tesla UNITY INOVA (Varian; Palo Alto, CA). Панель А демонстрирует результаты после IP-инъекции 1 мл 1 М ¹³C ВНВ февральскому животному в состоянии спячки (Tb=16,8°C в момент умерщвления). Панель В демонстрирует результаты после IP-инъекции 1

20 мл 1 М ¹³C-глюкозы декабрьскому животному в состоянии спячки (Tb=35,3°C в момент умерщвления). Значения в обеих панелях были нормированы на два естественным образом меченых пика ¹³C-таурина, которые не менялись при инфузии метки и могли быть использованы для определения концентрации других

25 соответствующих метаболитов. Сокращения отражают обозначенные метаболиты и специфически меченые углеродом: Tau C1, таурин C1; ВНВ C2, β-гидроксипутират C2; Tau C2, таурин C2; GLu C4, глутамат C4; ВНВ C4, β-гидроксипутират C4; Lac C3, лактат C3; Glc C1-α, глюкоза C1 α; Glc C1-β, глюкоза C1 β.

30 Фигура 5 демонстрирует результаты иммуноцитохимического анализа транспортера монокарбоксилата 1 (MCT1) и транспортера глюкозы (GLUT1) в мозге крысы и земляной белки (GS).

Фигура 6 демонстрирует повышенные уровни MCT1 в гемеоэнцефалическом барьере находящихся в спячке земляных белок, на основании

35 иммуноцитохимического анализа.

Фигура 7 демонстрирует повышенные уровни MCT1 в гемеоэнцефалическом барьере по оптической плотности MCT1 в кровеносных сосудах во время состояния зимней спячки (HIB) и в августе (AUG), октябре (OCT) и апреле (APR).

40 Фигура 8 демонстрирует 2-мерные гели полипептидов из сердец от активных и находящихся в спячке земляных белок. 1, легкая цепь 1 вентрикулярного миозина (n.c, act, n=5; hib, n=4); 2, сукцинил-СоА трансфераза (6-кратное увеличение, * = p<0,005).

Фигура 9 демонстрирует временную шкалу экспериментов с сильными травмами. 45 Кровь отбирали в помеченные буквами моменты времени (A-J).

Фигура 10 демонстрирует график уровней β-гидроксипутирата в сыворотке после введения 1 мл 4 М D-ВНВ или 4 М NaCl на кг массы крысы. Образцы подсчитывали в трех повторностях для минимизирования ошибки отмеривания пипеткой, и значения представлены в миллимолярных концентрациях. Планки погрешностей 50 представляют собой стандартные погрешности среднего.

Фигура 11 демонстрирует график уровней β-гидроксипутирата в сыворотке после введения 1 мл/кг с последующей инфузией в 100 мкл/час. Образцы подсчитывали в трех повторностях для минимизирования ошибки отмеривания пипеткой, и значения

представлены в миллимолярных концентрациях. Планки погрешностей представляют собой стандартные погрешности среднего.

Фигура 12 представляет собой график, демонстрирующий эффект поддержания температуры (левый столбец) против гиповолемического охлаждения (правый столбец) на выживаемость после геморрагического шока. Планки погрешностей представляют собой стандартные погрешности среднего.

Фигура 13 демонстрирует эффекты различных схем введения на выживаемость после геморрагического шока. Планки погрешностей представляют собой стандартные погрешности среднего.

Фигура 14 демонстрирует кривую выживаемости Kaplan-Meier крысы, получившей указанное лечение в сочетании с 60%-ой потерей крови в течение одного часа. Через один час после 60%-ой потери крови пролитую кровь возвращали и контролировали выживаемость животных. Фиктивных животных анестезировали и катетизировали, но кровь не отбирали.

Фигура 15 представляет собой график, демонстрирующий эффект указанного лечения на частоту пульса.

Фигура 16 представляет собой график, демонстрирующий эффект указанного лечения на среднее артериальное давление крови.

Фигура 17 представляет собой график, демонстрирующий эффект указанного лечения на температуру тела.

Фигура 18 демонстрирует стратегию реанимации после геморрагического шока у свиней. SBP = систолическое давление крови; UO = диурез; Hgb = гемоглобин.

Фигура 19 демонстрирует кривые выживаемости Kaplan-Meier для групп крыс, которые испытали 60%-ную потерю крови и которым вводили либо защитную композицию от ишемии/реперфузии, содержащую 4М D-BHB и 43 мМ мелатонина (4М D-BHB+M), либо контрольный раствор, содержащий 4М D-BHB, 4М NaCl, или 4М NaCl плюс 43 мМ мелатонина (4М NaCl + M). Фиктивных животных (SHAM) не подвергали потере крови, кроме как при отборе образцов крови, но с ними проводили анестезию, катетеризировали и давали возможность восстановления в течение того же количества времени, что и животным в других группах. Возвращение крови = время, через которое пролитую кровь возвращали; 18 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов и 10 дней = 18 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов и 10 дней после возвращения пролитой крови соответственно. Временные точки на оси x представлены не в масштабе.

Фигура 20 представляет собой график, изображающий средние уровни лактата, определенные в различных временных точках в сыворотке от крысы, которая испытала 60%-ную потерю крови и которой вводили либо защитную композицию от ишемии/реперфузии, содержащую D-BHB и мелатонин (4М D-BHB+M), либо контрольный раствор, содержащий 4М D-BHB, 4М NaCl, или 4М NaCl плюс мелатонин (4М NaCl + M). В каждой группе лечения было 10 животных. Фиктивных животных (SHAM) не подвергали потере крови, кроме как при отборе образцов крови, но с ними проводили анестезию, катетеризировали и давали возможность восстановления в течение того же количества времени, что и животным в других группах. До гипотензии = перед потерей крови; 35 мм рт. ст. = около 40% потери крови; Инф посл раст = инфузия после раствора; 60% BL = 60% потери крови; 1 ч после 60% BL = один час после 60%-ой потери крови; возвращение крови = время, через которое пролитую кровь возвращали.

Фигура 21 представляет собой график, изображающий уровни D-BHB (мМ),

определенные в многочисленных временных точках в сыворотке от свиней, которые испытали потерю крови и которым вводили низкую, среднюю или высокую дозы защитной композиции от ишемии/реперфузии, содержащий D-ВНВ плюс мелатонин. Уровни D-ВНВ в сыворотке контрольных свиней также представлены на графике.

5 Shk 30, 60, 90 = 30, 60 и 90 минут после шока соответственно. 1 Hr, 2Hr, 4 Hr, 6 Hr и 8 Hr = 1, 2, 4, 6 и 8 часов после начала реанимации соответственно. Левая и правая вертикальные линии показывают начало и окончание соответственно введения жидкости.

10 Фигура 22 представляет собой график, изображающий средние уровни лактата (ммоль/л), определенные в различных временных точках в сыворотке от свиней, которые испытали потерю крови и подвергшиеся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором. Shk 30, Shk 60 и Shk 90 = 30, 60 и 90 минут после шока соответственно. 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2,

15 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации соответственно. Левая и правая вертикальные линии показывают начало и окончание соответственно, введения жидкости.

Фигура 23 представляет собой график, изображающий значения дефицита/избытка основания (моль/л) в многочисленных временных точках у свиней, которых

20 подвергли геморрагическому шоку и подвергали лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором. Start = момент времени, когда начался протокол геморрагического шока; Shk 30, Shk 60 и Shk 90 = 30, 60 и 90 минут после шока соответственно; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации соответственно.

25 Фигура 24 представляет собой график, изображающий значения pH, определенные в некоторых временных точках в сыворотке от свиней, которых подвергли геморрагическому шоку и подвергали лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором. Start = момент времени, когда

30 начался протокол геморрагического шока; Shk 30, Shk 60 и Shk 90 = 30, 60 и 90 минут после шока соответственно; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации, соответственно.

Фигура 25 представляет собой график, изображающий перфузию периферийной ткани (StO₂; %), определенную в некоторых временных точках у свиней, которых

35 подвергли геморрагическому шоку и подвергали лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором. End Sx = стабилизация животных перед шоком; Start = начало протокола геморрагического шока; Infusion = начало инфузии защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольного раствора; Shock 30 = 30 минут после шока; End Shock = момент времени, при котором

40 систолическое давление составляло около 50 мм рт. ст.; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации соответственно. Левая и правая вертикальные линии показывают начало и окончание, соответственно, инфузии защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольного раствора.

45 Фигура 26 представляет собой график, изображающий доставку кислорода (мл O₂ в минуту) в некоторых временных точках у свиней, которых подвергли геморрагическому шоку и которым вводили защитную композицию от ишемии/реперфузии или контрольный раствор. Start = момент времени, когда

50 начался протокол геморрагического шока; Shk 30, Shk 60 и Shk 90 = 30, 60 и 90 минут после шока соответственно; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации соответственно.

Фигура 27 представляет собой график, изображающий общие объемы отобранной

крови и жидкостей, введенных свиньям, которых подвергли геморрагическому шоку и которых подвергли лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором.

5 Фигура 28 представляет собой график, изображающий жидкости, введенные (мл/кг) в многочисленных временных точках свиньям, которых подвергли геморрагическому шоку и которым вводили защитную композицию от ишемии/реперфузии или контрольный раствор. OR Fluids - операционные жидкости; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после
10 реанимации соответственно.

Фигура 29 представляет собой график, изображающий сердечный выброс (л/минуту) в нескольких временных точках у свиней, которых подвергли геморрагическому шоку и которых подвергли лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором. Start = момент времени, когда
15 начался протокол геморрагического шока; Shk 30, Shk 60 и Shk 90 = 30, 60 и 90 минут после шока соответственно; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации соответственно.

Фигура 30 представляет собой график, изображающий частоту пульса (ударов/минуту) в нескольких временных точках у свиней, которых подвергли геморрагическому шоку и которых подвергли лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором. Start = момент времени, когда
20 начался протокол геморрагического шока; Болюс = время, при котором болюс был введен; Shk 30 = 30 минут после шока; Resus = реанимация; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации соответственно.
25 Левая и правая вертикальные линии показывают начало и окончание, соответственно, инфузии защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольного раствора.

Фигура 31 представляет собой график, изображающий систолическое давление крови (мм рт.ст.) в многочисленных временных точках у свиней, которых подвергли геморрагическому шоку и которых подвергли лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором. End Sx = стабилизация животных
30 перед шоком; Start = момент времени, когда начался протокол геморрагического шока; Болюс = время, при котором болюс был введен; Шок 30 = 30 минут после шока; End Shk = время окончания шока; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации соответственно. Левая и правая
35 вертикальные линии показывают начало и окончание, соответственно, инфузии защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольного раствора.
40

Фигура 32 представляет собой график, изображающий диурез (мл/кг/час), определенный в многочисленных временных точках у свиней, которых подвергли геморрагическому шоку и которых подвергли лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором. Start = момент времени, когда
45 начался протокол геморрагического шока; Shk 30, Shk 60 и Shk 90 = 30, 60 и 90 минут после шока соответственно; 1 Hr, 2 Hr, 3 Hr, 4 Hr, 5 Hr, 6 Hr, 7 Hr и 8 Hr = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов после реанимации соответственно. Левая и правая вертикальные линии показывают начало и окончание, соответственно, инфузии защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольного раствора.
50

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Одно или более кетоновых тел и мелатонин можно вводить индивидууму для защиты индивидуума от ишемического повреждения и/или реперфузионного

нарушения. Одно или более кетоновых тел и мелатонин можно вводить индивидууму, испытывающему или испытывавшему кровопотерю, переносящему или перенесшему удар или кардиопульмональный шок или готовящемуся к или

5 подвергаемому хирургическому вмешательству. Кроме того, одно или более кетоновых тел и мелатонин можно вводить донору органа до изъятия с тем, чтобы тщательно опрыскивать ткань или орган перед изъятием.

Защитные композиции от ишемии/реперфузии

Это раскрытие предоставляет композиции, которые включают одно или более

10 кетоновых тел и мелатонин. Эти композиции представляют собой жидкости для защиты от ишемии/реперфузии, которые могут защищать ткани, органы и, таким образом, индивидуумов от значительных травм. Раскрытые в описании композиции могут включать одно или более кетоновых тел и мелатонин, и могут включать

15 другие компоненты, такие как, например, терапевтические соединения, некоторые из которых описаны ниже. Раскрытые в описании композиции могут «состоять в основном из» одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина, подразумевая, что такие композиции представляют собой преимущественно одно или более кетоновых тел и мелатонин, но могут содержать другие компоненты,

20 присутствующие в композиции, которые по существу или фактически не ослабляют защитные характеристики композиции от ишемии/реперфузии.

«Кетоновые тела», как используют здесь, относится к β -гидроксибутирату или ацетоацетату (или физиологически приемлемым солям β -гидроксибутирата или ацетоацетата). Кетоновые тела представляют собой природные вещества,

25 образуемые в результате распада жирных кислот и используемые тканями в качестве источника энергии. Ацетоацетат образуется из ацетил CoA, и β -гидроксибутират образуется путем обратимого восстановления ацетоацетата. Физиологически соотношение гидроксибутирата к ацетоацетату зависит от соотношения NADH/NAD^+

30 внутри клетки. Как используют здесь в отношении защиты от ишемии/реперфузии, термин «кетоновые тела» относится к β -гидроксимасляной кислоте или ее фармацевтически приемлемой соли или ацетоуксусной кислоте или ее фармацевтически приемлемой соли или любым их комбинациям. Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к солям, которые обладают

35 профилями токсичности в диапазоне, который предусматривает применение в фармацевтических заявках. Если отчетливо не указано иначе, ссылку в спецификации на β -гидроксибутират или ацетоацетат следует понимать как охватывающие солевые формы соединения, вне зависимости от четкой обозначенности этого.

Подходящие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли можно

40 получить при помощи неорганической кислоты или органической кислоты. Примеры неорганических кислот включают соляную, бромистоводородную, йодистоводородную, азотную, карбоновую, серную и фосфорную кислоты. Соответствующие органические кислоты можно выбрать из алифатического,

45 циклоалифатического, ароматического, арилифатического, гетероциклического, карбонового и сульфонового классов органических кислот, примеры которых включают муравьиную, уксусную, пропионовую, янтарную, гликолиевую, глюконовую, молочную, яблочную, виннокаменную, лимонную, аскорбиновую,

50 глюконовую, малеиновую, фумаровую, пировиноградную, аспарагиновую, глутаминовую, бензойную, аминокислотную, 4-гидроксibenзойную, фенилуксусную, миндальную, эмбоновую (памовую), метансульфоновую, этансульфоновую, бензолсульфоновую, пантотеновую, трифторметансульфоновую, 2-

гидроксиэтансульфоновую, р-толуолсульфоновую, сульфаниловую, циклогексиламиносульфоновую, стеариновую, альгиновую, β-гидроксимасляную, салициловую, галактаровую и галактуроновую кислоту.

Подходящие фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли включают, например, соли металлов, включая соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов и металлов переходной валентности, такие как, например, соли кальция, магния, калия, натрия и цинка.

Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли могут также включать органические соли, полученные из основных аминов, таких как, например, N,N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, меглюмин (N-метилглюкамин) и прокаин.

Каждую из этих солей можно получить общепринятыми способами из β-гидроксibuтирата или ацетоацетата путем реакции, например, соответствующей кислоты или основания с β-гидроксibuтиратом или ацетоацетатом.

Предпочтительно соли находятся в кристаллическом виде и предпочтительно готовятся путем кристаллизации соли из приемлемого растворителя. Специалистам в данной области должно быть известно, как получать и выделять приемлемые солевые формы, например, как описано в *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* By P. H. Stahl and C. G. Wermuth (Wiley- VCH 2002).

Соль β-гидроксимасляной кислоты и/или ацетоуксусной кислоты обычно является предпочтительной в защитной композиции от ишемии/реперфузии, поскольку композиция должна быть ближе к физиологически приемлемому pH, чем при использовании кислоты. Приемлемая соль β-гидроксимасляной кислоты для использования в защитной композиции от ишемии/реперфузии представляет собой натриевую соль D-β-гидроксibuтирата (т.е. Na-D-β гидроксibuтират). D-β-гидроксимасляную кислоту и ацетоуксусную кислоту (или их фармацевтически приемлемые соли) можно приобрести коммерчески от ряда компаний, таких как, например, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Следует отметить, что 'D'-стереоизомер β-гидроксibuтирата, временами называемый 'R'-стереоизомером, является предпочтительным в описанной защитной композиции от ишемии/реперфузии, в противоположность 'L'-стереоизомеру.

Мелатонин (5-метокси-N-ацетилтриптамин) представляет собой гормон, который в природе синтезируется из аминокислоты триптофана посредством синтеза из серотонина, и хорошо известен по его вовлечению в циркадианный ритм (особенности сна-бодрствования). Мелатонин действует как антиоксидант широкого спектра и проявляет рецептор-независимую активность удалять свободные радикалы. Способность мелатонина удалять свободные радикалы распространяется на его вторичные, третичные и четвертичные метаболиты, так что взаимодействие мелатонина с реакционноспособными видами кислорода и азота является длительным процессом каскадного типа, в который вовлечены многие из его метаболитов. Таким образом, метаболиты, ближайшие предшественники или аналоги мелатонина (или их комбинации) можно использовать в защитной композиции от ишемии/реперфузии, как описано здесь. Характерные метаболиты мелатонина включают, например, 6-гидроксимелатонин (6-HMEL), 6-сульфатоксимелатонин (aMT6s), N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамин (AFMK), N¹-ацетил-S-метоксикинурамин (AMK), и 3-гидроксимелатонин (3-HMEL); характерные ближайшие предшественники мелатонина включают, например, N-ацетилсеротонин, 5-гидрокситриптамин, 5-гидрокситриптофан или L-триптофан; и

характерные аналоги мелатонина включают, например, 2-хлормелатонин, 6-фтормелатонин, 6-хлормелатонин, 6-гидроксимелатонин, N-изобутаноил-5-метокситриптамин, N-валероил-5-метокситриптамин, 6-метоксимелатонин, 5-метил-N-ацетилтриптамин, 5-бензоил-N-ацетилтриптамин, O-ацетил-5-метокситриптамин, N-ацетилтриптамин, N-ацетил-5-гидрокситриптамин и 5-метокситриптамин. Несмотря на отсутствие связи путем какого-либо конкретного механизма, мелатонин, метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги или функционально сходные малые молекулы могут оказывать свои эффекты через посредство рецептор-обусловленного пути (например, через мелатониновый рецептор 1A (MTNR1A) или мелатониновый рецептор 1B (MTNR1B)), через это содействуя описанной защите от ишемии/реперфузии. Как показано здесь, ссылку в спецификации на мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги следует понимать так, что включены солевые формы, если не указано особо.

В дополнение к или вместо мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов защитная композиция от ишемии/реперфузии может включать один или более других антиоксидантов. Характерные антиоксиданты включают, без ограничения, ресвератрол, витамин А, аскорбиновую кислоту (витамин С), α -токоферол (витамин Е), глутатион, β -каротин, ликопен и/или 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-N-оксил (TEMPOTM). Далее, поскольку мелатонин представляет собой антиоксидант - производное триптофана, производные других аминокислот, которые обладают антиоксидантной активностью (например, цистеин, например, (R)-2-ацетамидо-3-меркаптопропионовая кислота (N-ацетилцистеин) или синтетическое производное цистеина, 2-[(2-метил-2-сульфонилпропаноил)амино]-3-сульфонилпропионовая кислота (Bucillamine)), также могут подходить для использования в защитных композициях от ишемии/реперфузии.

Описанную защитную композицию от ишемии/реперфузии можно составить, например, в виде жидкости, которая готова к использованию, или в виде сухого порошка, который необходимо развести или ресуспендировать перед использованием. При составлении в качестве сухого порошка защитная композиция от ишемии/реперфузии может иметь любое количество в диапазоне от менее чем одного моля до 1×10^7 молей или более кетонных тел на каждый моль мелатонина или метаболита мелатонина, предшественника или аналога мелатонина (например, (0,67-10000000): 1). Соотношение кетонных тел к мелатонину от около 100 до около 1 представлено здесь в качестве примера, однако защитная композиция от ишемии/реперфузии может содержать больше или меньше кетонных тел или больше или меньше мелатонина (или метаболита, предшественника или аналога мелатонина). Характерные молярные соотношения кетонных тел к мелатонину или метаболиту мелатонина, предшественнику или аналогу в защитной композиции от ишемии/реперфузии могут составлять, например, соотношение около 1:1, 5:1, 10:1, 25:1, 50:1, 100:1, 200:1, 500:1, 800:1, 1000:1, 2000:1, 4000:1, 6000:1, 8000:1, 10000:1, 50000:1, 75000:1, 100000:1, 250000:1, 500000:1, 750000:1, 1×10^6 :1, $1,13 \times 10^6$:1, $1,27 \times 10^6$:1, $1,35 \times 10^6$:1, $1,44 \times 10^6$:1, $1,5 \times 10^6$:1, $1,62 \times 10^6$:1, $1,76 \times 10^6$:1, $1,89 \times 10^6$:1, $1,97 \times 10^6$:1, $2,11 \times 10^6$:1, $2,33 \times 10^6$:1, $2,5 \times 10^6$:1, $3,5 \times 10^6$:1, $4,2 \times 10^6$:1, $5,4 \times 10^6$:1, $6,7 \times 10^6$:1, $7,3 \times 10^6$:1, $8,8 \times 10^6$:1, $9,1 \times 10^6$:1, или 1×10^7 :1). Специалист должен понимать, что данные соотношения предназначены просто, чтобы быть образцовыми.

При составлении в качестве жидкости композиция может содержать от около 0,1 М до около 8 М кетонных тел (например, от около 0,4 М до 0,5 М, от 0,4 М до 0,6

М, от 0,4 М до 0,8 М, от 0,6 М до 0,8 М, от 0,5 М до 0,9 М, от 0,5 М до 1 М, от 0,8 М до 1,3 М, от 1 М до 2 М, от 0,5 М до 8 М, от 1 М до 8 М, от 2 М до 8 М, от 3 М до 8 М, от 0,1 М до 7,5 М, от 0,1 М до 7 М, от 0,1 М до 6 М, от 0,1 М до 5 М, от 0,5 М до 7,5 М, от 1 М до 7 М, от 2 М до 6 М, от 3 М до 5 М, от 3,5 М до 4,5 М или около 3 М, 4 М или 5 М кетонových тел) и от около 4 нМ до около 150 мМ мелатонина или метаболита мелатонина, предшественника или аналога мелатонина (например, от около 4 нМ до 50 нМ, от 4 нМ до 100 нМ, от 4 нМ до 200 нМ, от 4 нМ до 0,4 мкМ, от 50 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 0,4 мкМ, от 0,4 мкМ до 8 мкМ, от 0,4 мкМ до 40 мкМ, от 0,4 мкМ до 100 мкМ, от 0,4 мкМ до 500 мкМ, от 0,4 мкМ до 1 мМ, от 0,4 мкМ до 50 мМ, от 4 мкМ до 50 мкМ, от 4 мкМ до 200 мкМ, от 4 мкМ до 500 мкМ, от 4 мкМ до 1 мМ, от 4 мкМ до 50 мМ, от 4 мкМ до 100 мМ, от 8 мкМ до 50 мкМ, от 8 мкМ до 250 мкМ, от 20 мкМ до 2 мМ, от 200 мкМ до 500 мкМ, от 500 мкМ до 2 мМ, от 2 мМ до 4 мМ, от 2 мМ до 50 мМ, от 4 мМ до 6 мМ, от 4 мМ до 7 мМ, от 4 мМ до 9 мМ, от 4 мМ до 125 мМ, от 4 мМ до 100 мМ, от 4 мМ до 75 мМ, от 4 мМ до 50 мМ, от 5 мМ до 10 мМ, от 5 мМ до 11 мМ, от 6 мМ до 9 мМ, от 8 мМ до 15 мМ, от 10 мМ до 25 мМ, от 10 мМ до 150 мМ, от 20 мМ до 150 мМ, от 25 мМ до 150 мМ, от 30 мМ до 150 мМ, от 35 мМ до 150 мМ, от 40 мМ до 150 мМ, от 10 мМ до 130 мМ, от 12,5 мМ до 120 мМ, от 15 мМ до 110 мМ, от 20 мМ до 100 мМ, от 25 мМ до 80 мМ, от 30 мМ до 50 мМ, от 40 мМ до 45 мМ, от 0,5 мкМ до 125 мМ, от 1 мкМ до 100 мМ, от 150 мкМ до 150 мМ, от 200 мкМ до 2 мМ, от 500 мкМ до 100 мМ, от 800 мкМ до 150 мМ или от 750 мкМ до 125 мМ мелатонина или метаболита мелатонина, предшественника или аналога мелатонина). Концентрация каждого компонента должна быть ниже точки насыщения растворителя, такой, чтобы не происходила преципитация, хотя концентрация каждого компонента может быть относительно высокой, поскольку токсичность кетонových тел и мелатонина является низкой. Конечная концентрация каждого компонента в защитной композиции от ишемии/реперфузии будет зависеть от нескольких факторов, включая желаемую концентрацию каждого компонента в крови и объем введения.

Любое число растворителей можно использовать в жидкой защитной композиции от ишемии/реперфузии или для растворения или повторного суспендирования сухого порошкового состава защитной композиции от ишемии/реперфузии. Поскольку кетонových тела легко растворимы в воде, стерильную дистиллированную воду можно использовать в качестве первичного растворителя. Поскольку мелатонин является более гидрофобным, солюбилизатор (например, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 24%, менее чем 23%, менее чем 22%, менее чем 21%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 8%, менее чем 6%, менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2% или менее чем 1% конечного объема), такой как диметилсульфоксид (ДМСО) или другой неполярный растворитель, можно использовать для растворения мелатонина. Кроме использования в качестве солюбилизатора, ДМСО также может действовать как поглотитель радикалов гидроксила (Paller et al., 1985, J. Lab. Clin. Med., 105(4):459-63). Этанол (EtOH) также можно использовать в качестве солюбилизатора для мелатонина, однако требуются более высокие концентрации, и поэтому он может быть менее желателен, несмотря на возможность использования при определенных обстоятельствах. Дополнительные растворители, которые можно использовать, включают, например, метилсульфонилметан (MSM или диметилсульфон) и диметилформамид (DMF).

Защитная композиция от ишемии/реперфузии, которая хранится в течение любого

количества времени в качестве жидкости, также может включать один или более стабилизаторов, таких как органические сахара, сахарные спирты или сахараиды, аминокислоты, и низкомолекулярные полипептиды или белки (например,

сывороточный альбумин или иммуноглобулины) для предотвращения деградации активных компонентов и пролонгирования срока годности жидкой композиции. Например, CAPTISOL[®] (Cydex, Inc., Lenexa, KS) представляет собой характерное соединение (т.е. модифицированный циклодекстрин), который можно использовать для улучшения растворимости, стабильности и биологической доступности фармацевтических композиций. Кроме того, кетоновые тела или мелатонин (или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина) или и то и другое можно ковалентно присоединить к олигомерам, таким как короткие, амфифильные олигомеры, которые обеспечивают возможность орального введения или улучшают фармакокинетический или фармакодинамический профиль кетоновых тел и/или мелатонина (или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина). Олигомеры могут включать водорастворимый полиэтиленгликоль (ПЭГ) и/или жирорастворимые алкилы (короткоцепочечные полимеры жирных кислот). См. например, WO 2004/047871.

Как правило, описанные здесь защитные композиции от ишемии/реперфузии, по существу, свободны от неорганических анионов. Неорганические анионы включают, например, флюорид, хлорид, бромид, нитрит, нитрат, ортофосфат и сульфат. Обычно «по существу свободный» относится к количеству неорганических анионов, которых менее чем около 10 мМ (например, менее чем около 5 мМ, 1 мМ, 0,5 мМ, 0,1 мМ, 0,05 мМ, 0,01 мМ или 0,001 мМ).

В случае необходимости в зависимости от того, используется кислота или соль, перед применением жидкой композиции может требоваться корректирование pH. В этом случае можно использовать соответствующую кислоту (например, HCl) или соль (например, NaOH) для приведения pH к физиологически приемлемому диапазону (например, pH от около 7,2 до около 7,6; например, pH около 7,4). В таких случаях количество кислоты или соли, добавленной для достижения приемлемого pH, полагают достаточно малым, чтобы композиция по-прежнему считалась по существу свободной от неорганических анионов. Дополнительно к или альтернативно доведению pH композиции жидкую защитную композицию от ишемии/реперфузии можно фильтровать, например, для стерилизации композиции и/или для удаления любых нерастворенных кристаллов в композиции перед применением.

Несмотря на то что защитная композиция от ишемии/реперфузии, просто содержащая одно или более кетоновых тел и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина, функционирует нормально, защитная композиция от ишемии/реперфузии также может содержать одно или более терапевтических соединений. Терапевтические соединения включают, в качестве не ограничивающих примеров, антибиотики или противобактериальные средства (например, цефалоспорины (например, Ceftriaxone), тетрациклины (например, миноциклин) или другие β-лактамы, в частности такие, которые оказывают нейрозащитное действие, а также диаминодифенилсульфон (Dapsone или D-пеницилламин), анальгетики, свободные жирные кислоты, гормоны, метаболиты и молекулы обмена веществ. Кроме того, терапевтические соединения включают соединения, которые изменяют клеточный метаболизм, такие как, без ограничения, полипептиды, молекулы антисмысловых РНК или сиРНК, лекарственные средства, и

малые молекулы, направленные на одну или более соответствующих мишеней. Защитная композиция от ишемии/реперфузии также может включать один или более компонентов, которые могут действовать как метаболические субстраты, такие как, без ограничения, глюкоза, ацетат или пируват.

Способы применения защитных композиций от ишемии/реперфузии

Кетоновые тела и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина можно использовать для лечения тканей, органов или индивидуума, который испытывает, рискует подвергнуться или подвергся ишемическому повреждению/реперфузионному нарушению. Ишемическое повреждение/реперфузионное нарушение может быть результатом ряда различных травм. Например, ишемическое повреждение/реперфузионное нарушение может иметь место у индивидуума, который испытывает или подвергался кровопотере, индивидуума, который подвергся или подвергается риску получения апоплектического удара, или индивидуума, которому предстоит хирургическое вмешательство или который подвергается хирургическому вмешательству.

Ишемическое повреждение может иметь место в тканях и органах, когда индивидуум теряет кровь и ткани, и органы не достаточно насыщаются кислородом, а реперфузионное нарушение может иметь место, когда поток крови возобновляется или индивидууму впоследствии переливают кровь, и ткани и органы заново насыщаются кислородом. Потеря крови, как упоминается здесь, может быть обусловлена, например, обширным геморрагическим событием (например, внезапная или быстрая потеря значительного количества крови). Обширные геморрагические события включают, без ограничения, потерю конечности, перелом длинной кости, разрыв артерии или огнестрельное или осколочное ранение. Обширные геморрагические события также включают события закрытых травм, которые могут приводить, например, к внутреннему кровотечению. Травмы на автодорогах являются основной причиной обширных геморрагических событий. Дополнительные причины обширных геморрагических событий включают, без ограничения, желудочно-кишечные и гинекологические кровотечения и кровотечения при родах.

Обширные геморрагические события также включают геморрагический шок. Основной вклад в шок у пациентов с сильными травмами вносят, без ограничения, уменьшенное усвоение кислорода, такое как потеря воздушной проходимости, ослабленное дыхание, аспирация и повреждение легких; уменьшенный сердечный выброс, такой как гемоторакс или пневмоторакс, тампонада сердца, гиповолемия, предшествующая ишемия сердца, или кардиальное повреждение; потеря сосудистого тонуса, такая как в результате действия экзогенных сосудорасширяющих средств (например, лекарственные средства и спирт), ятрогенных сосудорасширяющих средств (например, анестезирующие и седативные средства, закрытая травма черепа, повреждение спинного мозга, анафилаксия); уменьшенная способность переноса кислорода, такая как анемия или цианистое отравление; капиллярная недостаточность, такая как реперфузионное нарушение, феномен не восстановленного кровотока или нарушение клеточного метаболизма (например, сепсис).

Защитную композицию от ишемии/реперфузии можно вводить в случаях, при которых индивидуум потерял объем крови, по меньшей мере, около 10% (например, по меньшей мере, около 20%, по меньшей мере, около 30%, по меньшей мере, около 40%, по меньшей мере, около 50%, по меньшей мере, около 60% или более).

Следует отметить, что объем крови у взрослых, как полагают, составляет приблизительно 7%-9% от их общей массы тела. Систолическое давление крови около 90 мм рт. ст. или менее (например, около 85 мм рт. ст. или менее, около 80 мм рт. ст. или менее, около 75 мм рт. ст. или менее, около 70 мм рт. ст. или менее, 65 мм рт. ст. или менее, около 60 мм рт. ст. или менее, около 55 мм рт. ст. или менее или около 50 мм рт. ст. или менее), уровни StO_2 ниже 75% (например, ниже 70%, ниже 65%, ниже 60%, ниже 55% или ниже 50%) и уровни дефицита основания больше чем 6 мЭк/л (например, больше чем 6,5 мЭк/л или больше чем 7 мЭк/л) свидетельствуют о значительной потере крови.

Во время потери крови частота пульса индивидуума может возрастать, давление крови может уменьшаться, диурез может уменьшаться, уровни лактата могут возрастать, уровни насыщения ткани кислородом за счет гемоглобина (StO_2) могут уменьшаться, сердечный выброс может уменьшаться, рН ткани может уменьшаться и митохондриальная функция может уменьшаться (что определяют, например, по уровням NADH). Восстановление индивидуума от такой потери крови обычно должно проявляться в реверсии таких симптомов: частота пульса может уменьшаться, давление крови может увеличиваться, диурез может увеличиваться, уровни лактата могут уменьшаться, уровни StO_2 могут увеличиваться, сердечный выброс может увеличиваться, рН ткани может увеличиваться и митохондриальная функция может увеличиваться. Как правило, посредством примера, в основном здоровый индивидуум (например, индивидуум, который не страдает от геморрагического шока) обычно должен иметь частоту пульса менее чем 100 ударов/минуту, систолическое давление крови более чем 100 мм рт.ст., диурез более чем 30 мл/час (или 1 мл/кг/час для детей), уровни лактата менее чем 2,1 мг/децилитр (дл), уровни StO_2 более чем 75% и сердечный индекс 2,5-4,5 литров/мин/м² (область поверхности тела), рН крови 7,35-7,45, тогда как индивидуум, страдающий от геморрагического шока (например, 10%-ая потеря крови или более) может иметь частоту пульса более чем 100 ударов/минуту, систолическое давление крови менее чем 100 мм рт.ст., диурез менее чем 300 мл/час, уровни лактата более чем 2,1 мг/дл, уровни StO_2 менее чем 75%, сердечный индекс менее чем 2,5 л/мин/м² и рН крови менее чем 7,35. Часто серьезность изменений биофизических параметров непосредственно связана с количеством кровопотери, и, таким образом, такие биофизические параметры можно отслеживать у индивидуумов, которые испытывают потерю крови или восстанавливаются от такой потери крови. Введение описанной защитной композиции от ишемии/реперфузии может значительно смягчать реакцию индивидуумов на потерю крови (что проверяют по одному или нескольким описанным здесь биофизическим параметрам, по сравнению с индивидуумом, который подвергается сходному количеству потери крови, но без введения композиции) и/или увеличить скорость, с которой биофизический параметр возвращается к «норме» (т.е. к уровням, обычно наблюдаемым у здоровых индивидуумов).

Ишемическое повреждение/реперфузионное нарушение может возникать в результате, без ограничения, апоплектического удара (например, апоплектического удара в результате закупорки), остановки сердечной деятельности, инфаркта миокарда, сердечного приступа, уменьшения тока артериальной крови или почечной недостаточности. Ишемическое повреждение/реперфузионное нарушение также может возникать в результате хирургического вмешательства, при котором кровообращение и/или приток кислорода нарушен или может быть нарушен.

Определенные хирургические операции, такие как нейрохирургия или хирургия сердца, имеют наибольший риск ишемического повреждения/реперфузионного нарушения, и даже использование приборных средств (например, аппарата «искусственное сердце и легкое») во время хирургического вмешательства не может
 5 полностью предотвратить ишемическое повреждение/реперфузионное нарушение. Описанные защитные композиции от ишемии/реперфузии можно вводить индивидуумам для значительного уменьшения или предотвращения ишемического повреждения/реперфузионного нарушения, которому могут подвергаться ткани и
 10 органы во время или после таких медицинских экстренных случаев (например, тяжелая гипотермия или гипоксия) или процедур (например, хирургические вмешательства).

Одно или более кетоновых тел и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина можно делать растворимыми и вводить
 15 внутривенно для впрыскивания компонентов непосредственно в кровяное русло. Другие способы введения, впрочем, также приемлемы и включают, например, внутрикостное, внутрибрюшинное, оральное, трансбуккальное, ингаляционное или ректальное введение (через посредство, например, суппозитория). Конкретный
 20 состав защитной композиции от ишемии/реперфузии должен соответствовать способу введения, и составы для введения хорошо известны специалистам в данной области. См. например, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 2005, 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins. В зависимости от конкретного состава защитная композиция от ишемии/реперфузии может включать один или более
 25 следующих компонентов: стерильный разбавитель, такой как воду, солевой раствор (например, забуференный фосфатом солевой раствор (PBS)), жирные масла, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), глицерин или другие синтетические растворители; антибактериальные и
 30 противогрибковые средства, такие как парабены, хлорбутанол, фенол, аскорбиновая кислота, тимеросал и т.п.; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты и вещества для регулирования тонуса, такие как хлорид натрия или декстроза.

Оральные композиции обычно включают инертный разбавитель или пищевой носитель и могут представлять собой жидкость или могут быть заключенными в желатиновые капсулы или спрессованными в таблетки. Таблетки, пилюли, капсулы и
 40 т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовую камедь или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза; дезинтегрирующее средство, такое как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, фумаровая кислота или Стеротес; вещество, способствующее скольжению, такое как коллоидный диоксид
 45 кремния; подслащивающее вещество, такое как сахароза или сахарин; или ароматизирующее вещество, такое как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор. Состав оральной защитной композиции от ишемии/реперфузии может включать шипучий компонент, который может
 50 действовать как усилитель проникновения для увеличения абсорбции одного или нескольких ингредиентов. Шипучая таблетка, например, при добавлении в воду образует углекислый газ в результате реакции между кислотой и основанием. Кислота часто представляет собой лимонную кислоту (водную или безводную), но

также может быть виннокаменной, фумаровой, адипиновой или яблочной кислотой. Основание может представлять собой водорастворимый щелочной карбонат, такой как бикарбонат натрия, или карбонат щелочного или щелочноземельного металла, такой как карбонат или бикарбонат калия или кальция, карбонат натрия или

глицинкарбонат натрия.

Кроме того, защитная композиция от ишемии/реперфузии может быть соответствующим образом инкапсулирована (например, в липосомах) и выпускаться в аэрозолируемой или распыляемой форме. См., например, Патенты США No. 5049388, 5141674, 7083572 и 7097827. Распыление уменьшает частицы до размеров, легко выпускаемых из форсунки распылителя, что делает возможным ингаляцию уменьшенных частиц и последующее освобождение инкапсулированного материала в эпителий дыхательных путей, легких и кровяного русла. В определенных случаях кетоновые тела и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина можно инкапсулировать вместе; в других случаях, кетоновые тела и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина можно инкапсулировать отдельно и смешивать при аэролизации или распылении. Липосомы до нескольких микрон в диаметре можно разбить до диаметров менее чем 500 нм, и может быть, значительно меньше, в зависимости от распылителя и других факторов.

Защитную композицию от ишемии/реперфузии можно вводить в виде болюса, например, при помощи службы быстрого реагирования (например, санитар вооруженных сил, младший специалист по оказанию первой медицинской помощи (ЕМТ) или любой другой подготовленный медицинский персонал) индивидууму, испытывающему обширное геморрагическое событие, или удар, или кардиопульмональный шок. Поочередно или дополнительно к введению болюса защитную композицию от ишемии/реперфузии можно вводить путем медленного введения по каплям или инфузии после промежутка времени. Например, медленное добавления по каплям или инфузию можно вводить в участок травмы во время транспортировки в медицинское учреждение, и/или как только индивидуум попадает в медицинское учреждение. Физиологически период времени непосредственно после ранения или травмы является критическим и его иногда называют «золотым часом», однако введение защитной композиции от ишемии/реперфузии индивидууму можно продолжить вплоть до 72 часов или дольше (например, до 1 часа, 2 часов, 4 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 90 часов или более). В качестве альтернативы медленному введению по каплям или инфузии болюс защитной композиции от ишемии/реперфузии можно вводить много раз после, например, 24-, 48- или 72-часового периода времени.

Обычно индивидуум, который пережил обширное геморрагическое событие, должен получить переливание крови при попадании в медицинское учреждение, которое, в зависимости от обстоятельств, может произойти всего через несколько минут после повреждения или может иметь место через несколько часов. В некоторых случаях защитную композицию от ишемии/реперфузии можно вводить индивидууму сразу, как только обнаружатся потенциальные ишемические или реперфузионные нарушения, которые могут возникать после того, как началось переливание крови. Специалист в области должен понимать, что защитную композицию от ишемии/реперфузии можно вводить попутно с переливанием крови или заменой плазмы и в некоторых случаях защитную композицию от ишемии/реперфузии можно непосредственно объединять с кровью или плазмой и

вводить индивидууму.

Использование, например, концентрации около 4 М кетоновых тел и около 43 мМ мелатонина, объема от около 0,3 до около 2 миллилитров (мл; например, от 5 около 0,3 до 0,4 мл, от 0,3 до 0,7 мл, от 0,5 до 1,5 мл, от 0,5 до 1,0 мл, от 0,6 до 0,7 мл, от 0,75 до 2 мл, от 1,0 до 2,0 мл, от 1,5 до 2,0 мл или около 0,5, 0,1 или 1,5 мл) на килограмм (кг) массы индивидуума является эффективным при защите индивидуумов от ишемического повреждения/реперфузионного нарушения по причине сильной потери крови. Этот небольшой объем является особенно полезным при неотложной 10 медицинской помощи в поле или при других случаях, при которых обеспечение или пространство могут быть ограничены. В других случаях, таких как в госпиталях или травмпунктах, впрочем, можно вводить индивидууму больший объем защитной композиции от ишемии/реперфузии (например, 100 мл или более на кг) и соответствующим образом адаптировать концентрации каждого из компонентов.

Как правило, желательно, хотя и не обязательно, чтобы кетоновые тела вводились индивидууму в количестве, достаточном для достижения концентрации в крови, через некоторое время после введения, от около 3 мМ вплоть до около 12 или 15 мМ (например, от около 3 мМ до 10 мМ, от 3 мМ до 7,5 мМ, от 3 мМ до 5 20 мМ, от 3,5 мМ до 10 мМ, от 4 мМ до 10 мМ, от 6 мМ до 10 мМ или около 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, или 9 мМ), и чтобы мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина вводились индивидууму в количестве, достаточном для достижения концентрации в крови, через некоторое время после введения, от около 30 мкМ до около 150 мкМ (например, от около 30 мкМ до 125 25 мкМ, от 30 мкМ до 100 мкМ, от 30 мкМ до 80 мкМ, от 30 мкМ до 60 мкМ, от 30 мкМ до 50 мкМ, от 30 мкМ до 40 мкМ, от 35 мкМ до 150 мкМ, от 40 мкМ до 150 мкМ, от 50 мкМ до 150 мкМ, от 60 мкМ до 150 мкМ, от 70 мкМ до 150 мкМ, от 80 мкМ до 150 мкМ, от 100 мкМ до 150 мкМ, от 35 мкМ до 125 мкМ, от 40 мкМ до 100 30 мкМ, от 50 мкМ до 75 мкМ или от 45 мкМ до 65 мкМ). В некоторых случаях желательно вводить индивидууму много меньшее количество мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина (например, количество, достаточное для достижения концентрации в крови около 1×10^{-10} 35 моль/л, 2×10^{-10} моль/л, 3×10^{-10} моль/л, 4×10^{-10} моль/л, 5×10^{-10} моль/л, 6×10^{-10} моль/л или 7×10^{-10} моль/л). В каждом конкретном случае врач-терапевт может оценить, нужно ли и как долго поддерживать конечные концентрации, например, путем применения последующих введений или посредством использования непрерывной инфузии или других способов. Уровни кетоновых тел и мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина в крови можно определить 40 при помощи общепринятых в данной области способов.

Ишемическое повреждение/реперфузионное нарушение может также иметь место в органах, предназначенных для трансплантации. Одно или более кетоновых тел и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина 45 можно вводить донору органа перед взятием органа. Донор органа может находиться в устойчивом вегетативном состоянии или может быть живым и здоровым и представлять собой подходящую пару реципиенту. Донору органа можно внутривенно вводить кетоновые тела и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина перед изъятием органа(ов) с 50 тем, чтобы тщательно опрыскать орган(ы), тем самым предупреждая или уменьшая ишемическое повреждение этих тканей или органов во время последующей транспортировки и трансплантации реципиенту. Одно или более кетоновых тел и

мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина можно вводить донору органа для достижения концентрации в крови, как описано выше (например, 3-15 М кетоновых тел и 30-150 мкМ мелатонина), или можно вводить для достижения даже более высокой концентрации. Дополнительно или

5 альтернативно введению защитной композиции от ишемии/реперфузии индивидууму один или более изъятых органов можно, например, обрызгивать или пропитывать (например, во время транспортировки) защитной композицией от ишемии/реперфузии.

10 Комбинация одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина может являться высокоэффективной при защите индивидуума от ишемического повреждения и/или реперфузионного нарушения. Например, одно или более кетоновых тел и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина можно

15 вводить индивидууму, который испытал потерю крови, получил удар или кардиопульмональный шок, готовится подвергнуться или подвергается процедуре, такой как хирургическое вмешательство, или является донором органа. Комбинация одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина также может защищать индивидуума,

20 который потерял одну или более пальцев или всю конечность.

Изделия

Описанные защитные композиции от ишемии/реперфузии или их компоненты можно включать в изделие. Изделия, которые включают одно или более кетоновых

25 тела и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина, могут принимать любое число конфигураций, из которых только немногие обсуждаются в описании. Следующие характерные примеры изделий не следует рассматривать в качестве ограничивающих.

30 В одном варианте осуществления изделия жидкий состав одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина предоставлены в IV-упаковке. Смотри, например, Патенты США No. 5098409; 5257985 и 5853388. Защитная композиция от ишемии/реперфузии, предоставленная в IV-упаковке, может поставляться стерильной и готовой к

35 использованию, с соответствующей датой прекращения срока действия, указанной на коробке. Альтернативно сухая порошковая композиция с одним или несколькими кетоновыми телами и мелатонином или метаболитами мелатонина, предшественниками или аналогами мелатонина может быть предоставлена в IV-

40 упаковке, готовая к разведению или повторному суспендированию в соответствующем растворителе.

В другом варианте осуществления изделие может иметь, по меньшей мере, первый и второй флакон и в некоторых случаях третий и четвертый флакон. В зависимости от конфигурации первый флакон может содержать и кетоновые тела, и мелатонин

45 или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина, а второй флакон может содержать растворитель. В альтернативной конфигурации кетоновые тела могут содержаться в первом флаконе, мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина могут содержаться во втором флаконе, тогда как третий флакон может содержать солибилизатор для мелатонина или

50 метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина, а четвертый флакон может содержать растворитель (например, водный растворитель) для растворения или повторного суспендирования кетоновых тел. В определенных

вариантах осуществления изделия, имеющего более чем один флакон, жидкие части можно контролируемым образом приводить в соприкосновение с компонентами или частями композиции. «Контролируемым образом приводить в соприкосновение»
 5 относится к способности пользователя быстро определить, когда жидкую часть объединять с сухой порошковой частью, посредством структурных особенностей структуры изделия, которые способствуют такому контролируемому контактированию. Такие структурные особенности могут включать, например, разрушаемые или прокалываемые прокладки или перегородки.

10 В другом варианте осуществления одно или более кетоновых тел и мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или аналоги мелатонина можно предоставить внутри цилиндра шприца. Защитная композиция от ишемии/реперфузии в цилиндре шприца может быть предоставлена уже в виде суспензии, предоставлена в форме сухого порошка для ресуспендирования перед
 15 использованием или предоставлена в форме сухого порошка с цилиндром шприца, также содержащим растворитель или растворители для ресуспендирования сухого порошка или его компонентов. Изделие для дозирования защитной композиции от ишемии/реперфузии может представлять собой автоматическое устройство, которое
 20 делает возможным введение необходимых доз (например, на основании массы индивидуумов или приблизительной массы) защитной композиции.

В определенных случаях раствор, содержащий одно или более кетоновых тел, и раствор, содержащий мелатонин или метаболиты мелатонина, предшественники или
 25 аналоги мелатонина, можно смешивать перед введением, так что индивидуум получает оба компонента в единой композиции. В других случаях одно или более кетоновых тел можно вводить индивидууму с последующим или с предшествующим (раздельным) введением мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина. При условии, что мелатонин и
 30 кетоновые тела могут обладать различными временами полужизни, в некоторых вариантах осуществления два компонента можно первоначально вводить вместе в единой композиции с последующим введением одного компонента (например, мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина) несколько чаще, чем введение другого компонента (например,
 35 кетоновых тел).

Изделие обычно включает упаковочный материал дополнительно к кетоновым телам и мелатонину или метаболитам мелатонина, предшественникам или аналогам мелатонина. Упаковочный материал может включать этикетку или листок-вкладыш
 40 в упаковке, которые содержат инструкции для лечения индивидуума, который испытывает или испытал потерю крови, индивидуума, который получил удар или кардиопульмональный шок или рискует получить удар или кардиопульмональный шок, индивидуума, которому предстоит подвергнуться или который подвергается хирургическому вмешательству, или индивидуума, который близок к тому, чтобы
 45 пожертвовать орган или ткань.

Предпочтительно составлять защитные композиции от ишемии/реперфузии в форме дозовой единицы для облегчения введения и единообразия дозировок. Форма дозовой единицы, как используется здесь, относится к физически разделенным
 50 единицам, пригодным в качестве однократных дозировок для введения индивидууму, причем каждая единица содержит предопределенное количество защитной композиции от ишемии/реперфузии для получения желаемого терапевтического эффекта. Форма дозовой единицы композиции, по изобретению, обычно зависит,

например, от желаемой концентрации кетоновых тел и мелатонина или метаболитов мелатонина, предшественников или аналогов мелатонина в крови индивидуума и массы индивидуума.

В соответствии с настоящим изобретением возможно применение общепринятых микробиологических, биохимических и биофизиологических методик в пределах компетентности в данной области. Такие методики полностью объяснены в литературе. Изобретение в дальнейшем будет охарактеризовано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в пунктах формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Метаболизм глюкозы и D-β-гидроксибутирата в мозге и сердце находящихся в зимней спячке и активных земляных белок

Цель

Транспорт и метаболизм D-β-гидроксибутирата (ВНВ) в мозге активных и находящихся в спячке земляных белок определяли путем проведения инфузии [2,4-¹³C₂]-ВНВ (Фигура 2) с последующим детектированием ¹³C-меченого ВНВ и метаболитов в мозге.

Полной стратегией этих экспериментов являлось измерение включения изотопа от инфузии ¹³C-ВНВ в пул ¹³C-ВНВ мозга и в метаболиты-производные цикла трикарбоновых кислот (ТСА), такие как глутамат, глутамин и аспартат. Такие же эксперименты проводили параллельно с использованием [1-¹³C₂]-глюкозы (Фигура 1). Количественный анализ транспорта ВНВ из крови в мозг и скорость расходования (по сравнению с расходованием глюкозы) определяли у находящихся в спячке земляных белок при эвтермических температурах и у находящихся в спячке земляных белок при 4-6°C.

Животные

Земляных белок анестезировали (изофлуран) перед помещением в магнит магнитно-резонансного (MR) аппарата и вскрывали ¹³C-ВНВ или [1-¹³C₂]-глюкозу.

Анализ метаболитов мозга в экстрактах ткани

После завершения экспериментов с ¹³C животных умерщвляли с использованием туннельного замораживания мозга в жидком азоте, в то же время животные все еще были полностью анестезированы. Замороженный мозг извлекали из черепа при -25°C и растирали в жидком азоте с использованием ступки. Экстракты мозга хлорной кислотой анализировали с использованием ЯМР с высокой разрешающей способностью при 14 Тесла (600 МГц) в Университете Миннесоты.

Результаты и интерпретация

Было отмечено, что скорости мечения у находящихся в спячке белок были очень медленными, и требовалась минимальная температура тела приблизительно в 12-16°C.

Для проверки гипотезы о том, что кетоновые тела предпочтительно используются во время состояния спячки, был осуществлен ЯМР в поле высокой напряженности экстрактов мозга находящихся в спячке земляных белок, которым впрыснули либо 1 мл 1 М ¹³C-меченого рацемически чистого D-β-гидроксибутирата (¹³C-D-ВНВ), либо 1 мл 1 М ¹³C-глюкозы. Фигура 3 демонстрирует относительные уровни поглощения глюкозы в мозге. Результаты наглядно показали, что D-β-гидроксибутират представляет собой лучший субстрат, чем глюкоза, и не приводит к

образованию значительного количества лактата.

Фигура 4 демонстрирует, что ^{13}C -D-BHB и ^{13}C -глюкоза эффективно транспортировались в сердце во время состояния спячки и что существовало различие в эффективности использования и включения каждого из источников энергии в метаболиты. У животных с инъекцией BHB метаболитические промежуточные соединения, образуемые в цикле трикарбоновых кислот, вырабатывались при низкой температуре тела (T_b). Фигура 4А демонстрирует, что уровни глутамата (меченый по углероду #4; Глутамат C4) в сердце были очень высокими со многими мультиплетами, что говорит об утилизации субстрата глутамата, а также об образовании глутамата и глутамина C3 и C2.

У животных, которым вводили глюкозу, большинство ^{13}C -глюкозы поступало в сердце, однако в процессе обмена веществ не превращалось на таком высоком уровне, как превращался D-BHB (Фигура 4В). Уровни промежуточных соединений цикла трикарбоновых кислот, таких как Глутамат C4 и других, совсем не наблюдали, и количества, которые образовывались, были очень маленькими без мультиплетов, даже когда земляная белка обладала нормотермической T_b в $35,3^\circ\text{C}$ во время умерщвления (Фигура 4В). Наиболее впечатляющим результатом, наблюдавшимся после введения меченой глюкозы, являлся очень большой всплеск в лактате. Эти результаты показывают, что глюкоза не использовалась так эффективно, как BHB, и подавляющее большинство метаболизированной глюкозы было преобразовано в лактат вместо включения в цикл трикарбоновых.

Пример 2 - Экспрессия транспортеров кетонных тел и кетолитических ферментов в мозге и сердце

Цель

Мозг как активных, так и находящихся в спячке земляных белок, и контрольных и кетонемичных крыс анализировали на транспортеры монокарбоновой кислоты MCT1 и MCT2 и на глюкозный транспортер 1 (GLUT1) при помощи иммуноцитохимии и Вестерн-блотов. В этих экспериментах исследовали, коррелируют ли изменения в локализации и экспрессии этих транспортеров с различиями в метаболическом состоянии животных (активных по сравнению с находящимися в спячке; контрольные по сравнению с кетонемичными).

Определение MCT1 и MCT2 мозга при помощи Вестерн-блота.

Белок из мозга находящихся в спячке и не находящихся в спячке животных анализировали при помощи Вестерн-блота для количественного определения того, действительно ли различные формы MCT дифференциально экспрессируются с учетом времени года и состояния активности животного. Активных ($N=5$) и находящихся в спячке ($N=5$) земляных белок умерщвляли и их мозг немедленно удаляли. Мозг разделяли на головную часть мозга и стволную область мозга и немедленно замораживали в жидком азоте. Мембранные белки мозга получали путем гомогенизации ткани с последующим центрифугированием для сбора осадка мембран.

MCT1, как известно, обнаруживается в мембранах эндотелиальных клеток и значительно сильнее экспрессируется у животных, испытывающих кетонемию от рациона с высоким содержанием жира. MCT1 также обнаруживается в эпителиальной ткани хориоидного сплетения и в глиальных граничных мембранах. MCT2 был впервые описан как мембранный транспортер, имеющийся в избытке в ножках отростков астроцитов и других глиальных клетках, и недавнее свидетельство позволяет предположить, что MCT2 также может значительно экспрессироваться в

нейронах.

Куриную поликлональную антисыворотку, полученную против карбоксильного конца МСТ1, которая, как было показано, дает перекрестную реакцию с белком земляных белок того же размера, что и МСТ1 крысы, использовали для определения изменений в количестве МСТ1 у земляных белок. Аналогично поликлональную антисыворотку кролика, полученную против карбоксильного конца МСТ2, которая, как было показано, дает перекрестную реакцию с белком земляных белок того же размера, что и МСТ2 крысы, использовали для определения изменений в количестве МСТ2 у земляных белок.

Иммунохимический анализ для определения клеточной локализации МСТ1, МСТ2 и GLUT1

Крыс и земляных белок анестезировали 5% галотаном перед пункционной перфузией сердца формаль-уксусным фиксативом (4% формальдегид, 2% уксусная кислота). Время перфузии составляло 12 мин, и ткани хранили при 4°C в фиксативе в течение ночи перед обработкой. Срезы ткани забивали забуференным фосфатом солевым раствором (PBS), содержащим 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 1,5% нормальной сыворотки козла. Первые антитела разводили 1:1200 в 0,1% BSA и использовали для прокрашивания срезов в течение 1 часа при комнатной температуре. Срезы затем инкубировали 30 мин с биотинилированными IgG козы против мыши (5 мкг/мл в забивочном растворе) и 30 мин с реагентом авидин-биотин-пероксидазного комплекса (ABC) (оба реагента от Vector Laboratories, Burlingame, CA). Развитие цвета происходило от 1 до 6 мин в 0,6 г/мл 3,3'-диаминобензидине (Sigma).

Те же препараты антител (МСТ1 и МСТ2), которые использовали для окраски описанных выше Вестерн-блотов, использовали для определения клеточной локализации внутри мозга. Особый интерес представляло относительное количество и распределение активных в сравнении с находящимися в спячке земляными белками. Локализацию МСТ1, МСТ2 и GLUT1 исследовали в коре головного мозга, гиппокампе и мозжечке мозга активной и находящейся в спячке земляной белки. Эти эксперименты были сфокусированы на данных участках мозга для установления того, действительно ли или нет эти МСТ-изоформы и GLUT1 предпочтительно экспрессируются в эндотелиальных клетках, астроцитах и/или нейронах. Известно, что гиппокамп, в частности, чувствителен к гипоксии. Световую микроскопию проводили в соответствии с Gerhart et al. (1997, *Am. J. Physiol.*, 273:E207- 213).

Результаты и интерпретация

Фигура 5 демонстрирует результаты иммуноцитохимического анализа МСТ1 и глюкозного транспортера (GLUT1) в мозге крысы и земляной белки. Фигура 6 демонстрирует сезонные изменения экспрессии МСТ1 в мозге земляной белки на основании данных иммуноцитохимии и свидетельствует о таких повышенных уровнях МСТ1 в гемэнцефалическом барьере во время состояния спячки. Фигура 7 демонстрирует повышенные уровни МСТ1 в сосудах находящихся в спячке животных на основании оптической плотности МСТ1. Фигура 8 демонстрирует 2-мерные гели сердца активных и находящихся в спячке земляных белок. 2-мерные белковые гели показывают, что сукцинил-СоА трансфераза (SCOT), лимитирующая стадия в метаболизме кетоновых тел, увеличивается в 6 раз у находящихся в спячке животных. На основании этих результатов уровни кетонового транспортера, МСТ1, увеличиваются в мозге во время зимней спячки, и сходное увеличение наблюдается для SCOT в сердце находящихся в спячке животных.

Пример 3 - Защита мелких млекопитающих от значительной потери кровиЦель

Крыс с введенными кетоновыми телами подвергали 60%-ой потере крови в течение, по меньшей мере, 1 часа, с последующим возвращением пролитой крови.

Ключевыми показателями нейропротективного действия являлся количественный анализ нейронального выживания и апоптоза в коре головного мозга, гиппокампе и мозжечке, а также проверочные оценки неврологической функции. Целью являлось определение эффективности D-формы β -гидроксibuтирата (D-BHB) вместе с мелатонином в защите мозга от ишемии и обеспечения защиты от реперфузионного нарушения после возобновления кровоснабжения.

Целью последующих экспериментов было поддержание 60%-ой потери крови в течение, по меньшей мере, трех часов с использованием минимального количества жидкость для того, чтобы поддержать жизнеспособность. Шестидесятипроцентная потеря крови была рассчитана при помощи уравнения: $\text{Общий объем крови} = \text{Масса тела животного} \times 0,06$. Болюс защитной композиции от ишемии/реперфузии объемом 1 мл на килограмм массы тела животного давали животным после приблизительно 40%-ной потери крови. Некоторые животные получали только 1 мл болюса/кг, тогда как другие животные получали медленную инфузию (100 мкл/час) для имитации внутривенного введения по каплям раствора после того, как был дан болюс.

Животные

Самцов крыс Sprague-Dawley (280-350 г) получали от Harland Teklad (Madison, WI) и давали им возможность акклиматизироваться в течение, по меньшей мере, семи дней перед хирургической подготовкой. Всех животных кормили стандартной лабораторной пищей и обеспечивали водой без ограничения вплоть до дня проведения исследования. Уход и обращение с животными были утверждены Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) университета Миннесота.

Хирургическая подготовка

Животные в течение короткого периода были анестезированы изофлураном в составе воздуха для дыхания, после чего делали внутримышечную инъекцию смеси кетамин/ксилазин (100/20 мг/кг) для анестезии. Левую бедренную артерию асептически отделяли и катетеризировали полиэтиленовым (PE-50) тубингом (0,023 ID, 0,038 OD), содержащим гепаринизированный солевой раствор (10 единиц/мл). Катетер прикрепляли к датчику давления для постоянного контроля среднего артериального давления крови (МАВР) и частоты пульса (HR) (Powerlab, AD Instruments, Hastings, UK). Правую бедренную артерию сходным образом катетеризировали для облегчения забора крови и взятия образцов.

Как только крысы были полностью анестезированы и стабилизированы в течение 20-минутного периода, начинали потерю крови. При приблизительно 40%-ной потере крови 1 мл 4М D-BHB или 4М NaCl /кг массы тела вводили в катетеризованную левую бедренную вену. После инфузии болюса 4М D-BHB или 4М NaCl медленно вводили животному со скоростью 100 мкл/час. Температуру отслеживали по ректальным замерам. Животных поддерживали под анестезией в течение всего эксперимента с использованием смеси кетамин/ксилазин. Эксперимент наступал после 20-минутного периода успокоения по мере отслеживания МАВР, HR и температуры. Гибель животного регистрировали, когда давление крови, дыхание и прекардиальная пульсация прекращались (смотри Фигуру 9 по оси времени). Крыс

умерщвляли через три дня после возвращения пролитой крови.

Растворы

4M D-BHB: к 0,5 г D-β-гидроксипирутата добавляли дистиллированную воду до 1 мл. Этот раствор стерилизовали фильтрацией путем его пропускания через 0,2-микроновый фильтр (Acrodisc Syringe Filter, PALL).

4M NaCl: к 0,233 г хлорида натрия добавляли дистиллированную воду до 1 мл. Этот раствор стерилизовали фильтрацией путем его пропускания через 0,2-микроновый фильтр (Acrodisc Syringe Filter, PALL).

Мелатонин/ДМСО: 100 мг мелатонина добавляли в 0,6-мл микроцентрифужную пробирку. ДМСО (>99% чистоты) добавляли до 200 мкл. Раствор встряхивали и отмеривали пипеткой по 6 мкл в 1,5-мл микроцентрифужные пробирки. Пробирки замораживали (-20°C) до момента использования и выбрасывали через 1 неделю.

Инфузионный раствор: одну из пробирок с 6 мкл стока мелатонин/ДМСО открывали и добавляли 294 мкл 4M D-BHB или NaCl. Пробирки осторожно перемешивали для обеспечения смешивания. Инфузионный раствор готовили за минуты перед введением животному. Оставшийся раствор при отсутствии использования выбрасывали.

Пробы сыворотки крови

Образцы крови, взятые через правую бедренную артерию во время определенных временных точек (смотри Фигуру 9) центрифугировали при 3500 об/мин в течение пяти минут. Сыворотку, собранную во временных точках, отбирали из пробирок и отмеривали пипеткой объемами в двадцать микролитров. Эти аликвоты сыворотки замораживали при -80°C для длительного хранения. Уровни β-гидроксипирутата и глюкозы определяли по образцам сыворотки путем спектрофотометрии (Multiskan) с использованием Liquicolor test kits (Stanbio Laboratories). Образцы анализировали в трех повторностях для того, чтобы уменьшить ошибку отмеривания пипеткой.

Анализ ишемияиндуцированного повреждения ткани, являющегося следствием геморрагического шока

Мозг крыс, фиксированных путем трансардиальной перфузии, заливали парафином, и коронарные срезы мозга толщиной 10 мкм из участка переднего гиппокампа помещали на покрытые поли-L-лизинном стеклянные слайды. Для определения областей поврежденной ткани и количественного определения, в выбранном поле зрения, выживших и апоптических нейронов в определенных участках мозга были использованы три гистологические методики.

Были подготовлены окрашенные Nissl (крезиловым фиолетовым) и гематоксилиномом и эозином (H&E) срезы, чтобы отличить поврежденные ишемией области от неповрежденных областей срезов ткани мозга. Нейрональное повреждение в гиппокампальных областях CA1, CA2, CA3 и в зубчатой извилине количественно оценивали путем определения количества клеток. Кроме того, области общего цитотоксического повреждения в коре головного мозга и таламусе относительно общих областей этих районов мозга определяли в трех срезах, взятых от каждого мозга (3,7, 4,0, и 4,3 мм от брегма). Микрофотографии поврежденных областей были получены с использованием цифровой микроскопии, и количественное выражение было выполнено с использованием компьютерной программы анализа изображения (например, NIH Image) для идентификации поврежденных и нормальных областей мозга. *t*-тест Стьюдента использовали для статистической оценки результатов.

Для количественного определения гибели нейрональных клеток срезы мозга были

окрашены методом терминального биотинилированного UTP-мечения
никированных концов дезоксинуклеотидилтрансферазой (TUNEL) при помощи
набора для детекции клеточной смерти *in situ* (Boehringer Mannheim, Mannheim,
Germany). TUNEL-положительные нейроны (т.е. клетки, подвергающиеся апоптозу)
двусторонне подсчитывали в выбранных полях зрения в гиппокампе, зубчатой
извилине, коре головного мозга и таламусе с использованием NIH Image.
Впоследствии те же срезы окрашивали 0,5% крезильным фиолетовым для
количественного определения оставшихся в живых нейронов.

Система подсчета неврологических дефектов

Неврологическую функцию животных оценивали на 1 и 3 дни после возвращения
крови при помощи системы подсчета неврологических дефектов (Таблица 1).

Таблица 1

Система подсчета неврологических дефектов для крыс			
Наблюдаемые параметры		Особенности	Подсчет положительных ответов
Общие			
Сознание		Быстро реагирующий	100
Дыхание		60<дыхание<120	100
Черепные нервы			
Обонятельный		Ориентация по запаху	20
Зрительный		Старт-рефлекс на визуальные стимулы	20
Корнеальный рефлекс			
Моргание		Моргание	20
Движение усами			
Самопроизвольный		Самопроизвольный	20
Слуховой			
Старт-рефлекс на громкий шум		Старт-рефлекс на громкий шум	20
Двигательная активность			
Четыре лапы и хвост		Спонтанное движение	каждого по 10, всего 50
Чувствительность			
Четыре лапы и хвост		Реакция на боль	каждого по 10, всего 50
Координация			
Перемещение по краю			25
Рефлекс выпрямления			25
Тест на определение места			25
Остановка у кромки стола			25
Общие			500

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием двустороннего *t*-теста
Стьюдента, полагая $p < 0,05$ статистически достоверным. Для многогруппового
статистического анализа параметрических данных проводили односторонний
дисперсионный анализ. Статистические значения были представлены как среднее $\pm$
стандартное отклонение.

Результаты и интерпретация

Эти эксперименты продемонстрировали, что защитная композиция от
ишемии/реперфузии, которая включала ВНВ и мелатонин, поддерживала выживание
животных, испытывающих 60%-ую потерю крови в течение приблизительно 3 часов,
что является значительным улучшением по сравнению с эффектами NaCl. Кроме
того, защитная композиция от ишемии/реперфузии с ВНВ и мелатонином
обеспечивала невральную защиту у крыс, которая приводила к улучшенным
последствиям после возвращения пролитой крови.

Фигура 9 показывает границу временной рамки для экспериментов для
демонстрации того, что β -гидроксibuтират можно использовать для защиты

индивидуума от значительной потери крови. Кровь отбирали до гипотензии (А); при ~40%-ой потере крови (В); после вливания раствора (С); при 60%-ой потере крови (D); через 30 минут после 60%-ой потери крови (Е); через 60 минут после 60%-ой потери крови (F); через 90 минут после 60%-ой потери крови (G); через 120 минут после 60%-ой потери крови (H); через 150 минут после 60%-ой потери крови (I) и через 180 минут после 60%-ой потери крови (J).

Сыворотку собирали в определенные моменты времени и анализировали на присутствие D-BНВ. Уровни D-BНВ в сыворотке анализировали после введения 1 мл болюса/кг (Фигура 10) или после введения 1 мл болюса/кг и последующей инфузии D-BНВ в 100 мкл/час (Фигура 11).

Были исследованы эффекты температуры тела на животных, которые испытали геморрагический шок. Животные, которые испытали геморрагический шок и которых искусственно поддерживали при 37°C посредством нагревающей лампы с механизмом обратной связи (Фигура 12, левый столбец), теряли силу значительно быстрее, чем животные, которым давали возможность приспособиться к температуре окружающей среды (Фигура 12, правый столбец). Животные, которым давали возможность приспособиться к температуре окружающей среды, выдерживали в среднем в три раза дольше, чем животные с температурами тела 37°C (Фигура 12). Следует отметить, что животные, которым давали возможность приспособиться к температуре окружающей среды, никогда не охлаждались ниже 27°C.

Был исследован эффект различных композиций на выживание животных, которые испытали геморрагический шок. Животным вводили 1 мл/кг болюса 4 М D-BНВ или 4 М NaCl или 100 мкл болюса с последующей инфузией 100 мкл/час 4М D-BНВ или 4М NaCl. После 60%-ой потери крови животным дали возможность приспособиться к температуре окружающей среды и искусственно не держали при 37°C. Пролитую кровь возвращали через 1 час после 60%-ой потери крови, и крыс проверяли на выживаемость. Животные, которые получили D-BНВ, оставались в живых дольше, чем животные, которые получили NaCl с той же осмолярностью. Важно, что животные, которым давали болюс D-BНВ с последующей инфузией D-BНВ, жили значительно дольше (р-значение <0,016), чем животные, получившие NaCl (Фигура 13).

Значительные дополнительные преимущества для выживших после возвращения крови выявились, когда добавляли 43 мМ мелатонина к 4 М D-BНВ (Фигура 14 и 19). Во время потери крови отслеживали частоту пульса (Фигура 15), среднее артериальное кровяное давление (МАВР; Фигура 16) и температуру тела (Фигура 17) животных.

Кроме того, в дни 1-6 после хирургического вмешательства крыс подвергали неврологическому оцениванию; в дни 7-10 после хирургического вмешательства крыс подвергали тестированию на запоминание; и на 10 день после хирургического вмешательства крыс умерщвляли и проводили гистологическое исследование мозга.

Краткое изложение

Животные, которым давали раствор кетоновых тел с 4 М D-BНВ, оставались в живых после геморрагического шока дольше, чем их товарищи, получившие 4 М NaCl. Кроме того, животные, которых искусственно держали при 37°C под лампой с обратной связью, погибли значительно быстрее, чем животные, которым дали возможность приспособиться к комнатной температуре. Животные, которым дали возможность приспособиться к температуре окружающей среды, в среднем оставались в живых более чем в три раза дольше, чем животные, содержащиеся в

тепле. Это позволяет предположить, что умеренная гипотермия важна в отношении выживания после геморрагического шока, и служит доказательством эффекта температуры на выживаемость после 60%-ой потери крови.

Пример 4 - Дополнительные эксперименты, связанные со значительной кровопотерей у крыс

В дополнительных экспериментах защитную композицию от ишемии/реперфузии, включающую 4М D-VNB и 43 мМ мелатонин в водном растворе, содержащем 20% ДМСО, сравнивали с контрольными растворами в модели геморрагического шока на крысах, как описано в Примере 3. Контрольные растворы представляли собой водные растворы, содержащие 20% ДМСО и (1) 4М D-VNB, (2) 4М NaCl или (3) 4М NaCl и 43 мМ мелатонин.

Растворы готовили, как описано в Примере 3, за исключением того, что стоковый раствор мелатонина/100% ДМСО, описанный в Примере 3, разбавляли путем уменьшения концентрации мелатонина вдвое, и двойной объем стокового раствора мелатонина использовали для приготовления растворов для инфузии крысе. Растворы для инфузии содержали 20% ДМСО (вместо 10% ДМСО, как описано в Примере 3).

Обычно крысы теряли около 40% своей крови в течение около 10 минут после начала кровотечения. После достижения потери крови около 40% крысам вливали болюсную дозу 1 мл/кг защитной композиции от ишемии/реперфузии, содержащей D-VNB плюс мелатонин, или контрольный раствор. Инфузию болюса проводили в течение промежутка времени около 10 минут, после чего начинали длительную инфузию (100 мкл/час) защитной композиции от ишемии/реперфузии, содержащей D-VNB и мелатонин, или контрольного раствора. Давление крови далее снижалось в течение около 10 следующих минут до тех пор, пока общее количество потерянной крови не составило около 60% от всей крови. Инфузию (100 мкл/час) защитной композиции от ишемии/реперфузии, содержащей D-VNB и мелатонин, или контрольного раствора продолжали до одного часа после того, как была достигнута потеря крови около 60%. Затем начинали возвращение потерянной крови. Конечной точкой исследования являлась гибель после возвращения крови или умерщвление после десяти дней наблюдения.

Результаты этих исследований показали, что выживаемость крыс, подвергнутых 60%-ой потере крови, резко увеличивалась у крыс, которым проводили инфузию защитной композиции от ишемии/реперфузии, содержащий D-VNB и мелатонин, по сравнению с крысами, которым проводили инфузию контрольного раствора, содержащего 4М D-VNB, 4М NaCl или 4М NaCl плюс мелатонин (Фигура 19). В действительности не наблюдали значительного различия между крысами, подвергшимися действию защитной композиции от ишемии/реперфузии, содержащей D-VNB плюс мелатонин, и крысами с фиктивным лечением, которые не подвергались потере крови. Не отмечено значительной разницы в концентрациях лактата в сыворотке между любыми из подвергшихся лечению группами (Фигура 20).

Пример 5 - Защита крупных животных от значительной потери крови

Цель

Эффективность защитной композиции от ишемии/реперфузии проверяют на модели геморрагического шока с клинически значимым крупным животным. Была применена контрольная модель геморрагического шока, которая использует систолическое давление крови в 50 мм рт. ст. в качестве критической точки для

стимуляции повреждения крупных кровеносных сосудов и тромбообразования. Смотри, например, Skarda et al, 2006, *J. Amer. Coll. Surg.*, 203(3S):S32-S33.

Используют две группы животных и подвергают лечению для моделирования реальных условий. Животных подвергают протоколу геморрагического шока, и затем они получают либо защитную композицию от ишемии/реперфузии либо раствор носителя внутривенно через 15 минут после кровопотери для моделирования начального лечения службой быстрого реагирования в данной области. Для моделирования поступления в лечебное учреждение все животные получают восстановление жизненных функций с использованием стандартного протокола после 1,5 часов шока. Животных реанимируют до стандартных клинических параметров кровяного давления, диуреза и гемоглобина в течение 8 часов и затем умерщвляют для анализа.

Измеряемые параметры во время геморрагического шока/реанимации		Таблица 2
Физиологические параметры	Доставка кислорода(DO_2) и истощение (VO_2), диурез, частота пульса, давление крови, сердечный выброс, давление в концевых легочных капиллярах (PCWP)	
Данные спектроскопии в ближней инфракрасной области	Насыщение ткани оксигемоглобином (StO_2) скелетная мышца, желудок, печень	
BIS монитор	Контроль успокоения во время анестезии	
Лабораторные показатели	Лактат, BUN, креатинин, AST, ALT, щелочная фосфатаза, билирубин, LDH, CPK, глюкоза в крови, газы в артериальной и венозной крови	
Показатели реанимации	Потребление жидкости, переливание крови	

Начальными критическими точками экспериментов являются параметры адекватности тканевой перфузии. Они включают уровень лактата, дефицита основания и StO_2 . Лактат и дефицит основания представляют собой признанные, широко используемые критические точки для клинической реанимации травматических пациентов, в то время как StO_2 , параметр, измеряющий насыщение кислородом гемоглобина ткани, как было показано, коррелирует с доставкой кислорода в травматических моделях. В недавнем исследовании по наблюдениям за травматическими пациентами с тяжелыми повреждениями StO_2 , а также лактат и дефицит основания прогнозировали летальность. Другие параметры перечислены в Таблице 2 и регистрируются во время эксперимента, как отмечено в Таблице 3.

Матрица измерений								Таблица 3
	Базовый уровень	Шок 30, 60, 90	1 час реанимации	2 часа реанимации	4 часа реанимации	6 часов реанимации	8 часов реанимации	
Инвазивная гемодинамика ^a	X	X	X	X	X	X	X	
Лабораторные показатели	X	X	X	X	X	X	X	
Параметры NIR (мм, стул, печень)	X	X	X	X	X	X	X	
Биопсия мышц, печени	X	Шок 90					X	

Описание опыта

Животных анестезировали с использованием комбинации альтезина и кетамина. Животные получали анестезию во время начального хирургического вмешательства и во время периода шока, с использованием протокола, состоящего из альтезина, стероидного анестетика (Schering-Plough Animal Health, Kenilworth, N.J.) и оксида азота, комбинация которых, как было показано, предохраняет многие рефлекторные реакции тела на шок, при обеспечении надлежащего уровня анестезии. Насыщение

крови животных кислородом проводили с использованием аппаратного дыхания через интубационную трубку с FiO_2 , выравненным с PaO_2 в 80-120 мм рт. ст. и PaCO_2 в 37-43 мм рт. ст. во время подготовительной хирургической операции.

Подготовительная хирургическая операция включает лапаротомию для спленэктомии (для предотвращения аутогемотрансфузии), катетеризацию полую нижнюю вены и катетеризацию мочевого пузыря. Катетеры артериальной и пульмональной артерии помещают через посредство шейной веносекции. После стабилизационного периода геморрагический шок вызывают отбором крови в гепаринизированный мешок для крови для достижения систолического давления крови в 50 мм рт.ст. После 15 минут шока животные получали внутривенно либо защитную композицию от ишемии/реперфузии, содержащую D-BHB и мелатонин или ацетоксусную кислоту и мелатонин, либо раствор носителя.

После 90 минут шока животные начинают проводить зависимую от массы инфузию защитной композиции от ишемии/реперфузии или раствора носителя. Кроме того, животных реанимируют до клинических критических точек с использованием стандартной стратегии реанимации, как изложено в Фигуре 18. Во время периодов шока и реанимации животных поддерживали на аппарате искусственной вентиляции легких, и они получали пропофол и оксид азота в соответствующих дозах для поддержания соответствующего уровня успокоения и покоя с использованием BIS-монитора. Оставшихся в живых животных умерщвляли через 8 часов после начала реанимации.

Пример 6 - Защита крупных животных от значительных потерь крови

Эффективность защитной композиции от ишемии/реперфузии, содержащей D-BHB плюс мелатонин, проверяли на модели геморрагического шока у свиней, описанной в других местах (Пример 5; Beilman et al, 1999, *Шок*, 12(3): 196-200; Skarda et al, 2007, *Resuscitation*, 75(1): 135-44; Taylor et al., 2004, *Шок*, 21(1):58-64; Taylor et al., 2004, *J. Trauma*, 56(2):251-258; Mulier et al., 2005, *Шок*, 23(3):248-52; Skarda et al., 2006, *J. Amer. Coll. Surg.*, 203(3):S32-S33; Taylor et al, 2005, *J. Trauma*, 58(6): 1119-25). Была выбрана модель на свиньях, поскольку она приемлема в качестве клинически подходящей модели геморрагического шока у человека. Потерю крови до систолического давления крови около 50 мм рт. ст. использовали для инициирования вазкулярной декомпенсации, наблюдаемой у пациентов с травмами, страдающих от серьезных потерь крови.

Эксперименты проводили фактически, как изложено в Примере 5. Две экспериментальные группы свиней подвергали геморрагическому шоку и получали вариант, воспроизводящий реальную ситуацию. Одна группа получала защитную композицию от ишемии/реперфузии, содержащую 4М D-BHB и 43 мМ мелатонин в водном растворе, содержащем 20% ДМСО. Другая группа получала контрольный раствор, содержащий 4М NaCl и 20% ДМСО. Растворы вводили через центральный венозный катетер (введение защитной композиции от ишемии/реперфузии через периферическую вену может приводить к некоторому некрозу прилегающей ткани).

Каждой свинье вводили инфузию 1 мл/кг болюса защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольный раствор через 15 минут после кровопотери для моделирования первоначального лечения персоналом экстренной медицинской помощи на месте происшествия. Сразу же после инфузии болюса каждую из двух групп свиней дополнительно разделяли в одну из трех дозовых групп. Одной дозовой группе вводили непрерывную инфузию 0,66 мл/кг/час защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольный раствор до четырех часов после

реанимации (высокая доза). Второй дозовой группе вводили непрерывную инфузию 0,33 мл/кг/час защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольный раствор до четырех часов после реанимации (средняя доза). Третьей группе не вводили непрерывную инфузию сразу же после инфузии болюса (через 15 минут после шока), а вводили непрерывную инфузию 0,33 мл/кг/час защитной композиции от ишемии/реперфузии или контрольный раствор, начиная с 60-90 минут после шока (на момент реанимации) и продолжающийся до четырех часов после реанимации (низкая доза).

Для моделирования прибытия в лечебное учреждение всех животных реанимировали после 60-90 минут шока. Реанимацию начинали, когда уровень лактата у животных достигал > 8 мг/дл, проявлялось понижение в насыщении гемоглобина ткани кислородом (StO_2) ниже 50%, и появлялись признаки потери сосудистого тонуса (падение систолического давления крови менее чем 10 мм рт.ст.). Животных реанимировали до стандартных клинических результатов давления крови, диуреза и гемоглобина (Фигура 18). После девяти часов реанимации животных умерщвляли.

Уровни D-BHB (мМ) в сыворотке измеряли у контрольных свиней, а также у свиней, которым вводили низкие, средние и высокие дозы защитной композиции от ишемии/реперфузии. Уровни измеряли в нулевой точке; на 30, 60 и 90 минутах после шока; и через 1, 2, 4, 6 и 8 часов после начала реанимации (Фигура 21). Эти результаты показывают, что уровни D-BHB в сыворотке, наблюдаемые у свиней, которым вводили защитную композицию от ишемии/реперфузии, были сходны с уровнями D-BHB в сыворотке, наблюдаемыми у крыс, которым вводили защитную композицию от ишемии/реперфузии (сравните Фигуру 21 с Фигурой 11). Результаты этих экспериментов указывают, что защитная композиция от ишемии/реперфузии, содержащая D-BHB плюс мелатонин, была безопасна в модели геморрагического шока у свиней и улучшала важные клинические параметры, измеряемые во время реанимации.

Одной из первичных критических точек, измеренных во время экспериментов по геморрагическому шоку у свиней, являлся уровень лактата в сыворотке (Фигура 22). Уровень лактата в сыворотке представляет собой индикатор адекватности тканевой перфузии, что широко используется в качестве отправной точки для клинической реанимации пациентов с травматическими повреждениями. Многочисленные исследования показали, что пациенты, которые собираются пережить травматический шок, нормализуют свои уровни лактата более быстрее, чем те, которые не собираются пережить. Накопление лактата в крови может являться прогностическим показателем смерти. Наблюдали, что уровни лактата уменьшаются быстрее у животных, получивших лечение защитной композицией от ишемии/реперфузии по сравнению с контролями (Фигура 22). Необходимо шесть часов реанимации для того, чтобы средний уровень лактата у контрольных животных достиг того же среднего уровня, наблюдаемого после только четырех часов реанимации у животных, подвергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии. Эти данные свидетельствуют о том, что тканевый гомеостазис после геморрагического шока был превосходящим у свиней, подвергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, относительно контрольных животных. Следует отметить, что измерения у свиней, которые получали защитную композицию от ишемии/реперфузии, были усреднены вместе, равно как и измерения у свиней, которые получали контрольный раствор.

Дефицит/избыток основания представляет собой другой параметр, который оценивали во время экспериментов с крупными животными (Фигура 23; Siggaard-Andersen, 1974, *The acid-base status of the blood*, 4th Ed., Copenhagen: Munksgaard; Schmelzer et al., 2008, *Am. J. Emerg. Med.*, 26:119-23; Eastridge et al., 2007, *J. Trauma*, 63: 291-9; Englehart & Schreiber, 2006, *Curr. Opin. Crit. Care*, 12:569-74). Дефицит основания определяли с использованием газоанализатора крови (Gem Premier Model 3000 с картриджем для дефицита основания No. 24315009; Instrumentation Laboratories Inc., Lexington, MA). Наряду с уровнем лактата, дефицит/избыток основания также признают в качестве меры адекватности перфузии ткани и широко применяют для оценки клинической реанимации пациентов с травматическими повреждениями. Дефицит основания, который наступает через 90 минут после начала шока, не был таким сильным у животных, подвергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, как у животных с введением контрольного раствора (Фигура 23). Кроме того, дефицит основания, как наблюдали, восстанавливался быстрее в группе, подвергшейся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, чем в контрольной группе. Дефицит основания более чем 6 мЭк/л, который наблюдали, начиная примерно с 45 минут после шока и продолжающийся около 2 часов после реанимации в контрольной группе, но не в группе, подвергшейся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, представляет собой предиктор летальности (Cohn et al., 2007, *J. Trauma*, 62(1):44-54).

Взятые вместе, представленные на Фигурах 22 и 23 результаты демонстрируют, что лечение защитной композицией от ишемии/реперфузии, содержащей D-ВНВ и мелатонин, было связано с тенденцией к более быстрому устранению лактата и дефицита основания. Эти результаты предоставляют веское доказательство того, что лечение защитной композицией от ишемии/реперфузии может снижать летальность и улучшать последствия для пациентов с травматическими повреждениями человека.

Также измеряли значения рН сыворотки у свиней, которым вводили защитную композицию от ишемии/реперфузии или контрольный раствор (Фигура 24). У животных, подвергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, уровни рН сыворотки не опускались так низко, как у контрольных животных. Кроме того, наблюдали, что уровни рН у животных, подвергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, нормализовались быстрее по сравнению с контрольными животными.

Адекватность перфузии ткани также оценивали по измерению насыщения гемоглобина ткани кислородом (StO₂; Фигура 25; Zenker et al., 2007, *J. Trauma*, 63:573-80; Puyana & Pinsky, 2007, *Crit. Care*, 11:116; Cohn et al., 2007, *J. Trauma*, 62:44-55; и Myers et al., 2005, *J. Biomed. Opt.*, 10:034017). Значения StO₂ указывают на насыщение гемоглобина в ткани кислородом и, как было показано, коррелируют с доставкой кислорода в травматических моделях. В исследовании травматических пациентов с тяжелыми повреждениями StO₂ прогнозировал летальность, по меньшей мере, так же, как лактат и дефицит основания (Cohn et al., 2007, *J. Trauma*, 62(1):44-54). Кроме того, признается, что пациенты с большей вероятностью переживают травматический шок, если у них доставка кислорода в ткани и потребление увеличено до предела в ранней постреанимационной фазе. Сохранение перфузии ткани во время шока, как определили по уровням StO₂, наблюдалось у животных, подвергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, по сравнению с контрольными (Фигура 25). Увеличенные уровни StO₂ у животных, подвергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, свидетельствуют о том, что

в присутствии описанной защитной композиции от ишемии/реперфузии было доступно больше кислорода для жизненно важных органов, что обычно приводит к увеличению выживаемости пациентов и улучшению последствий. В дополнение к увеличенным уровням StO₂ у животных, повергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, наблюдали улучшение доставки кислорода у свиней, повергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии относительно свиней, повергшихся лечению контрольным раствором (Фигура 26).

В дополнение к использованию множества показателей для оценки улучшения тканевой перфузии и возвращения к нормальному гомеостазису у испытанных геморрагический шок свиней, повергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии или контрольным раствором, также были определены объемы жидкости, необходимые для введения во время реанимации (Фигуры 27 и 28). Общее количество жидкости, необходимой для реанимации, представляет собой существенный параметр, поскольку энергичное введение жидкости может приводить к увеличению летальности. В частности, энергичное введение жидкости, которое обращает пониженное кровяное давление до достижения гемостаза, может смещать частично образованные тромбы и разбавлять существующие факторы свертывания крови, что приводит к дополнительной потере крови. Введение защитной композиции от ишемии/реперфузии было связано со стойкой тенденцией к низким объемам жидкости, необходимой для реанимации (Фигура 27). Эти результаты предоставляют дополнительное доказательство того, что введение защитной композиции от ишемии/реперфузии может уменьшить летальность индивидуумов, страдающих от геморрагического шока.

Основные жизненно важные показатели сердечного выброса, частоты пульса, систолического давления крови и диуреза также контролировали во время экспериментов на свиньях, как если бы они были пациентами человека с геморрагическим шоком. Летальный шок имеет место, когда периферийные ткани становятся настолько лишенными крови и кислорода, что слишком сильно снижаются уровни клеточной энергии и слишком сильно повышаются уровни токсических побочных продуктов. В этих условиях периферийные ткани не могут больше поддерживать периферийное сужение кровеносных сосудов для того, чтобы поддерживать поток крови к мозгу и сердцу. Эта утрата сужения кровеносных сосудов зачастую является конечной причиной смерти. В контрольной группе потеря крови, сопровождаемая периферийной утратой сосудистого тонуса, приводила к уменьшению систолического давления крови (Фигура 31) с последующим компенсационным увеличением в сердечном выбросе (Фигура 28), чтобы поддерживать мозг и сердечный кровоток. Однако животные, повергшиеся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, как оказалось, сохраняли сужение кровеносных сосудов периферийной ткани, которое приводило к уменьшению сердечного выброса (Фигура 28) при наличии увеличенной частоты пульса (Фигура 29) и увеличенного систолического давления крови (Фигура 30) по сравнению с контролями. Кроме того, почечный выход восстанавливался быстрее у свиней, повергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии (Фигура 32). Диурез представляет собой показатель почечной функции, которая в свою очередь определяется потоком крови к почкам и целостностью клеток почек. Эти результаты свидетельствуют о том, что описанные защитные композиции от ишемии/реперфузии могут стимулировать жизнеспособность периферийных тканей путем предоставления нескольких эффективных источников энергии и нейтрализации

накопления токсичных побочных продуктов.

Лечение животных защитной композицией от ишемии/реперфузии предотвращать синдром интраабдоминального пространства (IACS), что дополнительно иллюстрирует полезные эффекты защитной композицией от ишемии/реперфузии в снабжении тканей энергией и поддержании клеточной целостности. IACS представляет собой синдром, относящийся к быстрому вздутию живота, который может развиваться во время реанимации пациентов с травматическими повреждениями и который является предвестником предстоящей смерти. Несмотря на то что две свиньи, которые получали низкую дозу защитной композиции от ишемии/реперфузии, умерли перед окончательной реанимацией, ни у одной из свиней, подвергшихся лечению защитной композицией от ишемии/реперфузии, не развился IACS. В контрольной группе, с другой стороны, животное умерло из-за IACS через 4,5 часов после начала реанимации. Таблица 4 демонстрирует число свиней, которые выжили и умерли в каждой из групп, которые подвергались геморрагическому шоку и которым вводили контрольный раствор или низкую, среднюю или высокую дозировку защитной композиции от ишемии/реперфузии, как описано здесь.

Таблица 4					
Летальность свиней					
Дозировка (n=16)		Контроль		D-BNH+M	
		Выжили	Умерли	Выжили	Умерли
Низкая:	болюс + интервал 1х инфузия	2	1	2	2
Средняя:	болюс - интервал 1х инфузия	1	0	2	0
Высокая:	болюс - интервал 2х инфузия	2	0	4	0

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Следует понимать, что, несмотря на то что изобретение было подробно описано, вышеприведенное описание предназначено для того, чтобы проиллюстрировать изобретение, и не предназначено для ограничения объема изобретения, который определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации охватываются нижеследующей формулой изобретения.

Формула изобретения

1. Защитная композиция от ишемии/реперфузии, содержащая мелатонин и по меньшей мере одно кетоновое тело, выбранное из группы, состоящей из β -гидроксibuтирата, ацетоацетата, и их фармацевтически приемлемых солей.

2. Композиция по п.1, в которой указанное одно или более кетоновых тел включает ацетоацетат или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Композиция по п.1, в которой указанные одно или более кетоновых тел включает D- β -гидроксibuтират и ацетоацетат или их фармацевтически приемлемые соли.

4. Композиция по п.1, где указанная композиция, по существу, свободна от неорганических анионов.

5. Композиция по п.1, в которой указанная фармацевтически приемлемая соль представляет собой Na-D- β гидроксibuтират.

6. Композиция по п.1, в которой указанный мелатонин представляет собой 5-метокси-N-ацетилтриптамин.

7. Композиция по п.1, где указанная композиция представляет собой жидкую композицию.

8. Композиция по п.7, где указанная композиция содержит от около 0,1 М до около 8 М указанных кетоновых тел и от около 4 нМ до около 150 мМ указанного мелатонина.

9. Композиция по п.7, где указанная композиция содержит около 4 М Na-D-β-гидроксibuтирата и около 43 мМ мелатонина.

10. Композиция по п.7, где указанная композиция, по существу, свободна от Cl.

11. Композиция по п.7, в которой растворитель в указанной жидкой композиции представляет собой воду.

12. Композиция по п.7, где указанная жидкая композиция включает солубилизатор и/или стабилизатор.

13. Композиция по п.12, в которой указанный солубилизатор представляет собой ДМСО.

14. Композиция по п.1, где указанная композиция представляет собой сухую порошковую композицию.

15. Композиция по п.14, где указанная композиция имеет соотношение молей кетоновых тел к молям мелатонина от около 100 до 1.

16. Композиция по п.14, где указанная композиция имеет соотношение молей кетоновых тел к молям мелатонина от около 1×10^7 до 1.

17. Композиция по п.1, дополнительно содержащая терапевтическое соединение.

18. Изделие для защиты субъекта от ишемического повреждения или реперфузионного повреждения, содержащее композицию по п.1.

19. Композиция для защиты индивидуума от ишемического повреждения или реперфузионного повреждения, состоящая, по существу, из мелатонина и по меньшей мере одного кетонового тела, выбранного из группы, состоящей из β-гидроксibuтирата, ацетоацетата и их фармацевтически приемлемых солей.

20. Способ лечения индивидуума, который испытывает или испытывал потерю крови, включающий введение мелатонина и по меньшей мере одного кетонового тела, выбранного из группы, состоящей из β-гидроксibuтирата, ацетоацетата, и их фармацевтически приемлемых солей указанному индивидууму.

21. Способ по п.20, где указанные одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят вместе в единой композиции.

22. Способ по п.20, где индивидуум испытывает или испытывал обширное геморрагическое событие.

23. Способ по п.20, где указанный индивидуум потерял, по меньшей мере, около 10% объема крови.

24. Способ по п.20, где указанный индивидуум потерял, по меньшей мере, около 20% объема крови.

25. Способ по п.20, где указанный индивидуум потерял, по меньшей мере, около 30% объема крови.

26. Способ по п.20, где указанная потеря крови у указанного индивидуума приводит к систолическому давлению крови около 70 мм рт.ст. или менее.

27. Способ по п.20, где указанное одно или более кетоновых тел вводят указанному индивидууму в количестве, достаточном для достижения концентрации в крови от около 3 мМ до около 15 мМ, и где указанный мелатонин вводят

указанному индивидууму в количестве, достаточном для достижения концентрации в крови от около 20 мкМ до около 150 мкМ.

28. Способ по п.20, где указанные одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят в объеме от около 0,3 до около 2 миллилитров (мл) на килограмм (кг) массы указанного индивидуума.

29. Способ по п.20, где указанные одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят в объеме от около 0,3 до около 2 мл на кг массы указанного индивидуума в час.

30. Способ по п.20, где указанные одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят в объеме от около 0,3 до около 2 мл на кг массы указанного индивидуума с последующим введением указанных одного или более кетоновых тел и мелатонина в объеме от около 0,3 до около 2 мл на кг массы указанного индивидуума в час.

31. Способ по п.20, где указанные одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят внутривенно.

32. Способ по п.20, где указанные одно или более кетоновых тел и мелатонин вводят внутрикостно.

33. Способ по п.20, где уровни StO₂ указанного индивидуума составляют менее чем 75%.

34. Способ по п.33, где указанное введение приводит к возвращению уровней StO₂ указанного индивидуума к более чем 75%.

35. Способ по п.20, где указанного индивидуума подвергают лечению, когда уровни StO₂ индивидуума составляют более чем 75%.

36. Способ по п.20, где уровни лактата указанного индивидуума составляют более чем 2,1 мг/дл.

37. Способ по п.36, где указанное введение приводит к возвращению уровней лактата указанных индивидуумов до менее чем 2,1 мг/дл.

38. Способ по п.20, где указанного индивидуума подвергают лечению, когда уровни лактата индивидуума составляют менее чем 2,1 мг/дл.

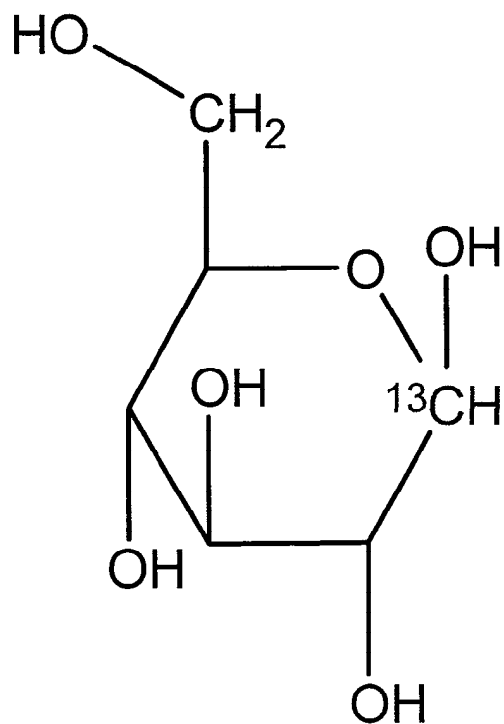
39. Способ по п.20, где указанное введение препятствует достижению 6 мЭк/л дефицита основания указанного индивидуума.

40. Способ по п.20, дополнительно включающий переливание указанному индивидууму крови или плазмы.

41. Способ по п.40, где указанное переливание осуществляют после введения указанных одного или нескольких кетоновых тел и мелатонина.

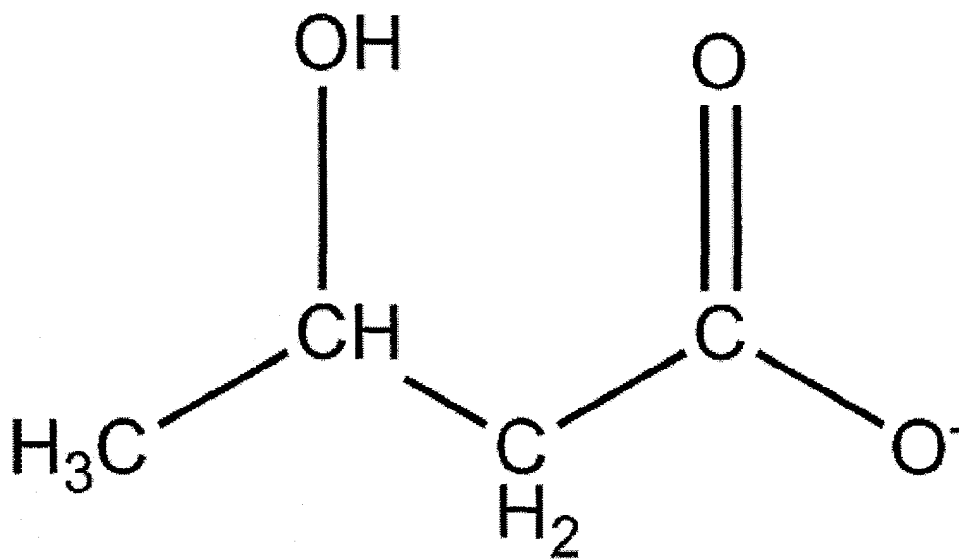
42. Способ лечения индивидуума, уровни StO_a которого составляют менее чем 75%, включающий идентификацию индивидуума, уровни StO₂ которого составляют менее чем 75%; и введение мелатонина и одного или нескольких кетоновых тел, выбранных из группы, состоящей из β-гидроксибутирата, ацетоацетата, и их фармацевтически приемлемых солей.

43. Способ лечения индивидуума, который имеет уровень дефицита основания более чем 6 мЭк/л, включающий идентификацию индивидуума, уровень дефицита основания которого составляет более чем 6 мЭк/л; и введение мелатонина и одного или нескольких кетоновых тел выбранных из группы, состоящей из β-гидроксибутирата, ацетоацетата, и их фармацевтически приемлемых солей.



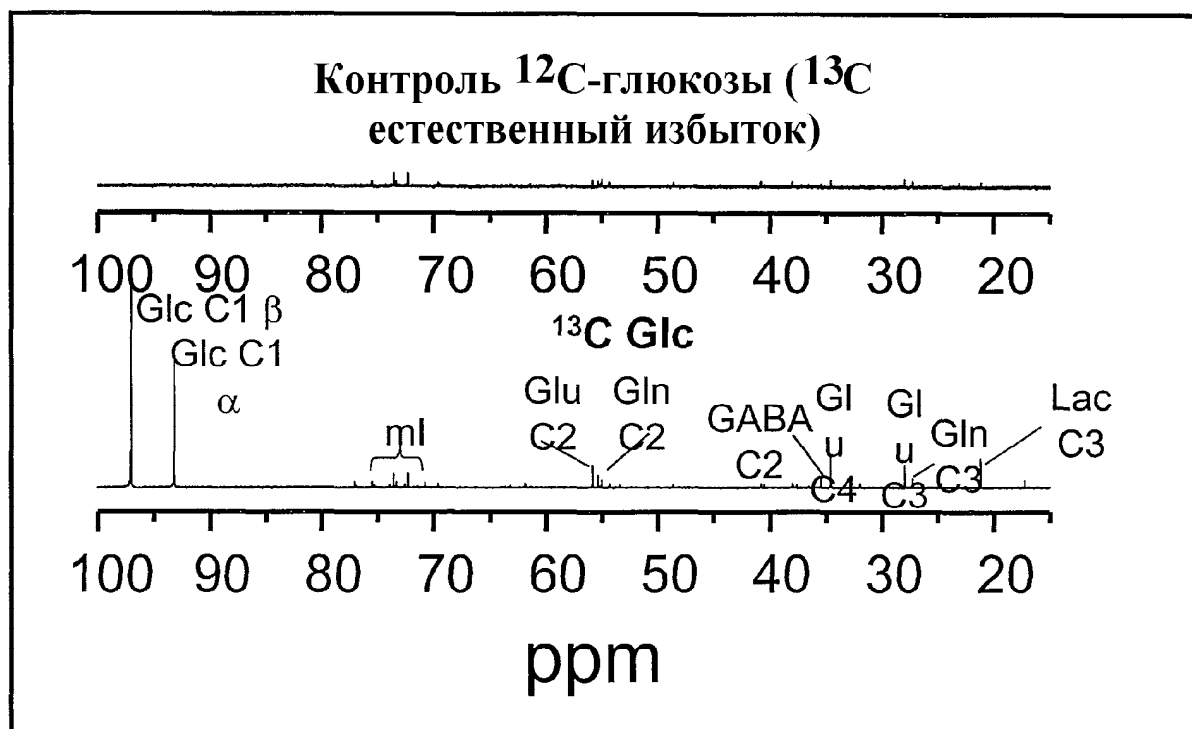
[1- ^{13}C]-глюкоза

Фиг. 1

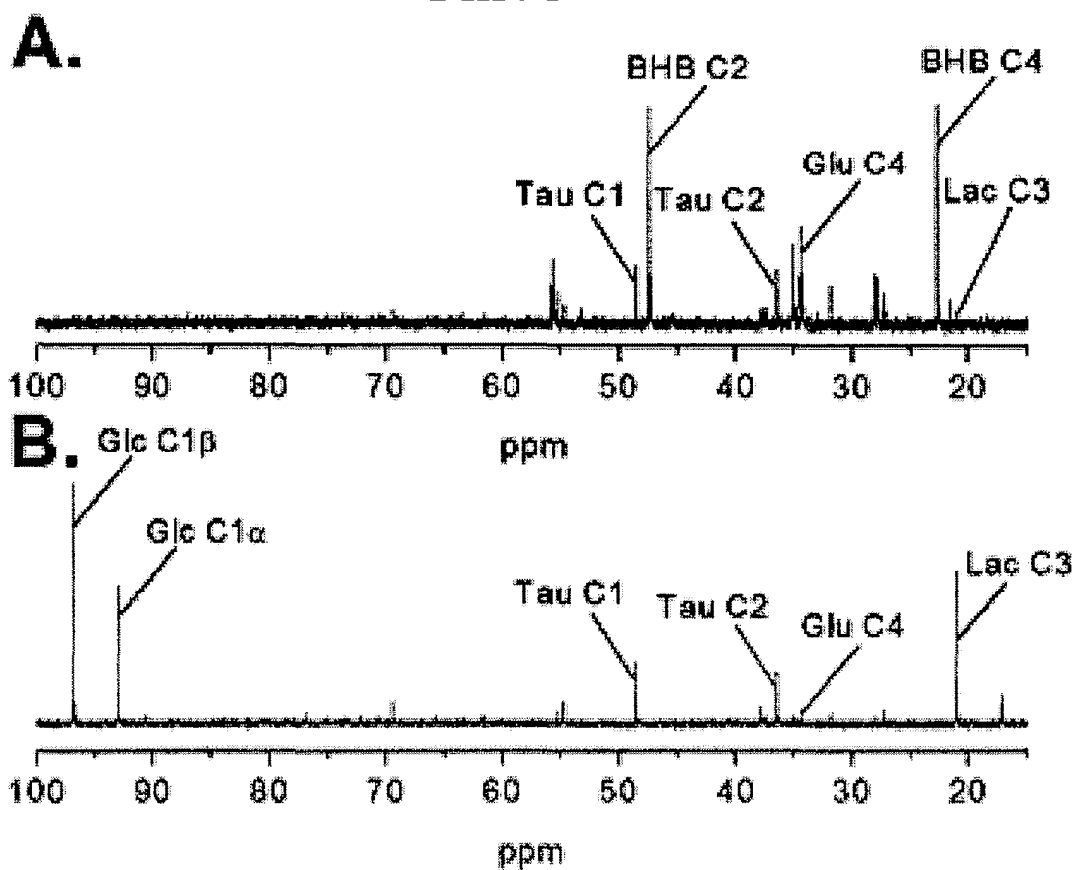


[2,4- ^{13}C]- β -гидроксибутират

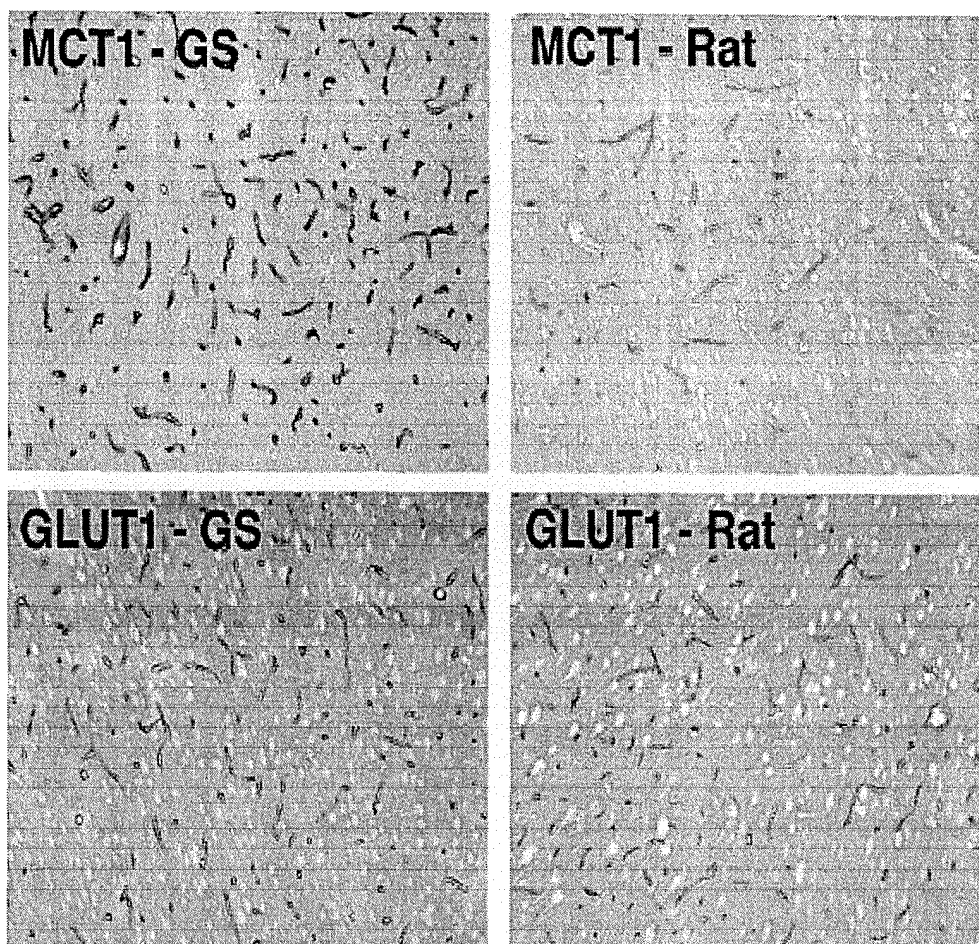
Фиг. 2



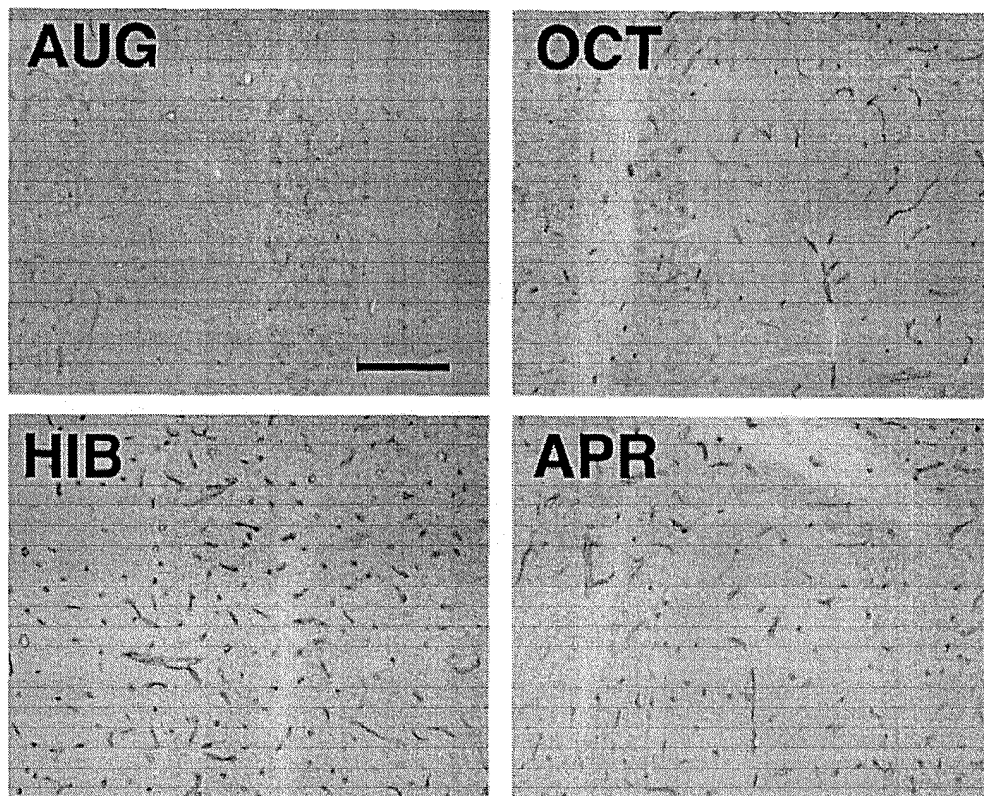
Фиг. 3



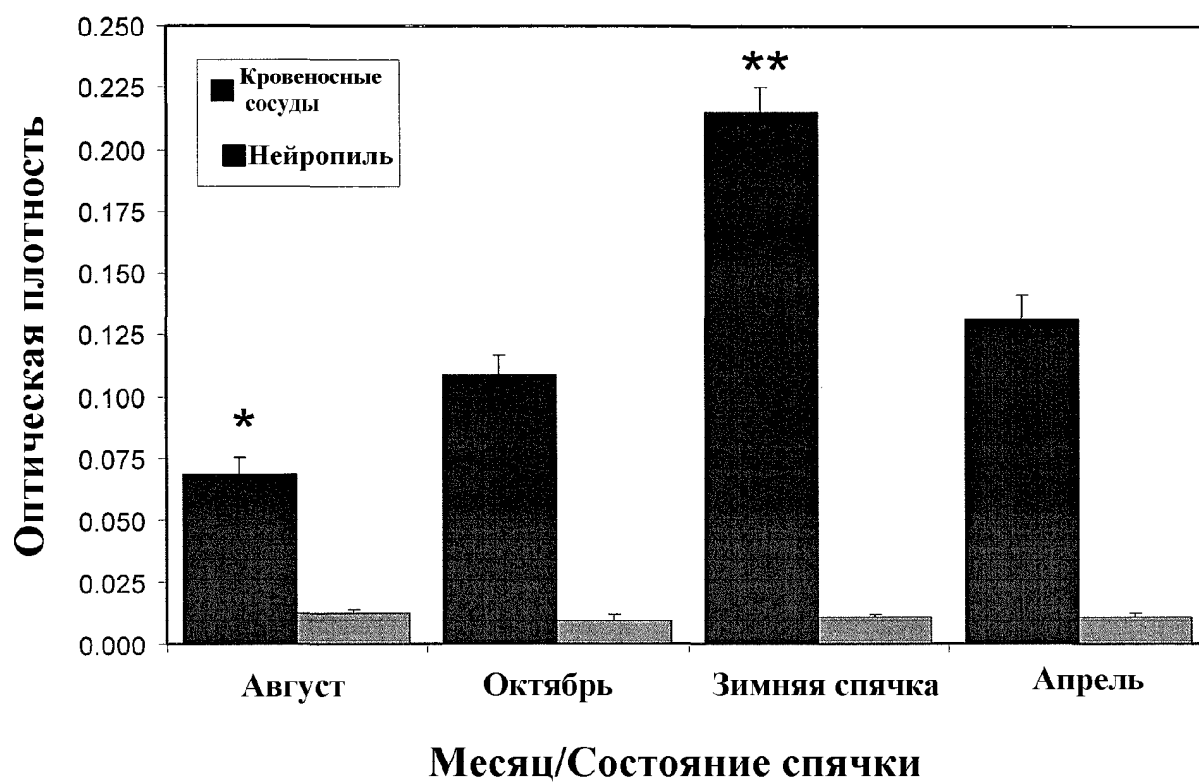
Фиг. 4



Фиг. 5



ФИГ. 6
Оптические плотности МСТ1



ФИГ. 7

2-мерные гели из сердец от активных и находящихся в зимней спячке земляных белок

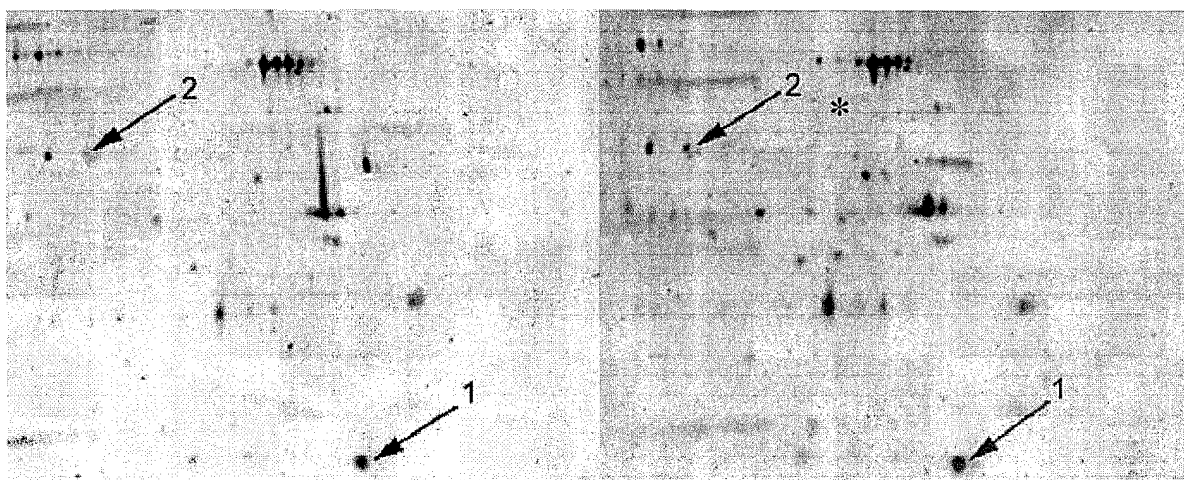
А. активные $T_b = 37^\circ\text{C}$

7

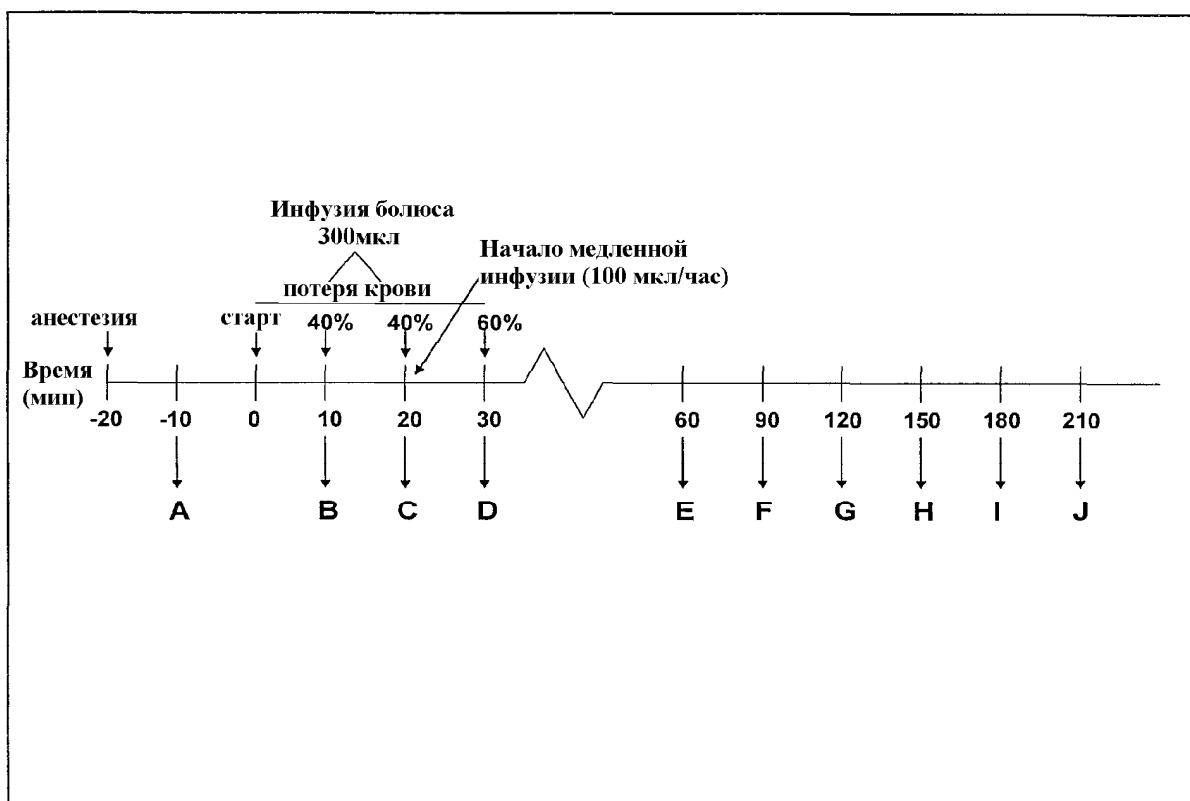
В. в зимней спячке $T_b = 5^\circ\text{C}$

4 7

4



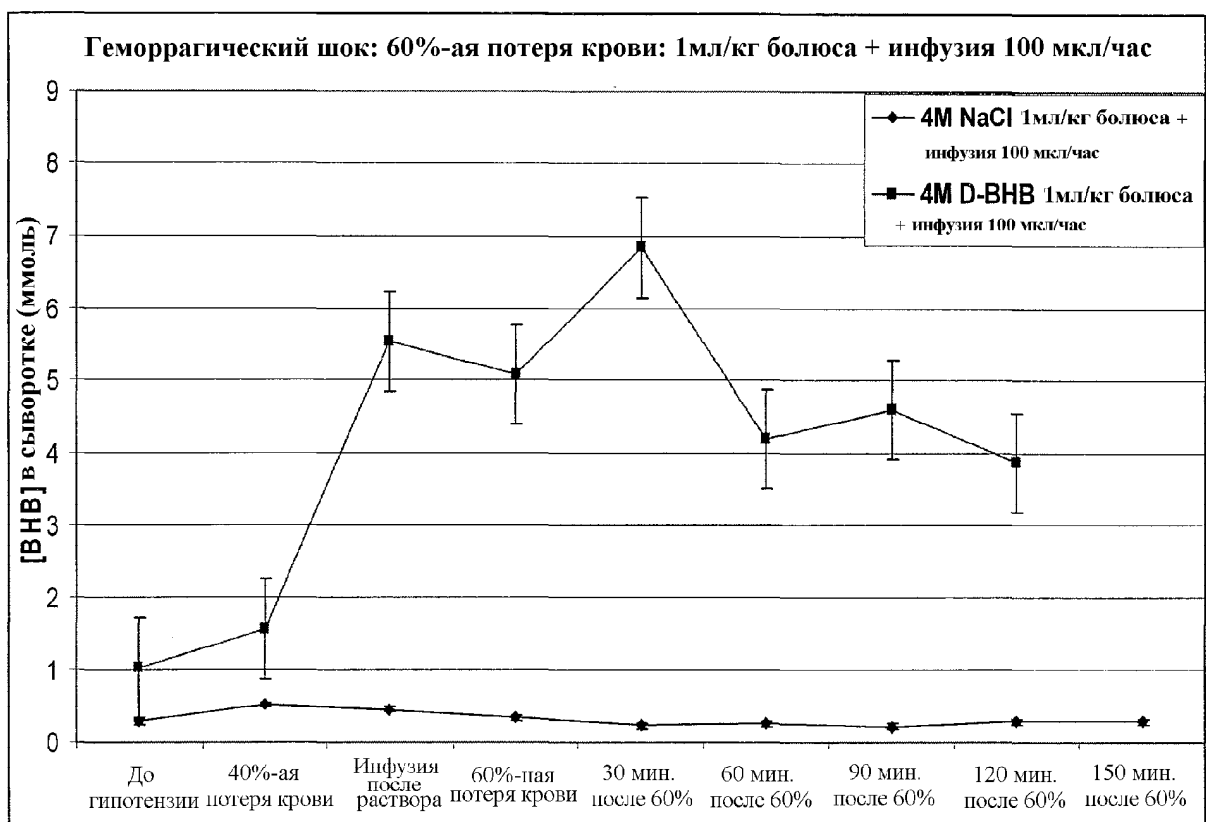
Фиг. 8



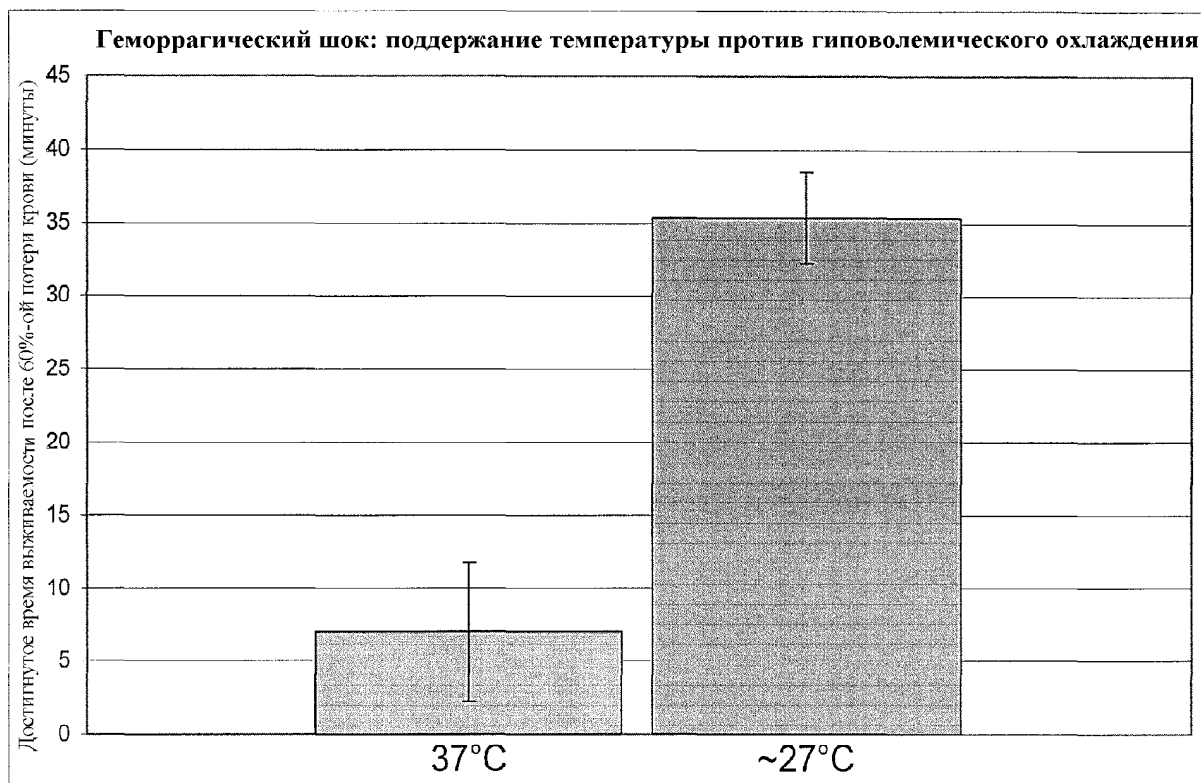
Фиг. 9



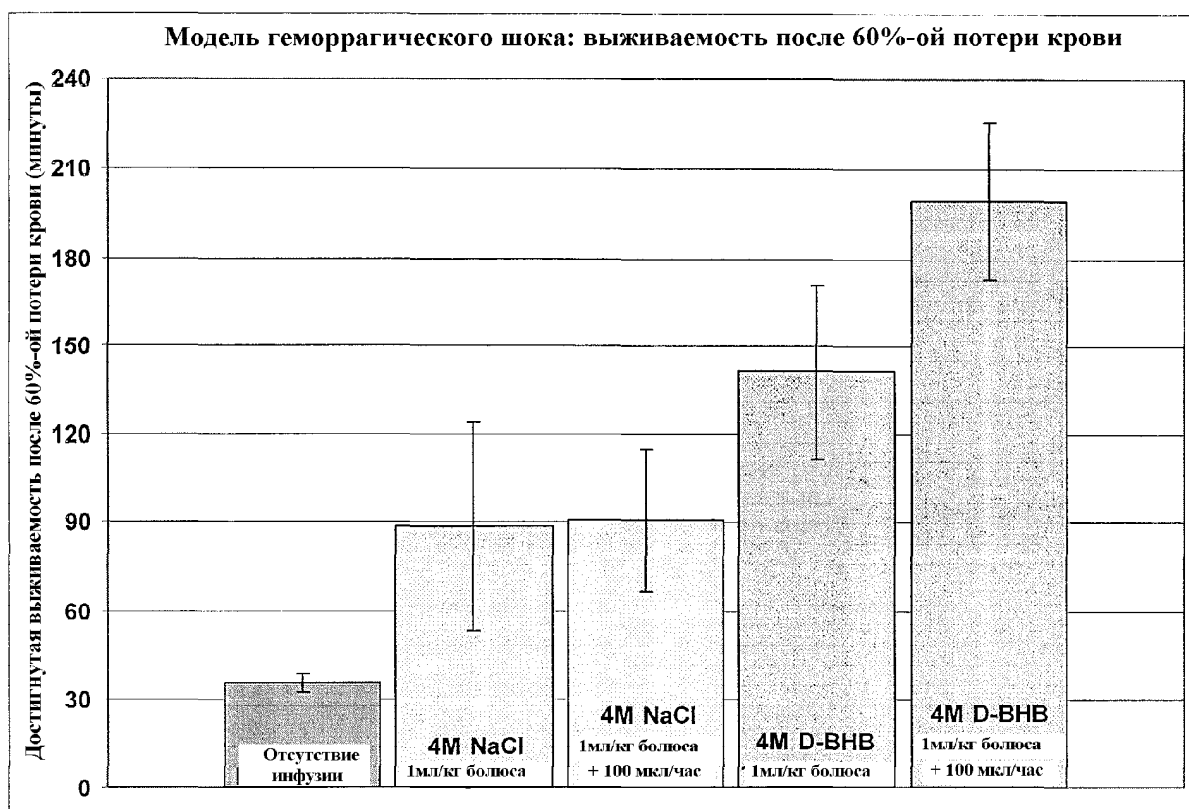
Фиг. 10



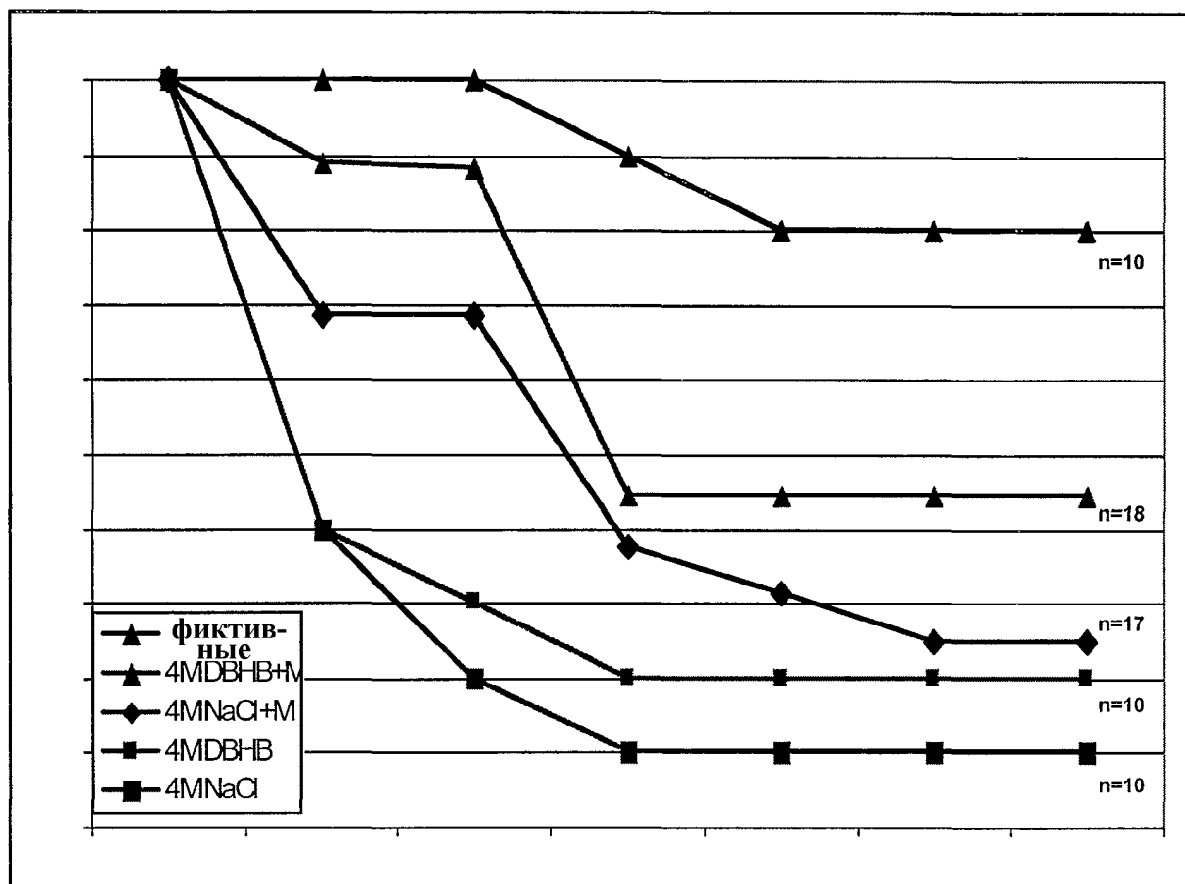
Фиг. 11



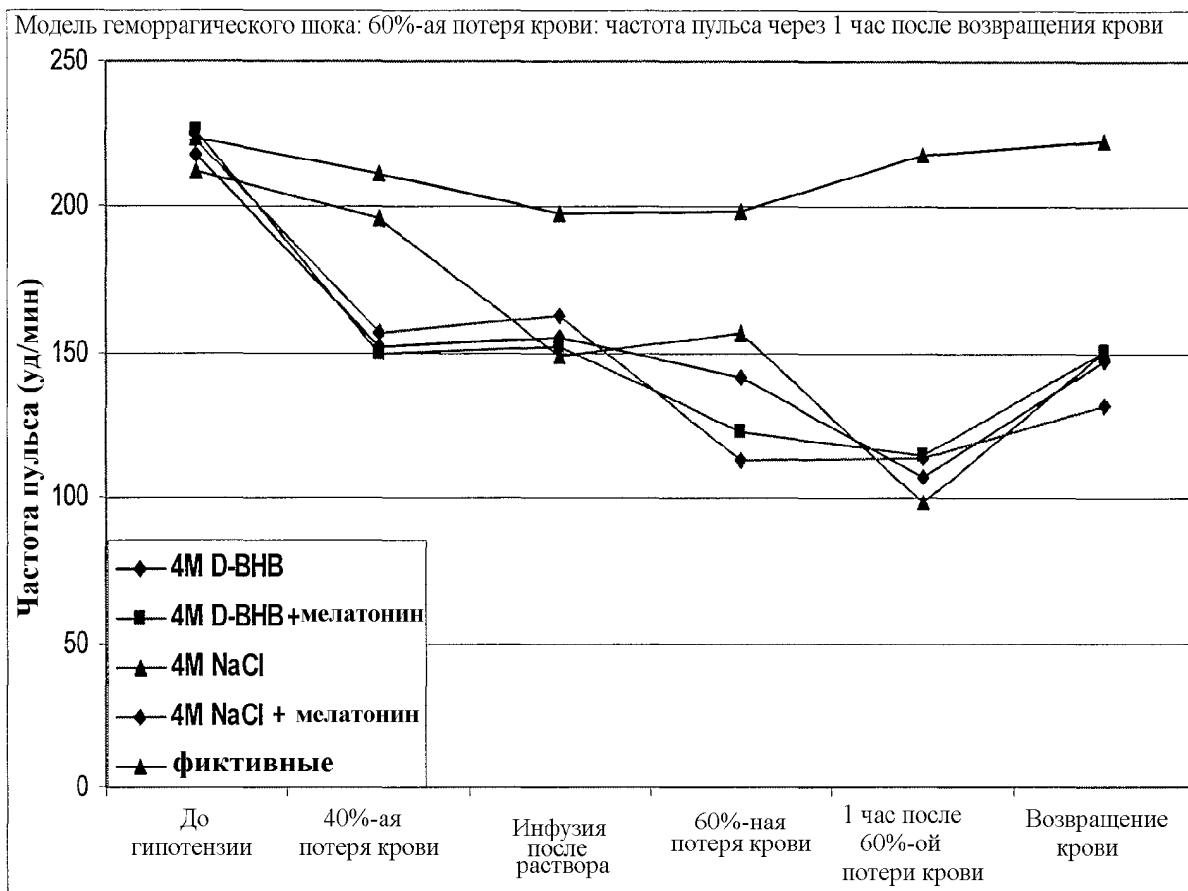
Фиг. 12



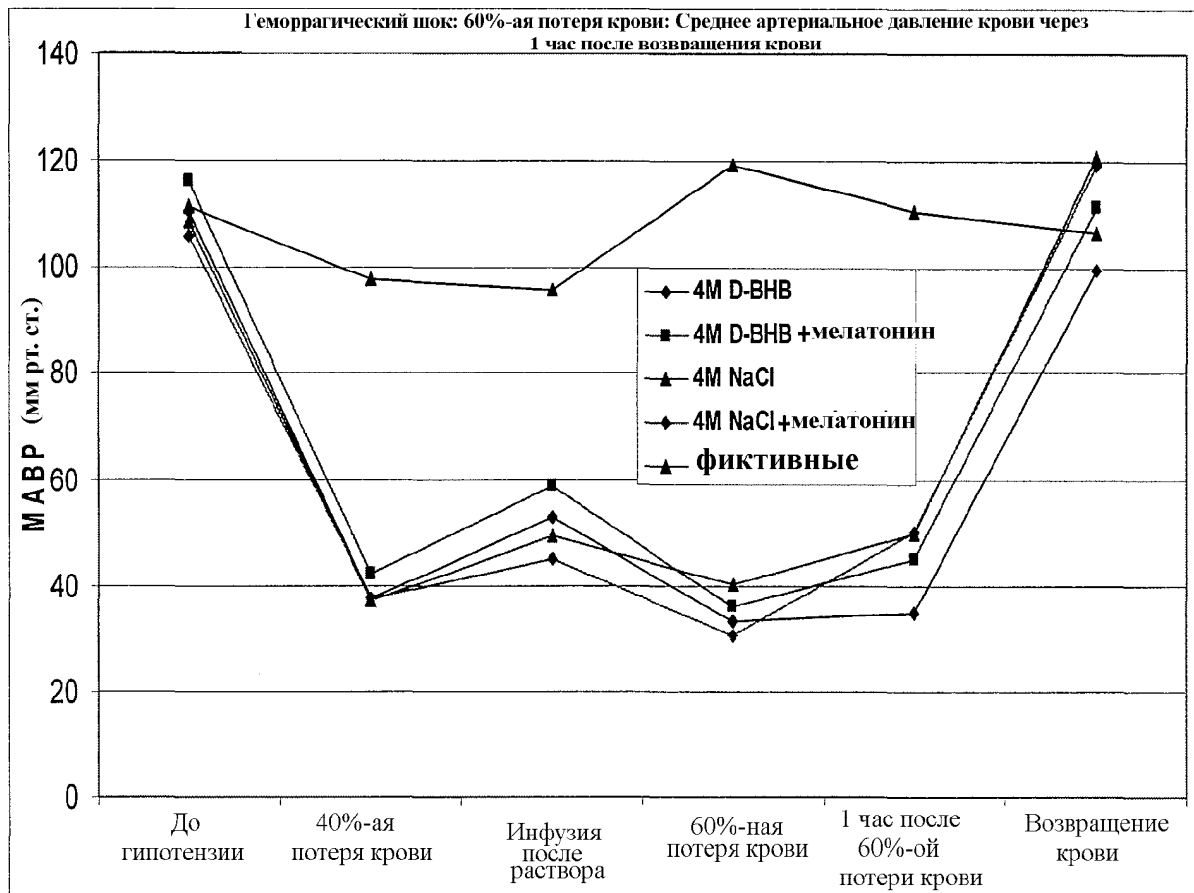
Фиг. 13



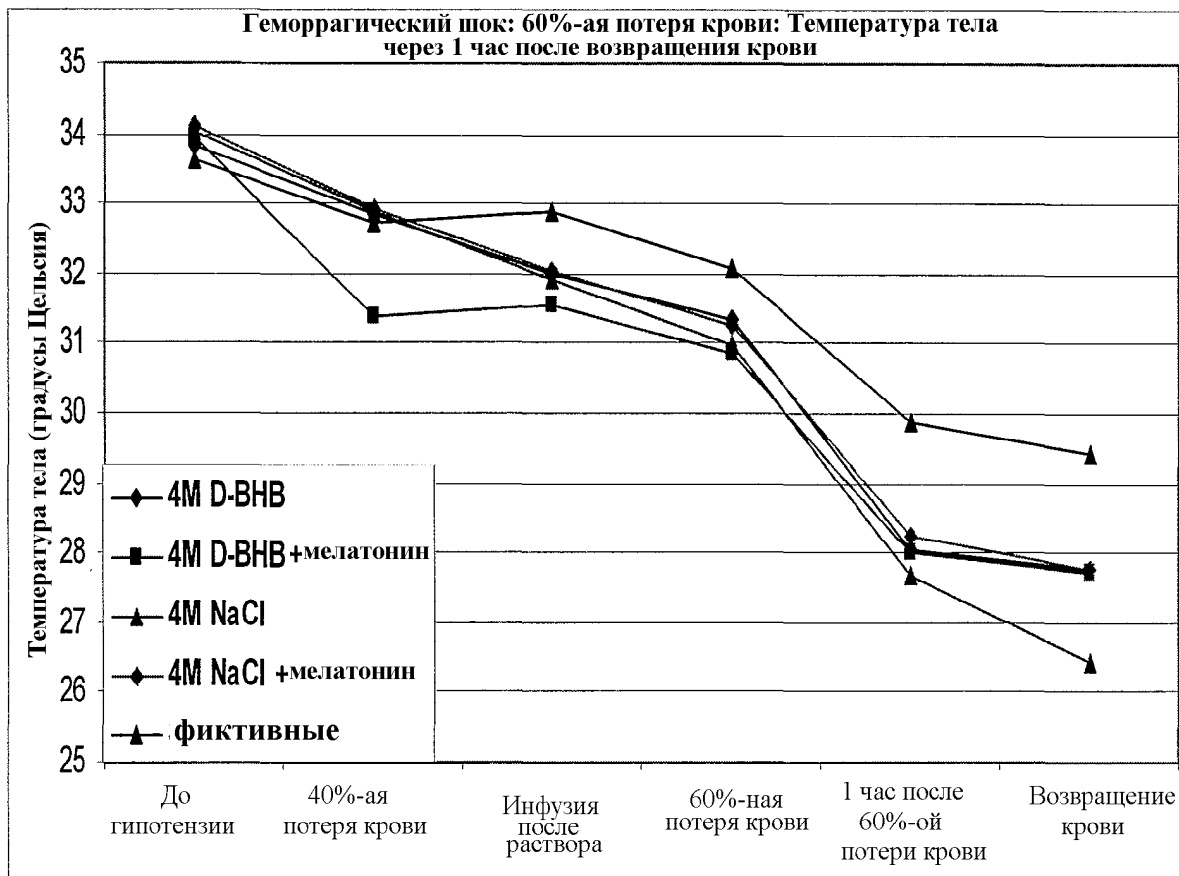
Фиг. 14



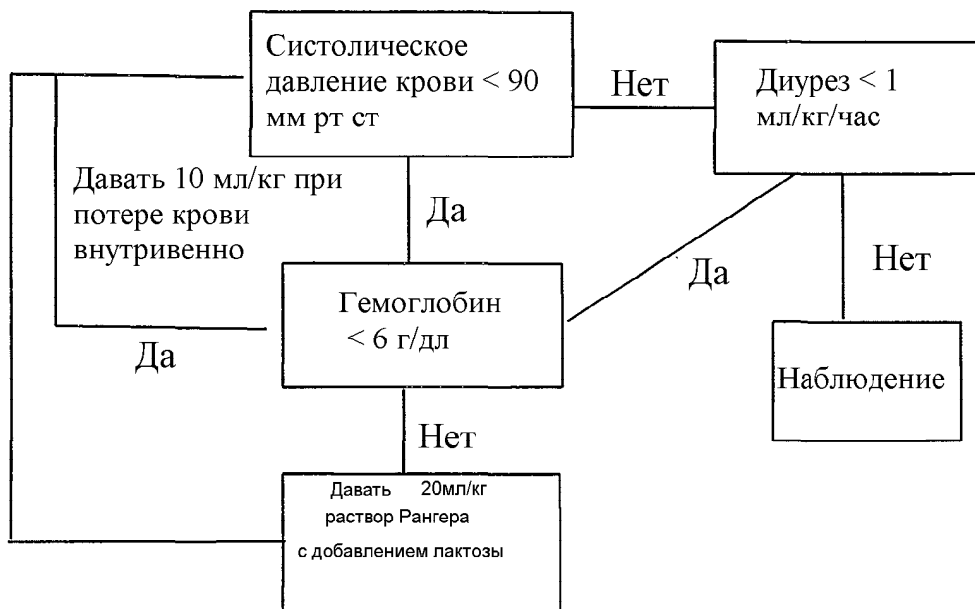
Фиг. 15



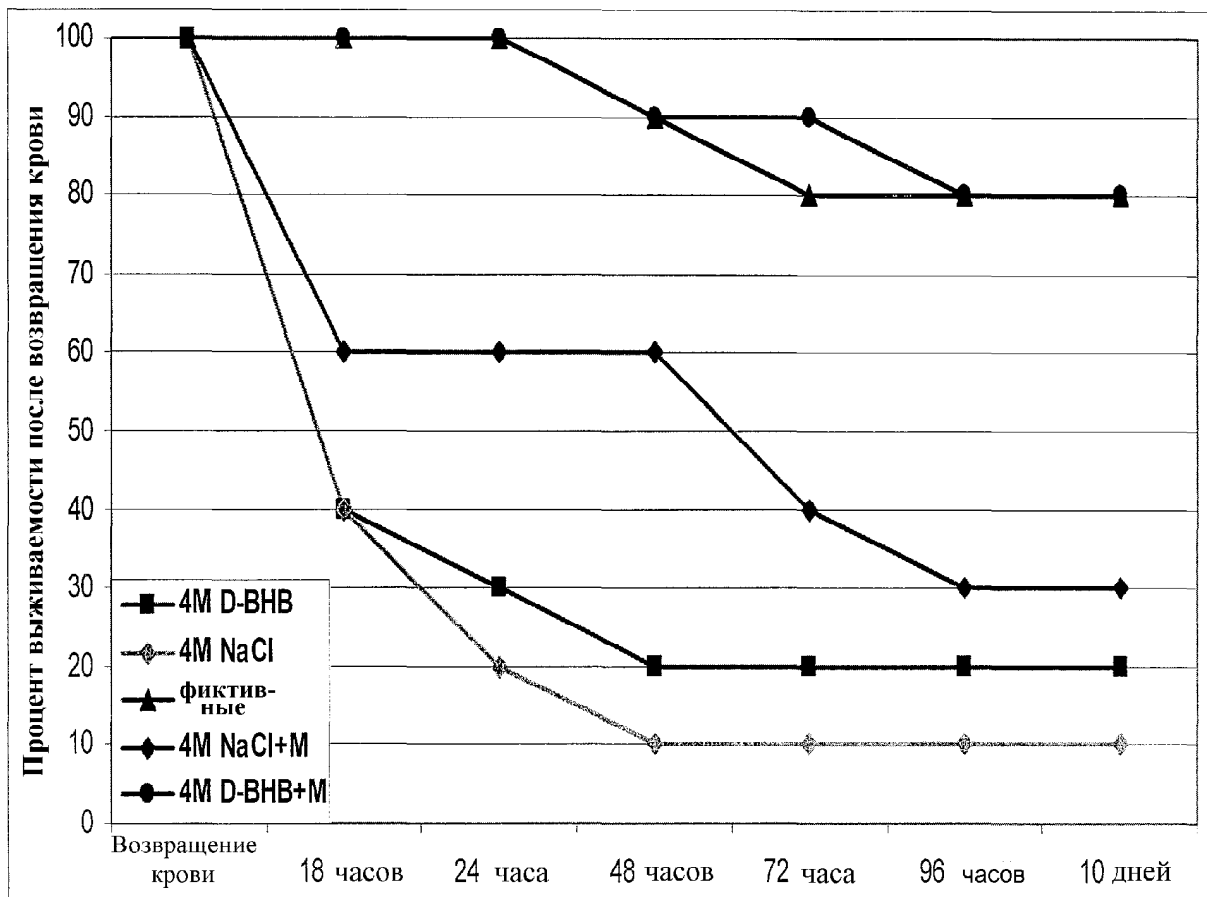
Фиг. 16



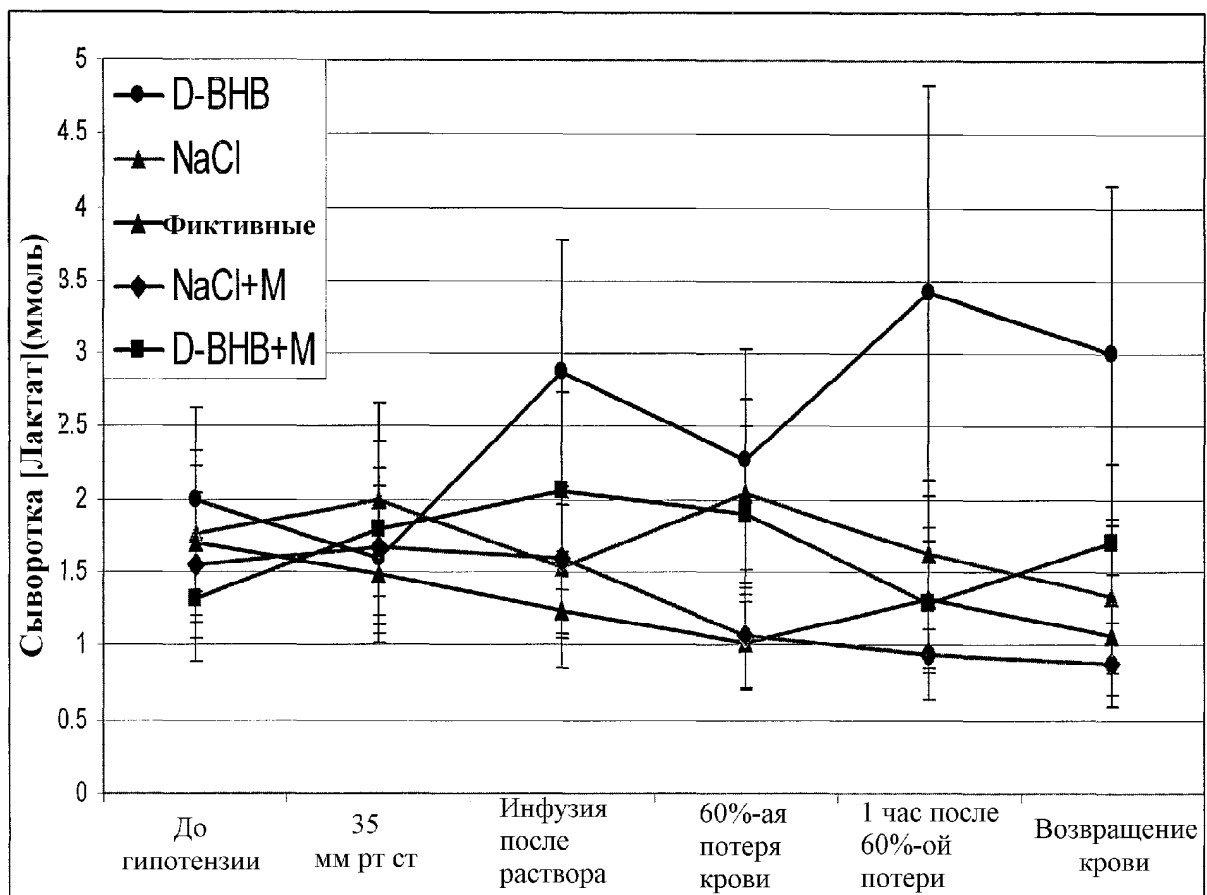
Фиг. 17



Фиг. 18

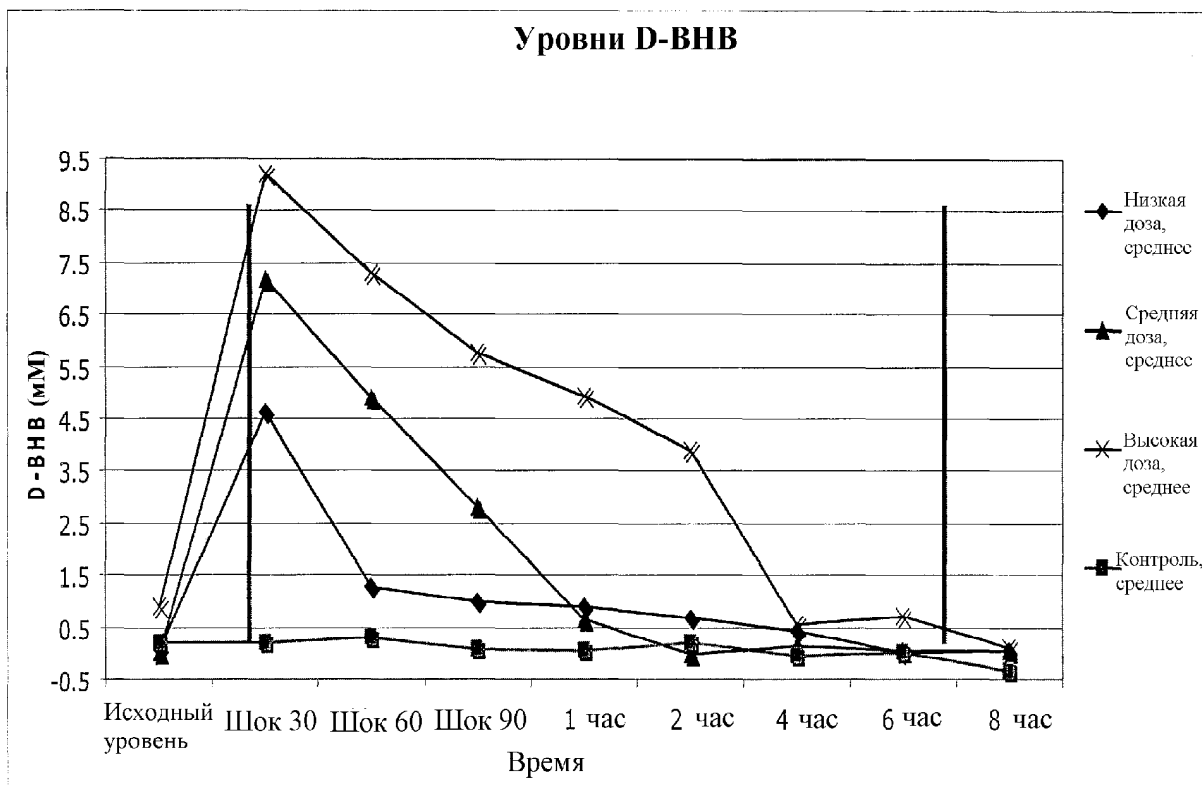


Фиг. 19

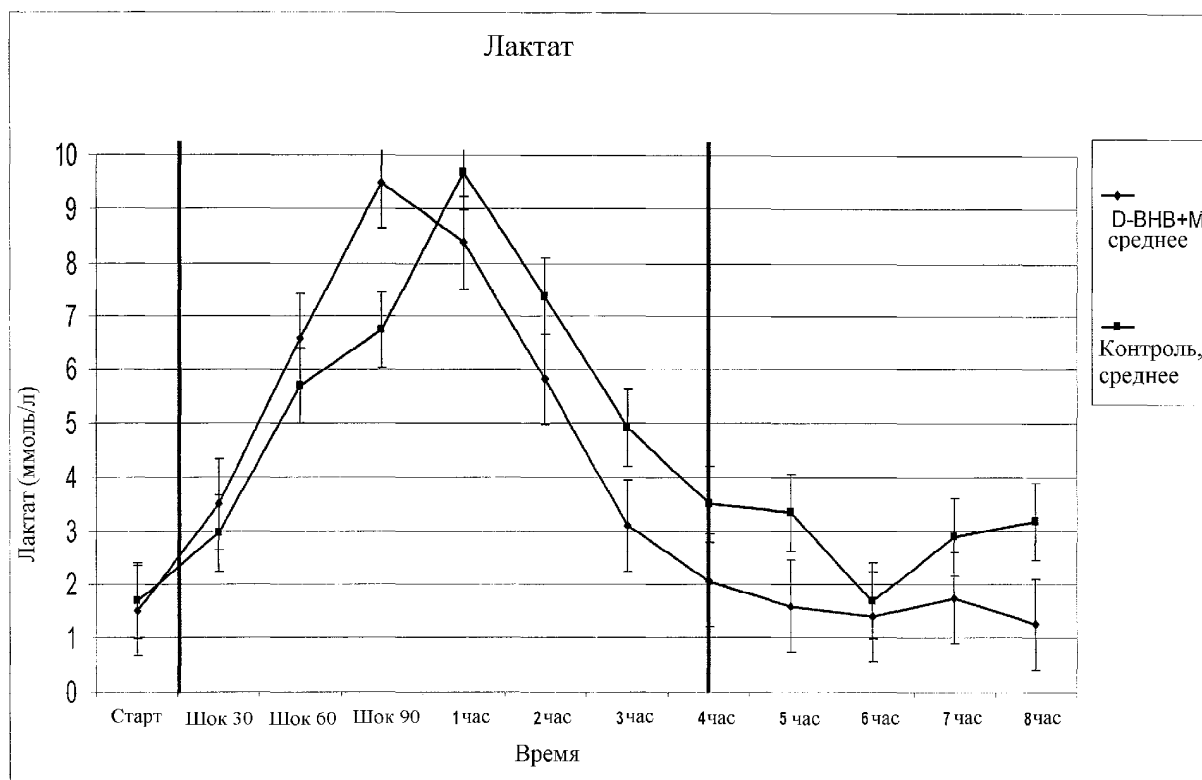


Фиг. 20

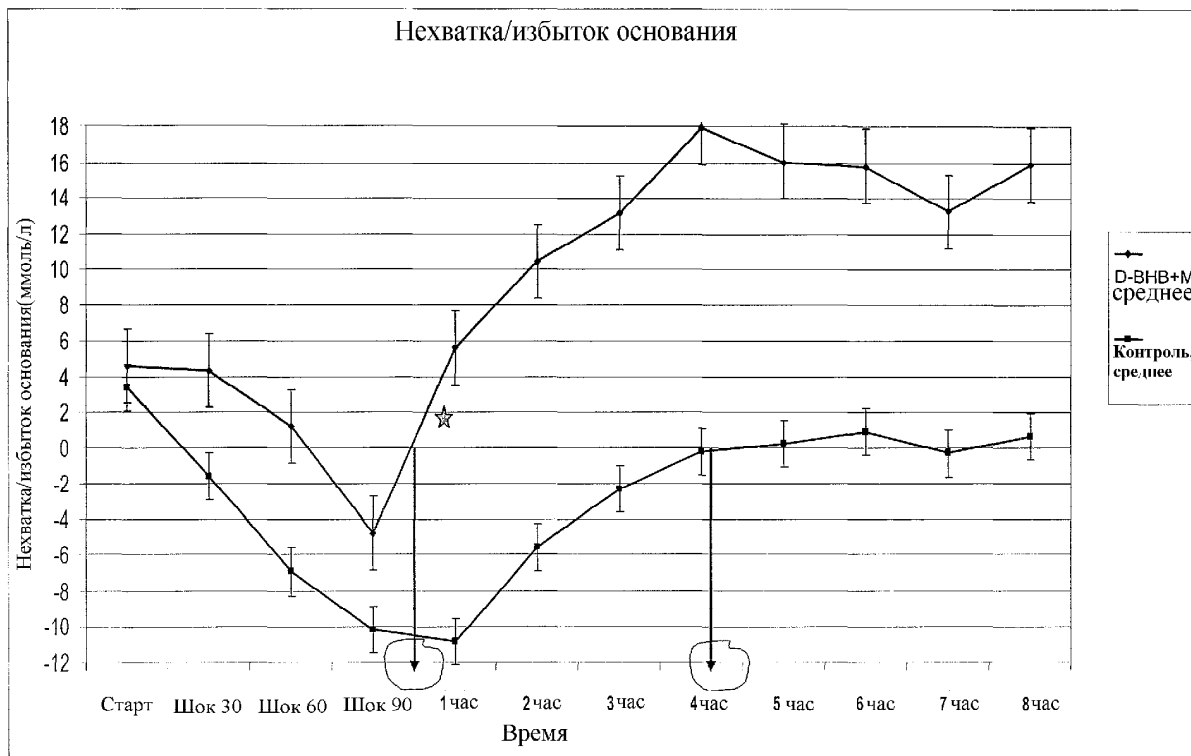
Уровни ВНВ



Фиг. 21

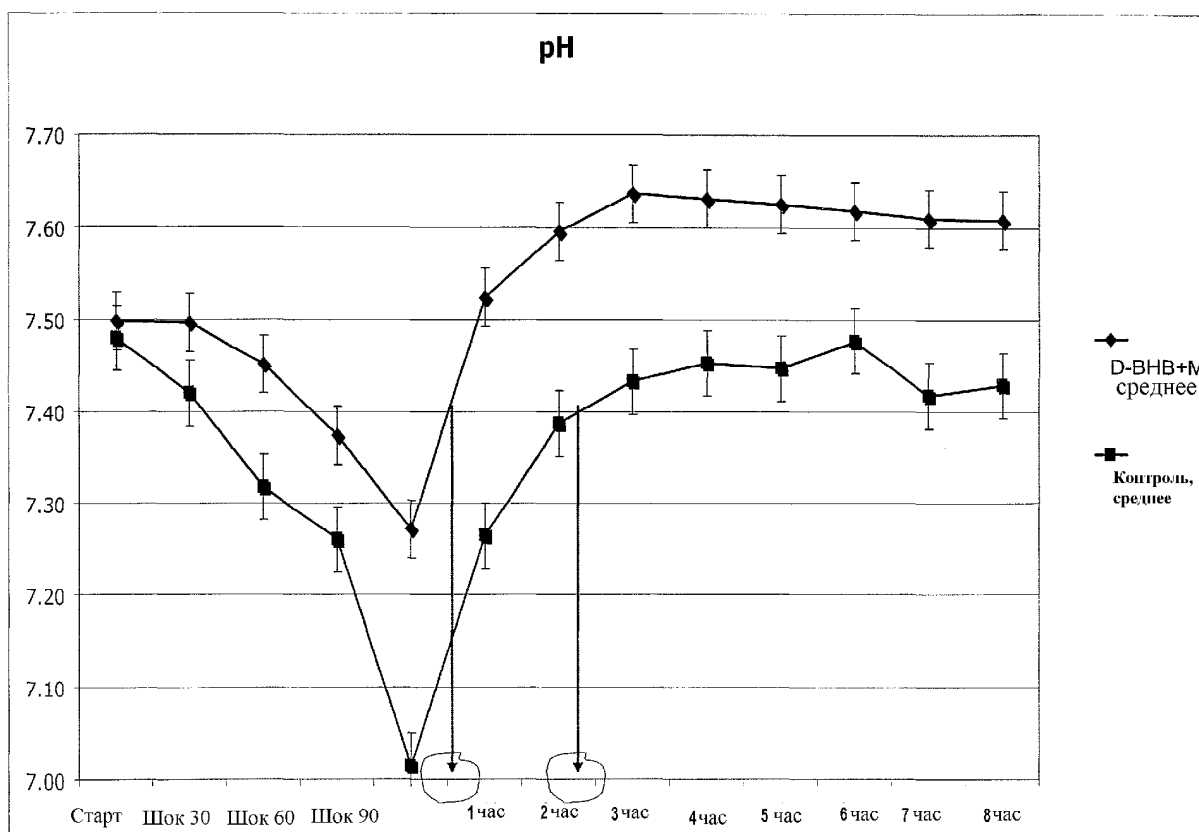


Фиг. 22

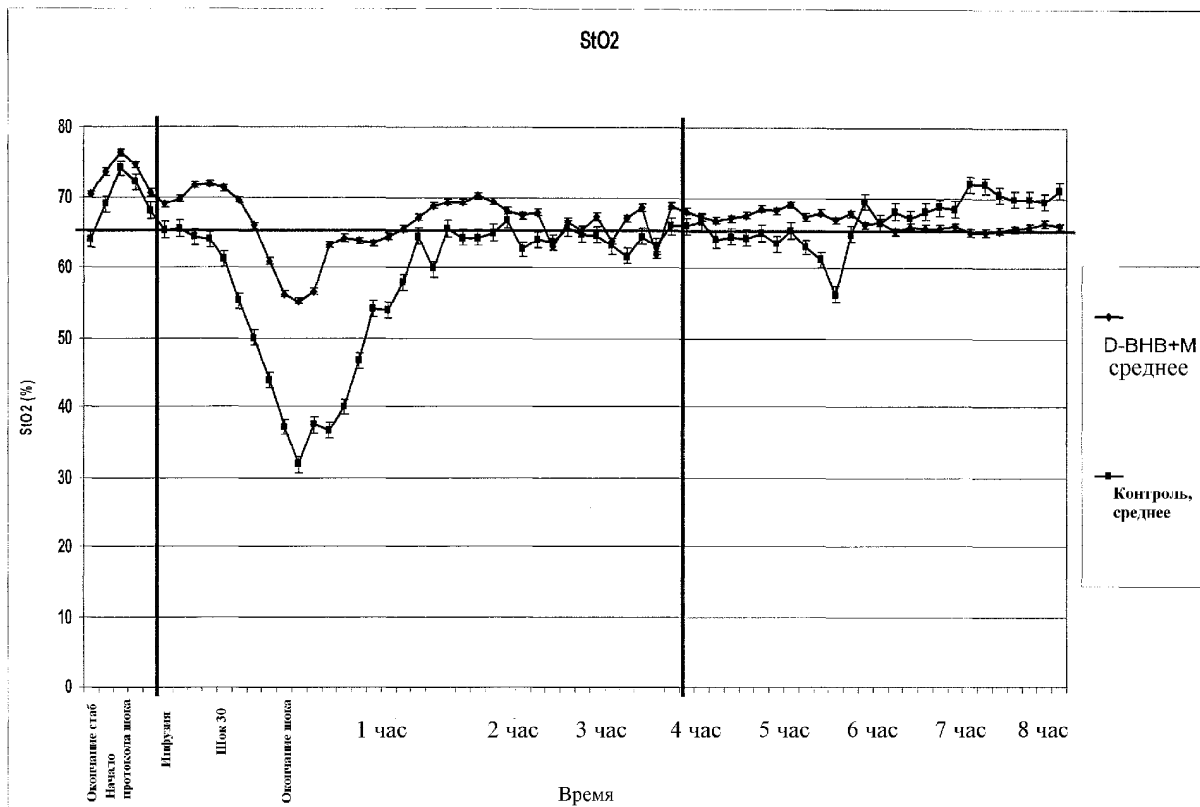


☆ Р-значение < 0,05

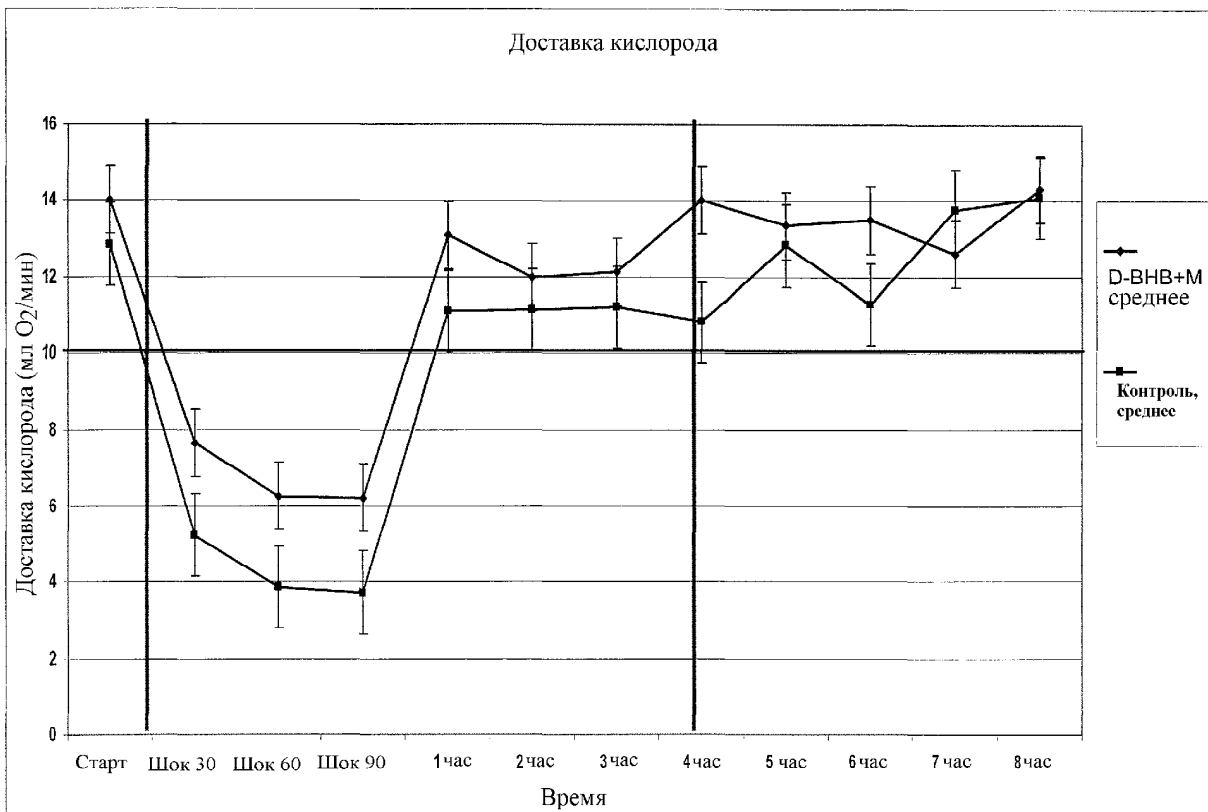
Фиг. 23



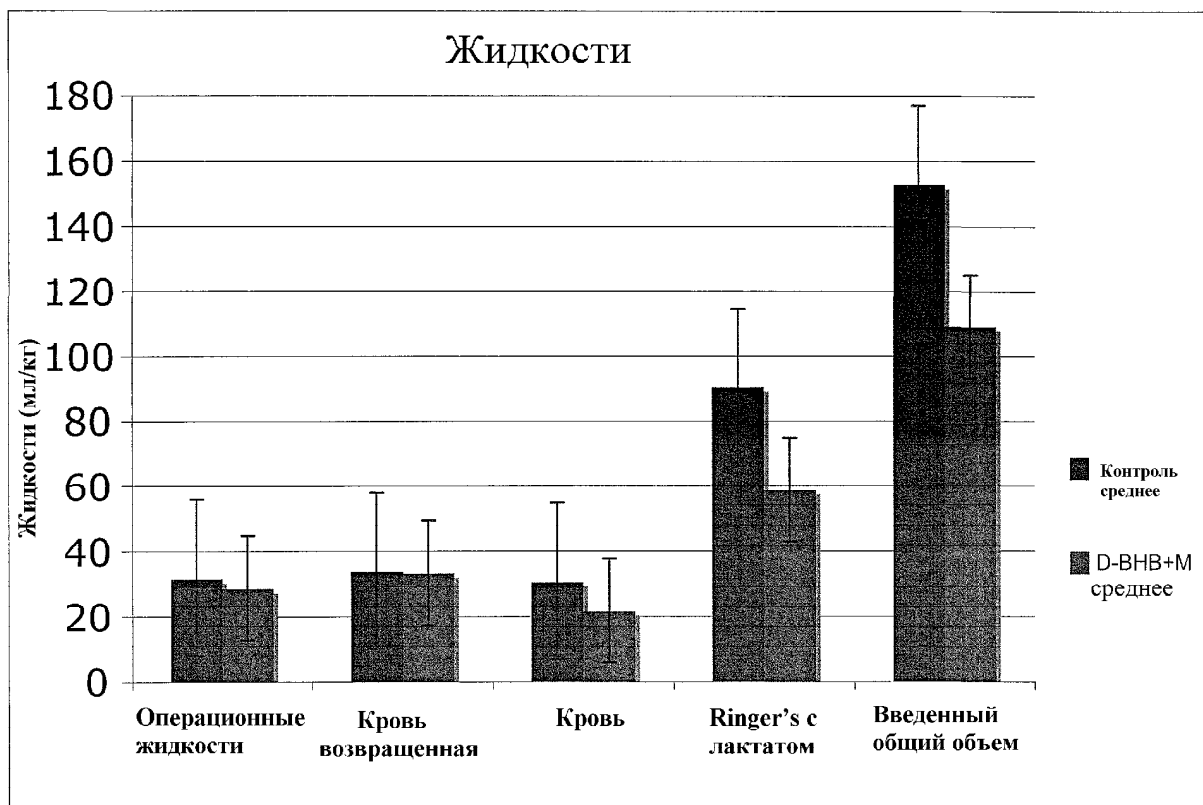
Фиг. 24



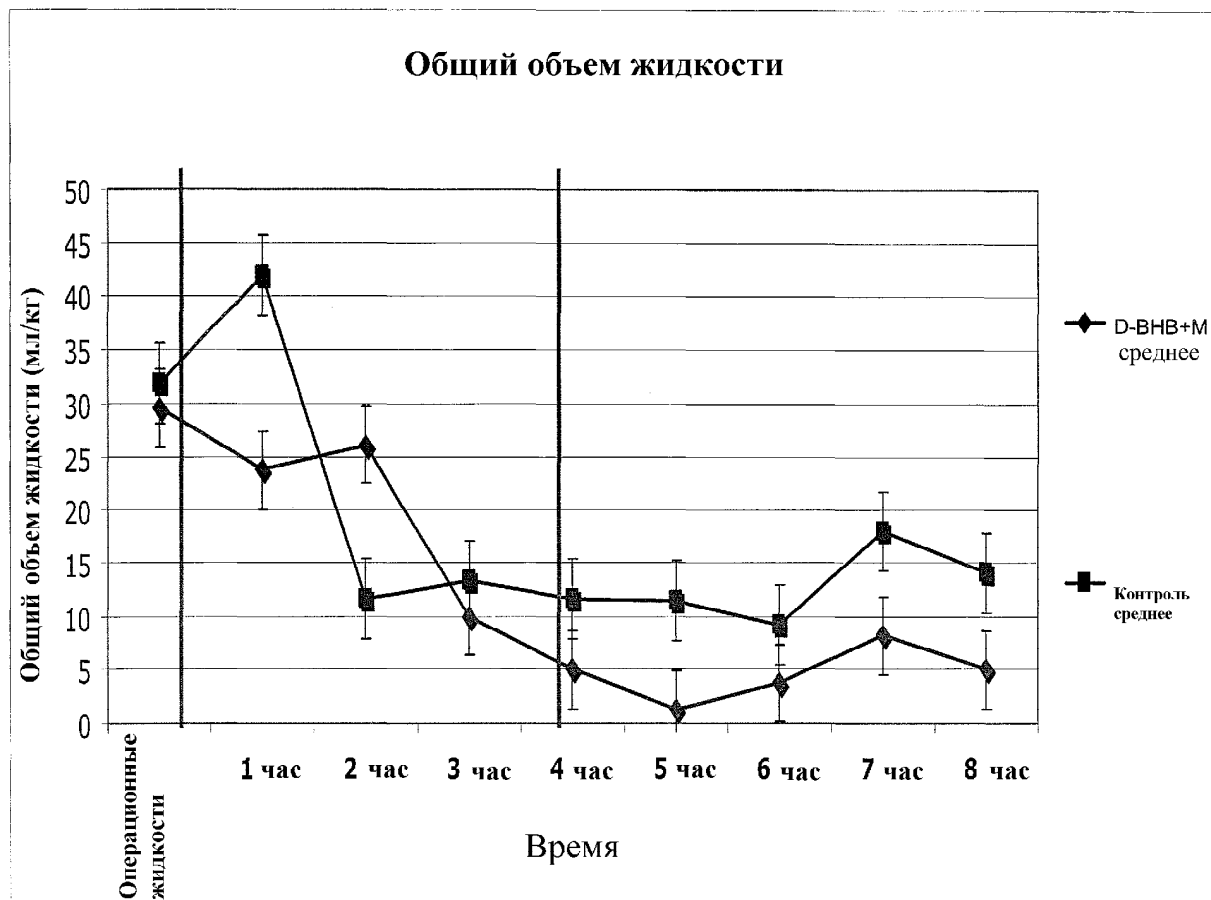
Фиг. 25



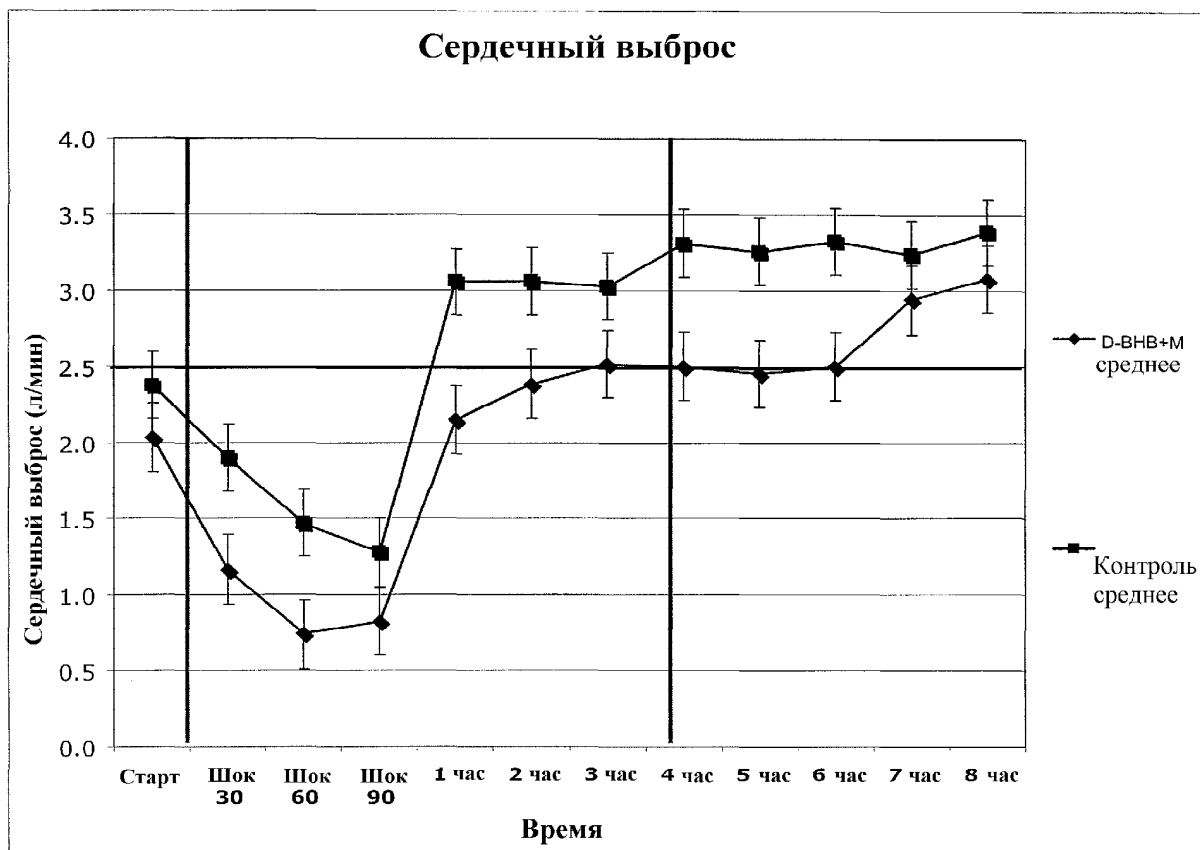
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29

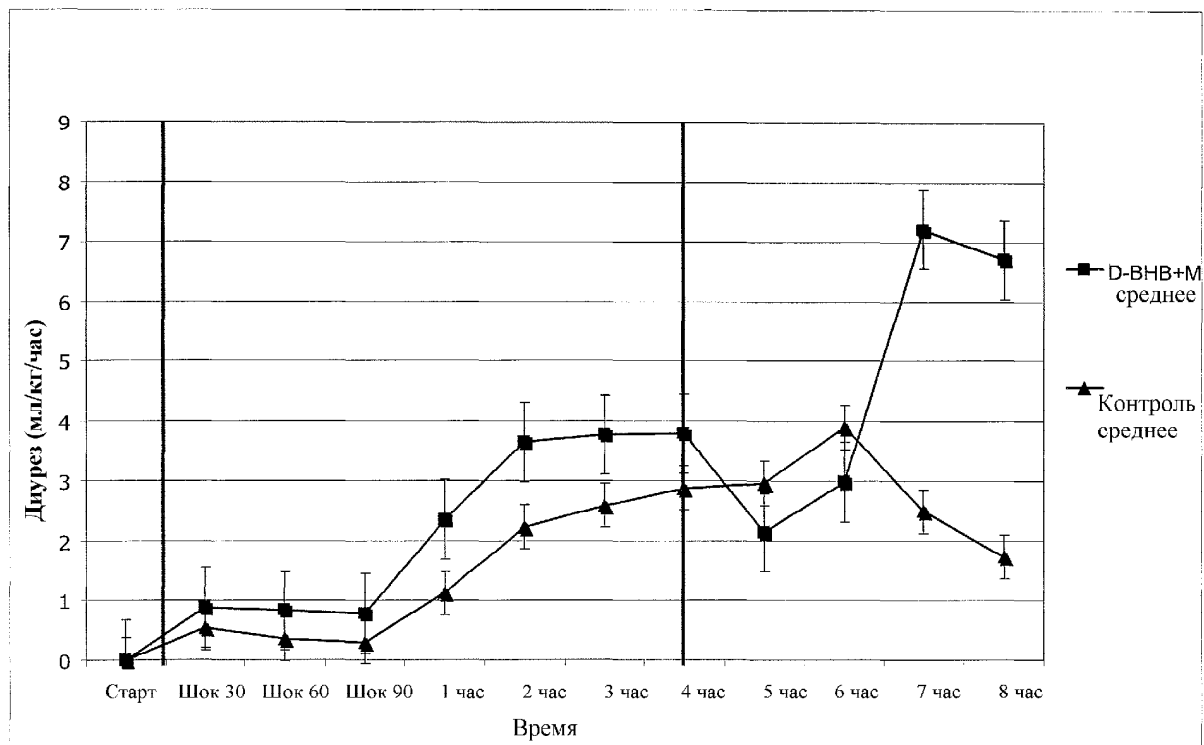


Фиг. 30



Фиг. 31

Диурез



Фиг. 32