MD 1558 G2

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Protecţia Proprietăţii Industriale

(11) 1558 (13) G2

(51) Int. Cl.[7]: A 61 K 37/ 24, 37/36;
A 61 P 13/12 // (A 61
K 37/24, A 61 K 37:02)
(A 61 K 37/36, A 61
K 37:24)

(12) BREVET DE INVENŢIE

(21) Nr. depozit: 96-0244
(22) Data depozit: 1993.09.15
(31) Nr.: 07/949,594
(32) Data: 1992.09.22
(33) Ţara: US
(41) Data publicării cererii:
1998.06.30. BOPI nr. 6/1998
(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului:
2000.11.30, BOPI nr. 11/2000
(85) 1996.06.25
(86) PCT/US93/08734, 1993.09.15
(87) WO 94/06461; 1994.03.31

(71) Solicitant: GENENTECH, INC., US
(72) Inventatori: CLARK, Ross, G., US
(73) Titular: GENENTECH, INC, US
(74) Mandatar: Simanenkova Tatiana, MD

(54) Metoda de profilaxie a insuficientei renale acute la mamifere cu aplicarea factorului de creştere de tip insulinic IGF-I

(57) Rezumat:

1

Invenţia se referă la medicină, şi anume la terapie.

Esenţa metodei constă în aceea că mamiferului, inclusiv omului, i se administrează o cantitate eficientă a factorului de creştere de tip insulinic IGF-I. Administrarea IGF-I poate fi efectuată în combinaţie cu o proteină de aglutinare IGF şi/sau

2

cu o cantitate eficientă de hormon de creştere. Preferabil in calitate de IGF-I se foloseşte IGF-I uman.

Revendicări: 19

Figuri: 21

MD 1558 G2

Descriere:

Invenţia se referă la medicină, şi anume la o metodă de prevenire sau ameliorare a insuficienţei renale acute la mamifere. Insuficienţa renală acută poate fi provocată de reducerea fluxului sanguin renal sau de nefrotoxinele, care cauzează necroza celulelor şi reduc funcţia rinichilor.

Este cunoscut că factorul de creştere de tip insulinic I (IGF-1) poate majora fluxul plasmei renale şi rata filtraţiei glomerulare. Într-adevăr, IGF-1 se depistează în cazul majorării filtraţiei glomerulare şi fluxului plasmei renale (Guler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2868-2872, 1989) şi la stimularea transportului renal de fosfat şi plasmă 1,25-dihidroxivitamina D_3 (Caverzacio et al., Endocrinol., 127: 453-459, 1990). Ulterior, o singură infuzie de scurtă durată de IGF la şobolani ce au indurat foame in decurs de 60-72 ore cauzează o creştere stabilă a ratei filtraţiei glomerulare (Hirschberg and Koppel, J. Clin. Invest., 83: 326-330, 1989 şi Hirschberg et al., J. Clin. Invest., 87: 1200-1206, 1991), iar administrarea IGF-1 oamenilor sporeşte rata filtraţiei glomerulare şi fluxul plasmei renale (Norman et al., Clin. Sci., 78: 445-450, 1990). In plus, IGF apare la regenerarea ţesutului renal în insuficienţa renală acută postischemică (Coimbra Am. J. Physiol., 259: F438, 1990) şi după deteriorările cauzate de nefrotoxina clorură de mercur.

Este cunoscută folosirea IGF-1 pentru tratamentul bolilor de rinichi (Guler et al., Acta Endocrinol., 121: 101-106, 1989; Trends in Endocrinology and Metabolism, 254-260, v. 1, No. 5, Elsevier Science Pub. Co., 1990 şi Patent US 5 106 832, 1992). Administrarea descrisă a IGF-1 oamenilor măreşte viteza filtrării glomerulare şi circulaţia renală.

Insuficienţa renală acută (IRA) complică evoluţia afecţiunii la circa 5% din toţi pacienţii internaţi în spital şi la 20% pacienţi cu tratament intensiv. La 1% din toate cazurile de spitalizare se observă că insuficienţele renale sunt severe, determinând creşterea riscului total de sucombare de şase ori.

Sunt cunoscute metode de profilaxie a IRA cu ajutorul preparatelor medicinale.

Terapia curentă include diagnosticul precoce şi tratamentul de susţinere, care include echilibrul fluid, homeostaza electrolitică, dializa pentru oarecare nefrotoxine implicate şi monitorizarea precisă [1]. In timpul acestei ultime faze, care poate dura săptămâni, pacientul se supune unui risc înalt. Există necesitatea elaborării unui medicament, care ar preveni survenirea IRA în primă instanţă sau, cel puţin, ameliorarea efectelor acesteia.

Problema pe care o rezolvă invenţia este crearea unei metode noi de profilaxie a IRA şi lărgirea spectrului de medicamente aplicate pentru prevenirea sau minimalizarea IRA la mamiferele care sunt supuse riscului de apariţie a IRA.

Problema se soluţionează prin aceea că metoda propusă de profilaxie a insuficienţei renale acute la mamifere cu risc mărit al apariţiei IRA include administrarea mamiferului a unei cantităţi eficiente de factor de creştere de tip insulinic IGF-1.

Este de asemenea posibilă combinarea IGF-1 cu IGF-proteină aglutinantă, drept care serveşte IGFBP-3 sau administrarea eficientă adăugătoare a unei cantităţi de hormon de creştere.

Cantitatea eficientă de IGF-1 constituie 0,01...1 mg/kg/zi.

Metoda propusă poate fi aplicată şi în cazurile în care IRA apare ca rezultat al afecţiunii renale ischemice, în timpul operaţiei la cord, în timpul transplantării rinichiului, administrând IGF-1 inaintea şi/sau în timpul transplantării, la fel ca urmare a afecţiunii cu nefrotoxină.

Se propune aplicarea unei cantităţi eficiente de IGF-1 pentru profilaxia insuficienţei renale acute.

Totodată este posibilă şi combinarea IGF-1 cu IGF-proteină aglutinantă, drept care se ia IGFBP-3, precum şi combinarea cu o cantitate eficientă de hormon de creştere.

Cantitatea eficientă de IGF-1 constituie 0,01...1 mg/kg/zi.

Administrarea IGF-1 se propune de asemenea să fie executată continuu, totodată cantitatea eficientă constituie 1...50 μg/kg/oră.

Ca rezultat al administrării IGF-1 se obţine:

sporirea ratei de filtraţie glomerulară, a circulaţiei renale, resorbţiei tubulare proximale a fosfatului şi a neogenezei proximale tubulare a glucidelor;

hipertrofia glomerulelor şi a tuburilor proximale;

stimularea transferului renal de fosfat şi a plasmei 1,25 - hidroxivitamina D_3, ce asigură prevenirea sau minimalizarea IRA la mamiferele cu un risc mărit de apariţie a IRA.

Invenţia se explică cu ajutorul desenelor din figuri, care reprezintă:

- fig. 1, graficul nivelurilor azotului ureei din sânge în ischemia renală la iepure şi în reperfuzie, pentru control (pătrate întunecate) şi după 7 zile de tratament cu IGF-1 (romburi deschise);

- fig. 2, graficul nivelurilor creatininei serice în ischemia renală la iepure şi în reperfuzie, pentru control (pătrate întunecate) şi după 7 zile de tratament cu IGF-1 (romburi deschise);

- fig. 3, graficul greutăţii zilnice a iepurilor trataţi cu des-IGF-1 şi ocluzionaţi-control, după o perioadă de şapte zile, cu pătratele întunecate cu punct - fiind normală; cu romb deschis cu punct - in ocluzie plus des-IGF-1, cu romb intunecat - in ocluzie - control şi cu romb întunecat cu punct deschis - în caz de laparotomie, netrataţi. Des-IGF-1 este similară cu IGF-1;

- fig. 4, graficul greutăţii organice la iepurii trataţi cu des-IGF-1 şi ocluzionaţi-control: a rinichilor (intunecat), splinei (cu diagonală) şi a inimii (cu două tipuri de diagonale). Analiza valorii variantei (ANOVA) p este semnificativă pentru rinichi (0,0004) (controlul □[Cl] Nr.=7, des Nr.=9), şi pentru splină (0,028) (Cl. Nr.=7, des Nr.=8), însă nesemnificativă statistic pentru inimă (0,84) (Cl Nr.=6, des Nr.=4);

- fig. 5, graficul nivelurilor creatininei serice la iepurii ocluzionaţi, după 7 zile de tratament cu des IGF-1 (pătrate cu linie punctată) şi ocluzionaţi - control (romburi intunecate);

- fig. 6, graficul nivelurilor azotului ureei serice la iepurii ocluzionaţi, după 7 zile de tratament cu des - IGF-1 (pătrate cu linie punctată) şi ocluzionaţi - control (romburi intunecate);

- fig. 7, graficul greutăţilor organelor iepurilor trataţi cu IGF-1 şi controlul, bara întunecată reprezintă rinichii, bara cu linie punctată cordul, bara cu linii orizontale timusul şi bara cu diagonale opuse splina;

- fig. 8, graficul nivelurilor creatininei serice la iepurii ocluzionaţi, după 6 zile de tratament cu IGF-1 (cercuri deschise) şi ocluzionaţi - control (pătrate întunecate);

- fig. 9, graficul nivelurilor azotului ureei serice la iepurii ocluzionaţi, după 6 zile de tratament cu IGF-1 (cercuri deschise) şi ocluzionaţi - control (pătrate întunecate);

- fig. 10, graficul asimilării ^{3}H-p-aminohipuratului (^{3}H-PAH) după 90 minute de către ţesutul cortical renal. Pătratul deschis reprezintă norma, triunghiul cu linie punctată reprezintă ocluzionaţi+des-IGF-1; cercul cu linie punctată reprezintă ocluzionaţi+IGF-1 şi pătratul pe jumătate intunecat reprezintă ocluzionaţi - control;

- fig. 11, graficul asimilării ^{14}C-TEA după 90 minute de către ţesutul cortical renal. Triunghiul cu linie punctată reprezintă ocluzionaţi-des-IGF-1; pătratul deschis reprezintă norma; cercul cu linie punctată reprezintă ocluzionaţi+IGF-1 şi pătratul pe jumătate întunecat reprezintă ocluzionaţi - control;

- fig. 12, graficul dependenţei greutăţii rinichilor de doza des-IGF-1 (pătratul întunecat) şi IGF-1 (pătratul deschis) la şobolanii hipofizectomizaţi. Şobolanii au fost trataţi timp de 7 zile prin intermediul minipompelor subcutanate cu infuzii, ce conţin câte 6 doze de IGF-1 sau des-IGF-1, apoi au fost sacrificaţi şi au fost cântăriţi ambii rinichi obţinuţi;

- fig. 13, graficul majorării masei corporale a şobolanilor după utilizarea timp de 7 zile a excipientului (cercuri) sau a des-IGF-1 (pătrate);

- fig. 14, graficul nivelurilor azotului ureei din sângele şobolanilor după utilizarea timp de 7 zile a excipientului (cercuri) sau a des-IGF-1 (pătrate);

- fig. 15, graficul nivelurilor creatininei sanguine la şobolani după utilizarea timp de 7 zile a excipientului (cercuri) sau a des-IGF-1 (pătrate);

- fig. 16, graficul creşterii greutăţii şobolanilor după 4 zile în control (cercuri), după 30 minute de clampare (cercuri) şi după 60 minute de clampare (pătrate);

- fig. 17, graficul azotului ureei în sângele şobolanilor după 4 zile în control (cercuri), după 30 minute de clampare (cercuri) şi după 60 minute de clampare (pătrate);

- fig. 18, graficul creatininei la şobolani după 4 zile în control (cercuri), după 30 minute de clampare (cercuri) şi după 60 minute de clampare (pătrate);

- fig. 19, graficul creşterii greutăţii şobolanilor după 4 zile, având leziuni renale (60 minute de clampare), care au fost trataţi cum urmează: simulare (cercuri deschise), clemă (pătrate deschise); clemă+IGF-1 (pătrate întunecate) şi clemă+des-IGF-1 (cercuri intunecate);

- fig. 20, graficul nivelurilor azotului ureei din sângele şobolanilor la 4 zile după evoluţia leziunii renale (60 minute de clampare), care au fost trataţi cum urmează: simulare (cercuri deschise); clemă (pătrate deschise); clemă+IGF-1 (pătrate întunecate) şi clemă+des-IGF-1 (cercuri intunecate);

- fig. 21, graficul creatininei sanguine la şobolani la 4 zile după evoluţia leziunii renale (60 minute de clampare), care au fost trataţi cum urmează: simulare (cercuri deschise); clemă (pătrate deschise); clemă+IGF-1 (pătrate întunecate) şi clemă+des-IGF-1 (cercuri intunecate).

Descrierea realizărilor preferabile

"Insuficienţa renală acută" sau "IRA", utilizată în prezenta invenţie se referă la o condiţie cauzată de reducerea fluxului sanguin (leziune ischemică renală), provocată de destrucţia tubului proximal renal sau de către nefrotoxinele ce produc necroza celulelor.

Acest termen cuprinde IRA moderată şi severă, incluzând necroza tubulară acută, care cauzează oligurie şi azotemie, şi insuficienţa renală neoligurică. Se caracterizează prin aşa simptome, cum ar fi retenţia produselor azotului, lichidelor, electroliţilor şi catabolism accelerat. In cazul unei IRA severe, moartea survine dacă nu se aplică terapia cu hemodializă.

IRA provoacă deteriorarea rinichilor, care se caracterizează prin edem tubular acut, necroza sau, în afară de aceasta, edem interstiţial sau tubular, după leziune ischemică. Ischemia renală poate fi provocată de procedeele, ce includ scăderea presiunii sângelui, în particular, hipotensiunea de lungă durată, bypass-ul cardiac sau aortic sau transplantul de rinichi. În plus, mai poate fi indusă, de exemplu, de deteriorări fizice sau de traumatismul rinichilor. Astfel, IGF-1 poate fi utilizat pentru a menţine integritatea rinichilor până la sau în timpul transplantului de rinichi.

Exemplele nefrotoxinelor, care provoacă necroza celulei includ: cefalosporine, metale grele toxice, substanţe de contrast administrate intravenos, antibiotice, cum ar fi aminoglicozidele, de exemplu, tobramicina, gentamicina, amicacina şi streptomicina, şi antifungicidele, cum ar fi amfotericina.

"Profilaxia" IRA se referă la prevenirea sau cel puţin ameliorarea IRA.

Mamiferele "cu risc" pentru IRA includ mamiferele importante din punct de vedere economic, cum ar fi bovinele, ovinele şi porcinele, la fel şi oamenii, ultimii fiind preferaţi, care sunt predispuşi să manifeste IRA, aceasta fiind declanşată de operaţiile sau transplantele realizate sau de boli.

Termenul "IGF-1", utilizat în prezenta invenţie, se referă la factorul de creştere de tip insulinic pentru orice specii, incluzând bovine, ovine, porcine, cai, păsări şi, preponderent, oameni, în succesiune nativă sau în formă variată şi de la orice sursă, sau naturală, sintetică sau recombinată. Preferată, în prezenta invenţie, pentru uz animal este acea formă de IGF-1, necesară pentru tratamentul speciilor in particular, cum ar fi IGF-1 de porcine pentru tratamentul porcilor, IGF-1 de ovine pentru tratamentul oilor, IGF-1 de bovine pentru tratamentul vitelor mari cornute, etc. Preferată, în prezenta invenţie, pentru uz uman este succesiunea nativă, matură de IGF-1, mai preferată fără metionină N-terminală, preparată, de exemplu, prin procesul descris în EP 230869, publicaţia din 5 august 1987, EP 128733, publicaţia din 19 decembrie 1984, sau EP 288451, publicaţia din 26 octombrie 1988. Succesiunea nativă de IGF-1, mai preferată, este produsă recombinat şi furnizată de la Genentech, Inc., South San Francisco, SA pentru investigaţiile clinice. De asemenea este preferată penru uz IGF-1, care posedă o activitate specifică ce depăşeşte circa 14.000 unităţi (mg, determinată prin testarea cu utilizarea membranelor placentei, cum ar fi cele furnizate de la Kabi Gen AB, Stockholm, Suedia).

Cele mai preferate variante de IGF-1 sunt acele descrise în Brevet nr. 5077276 U.S., publicaţia din 31 decembrie 1991; PCT WO 87/01038, publicaţia din 26 februarie 1987 şi PCT WO 89/05822, publicaţia din 29 iunie 1989, în care, de exemplu, cel puţin reziduul acidului glutamic este absent în poziţia 3 de la N-terminal al moleculei mature sau cele cu ştergere de până la cinci aminoacizi la N-terminal. Cea mai preferată variantă are şterşi primii trei aminoacizi de la N-terminal (variante desemnate ca IGF a creierului, t IGF-1; des (1-3)- IGF-1 sau des- IGF-1).

B. Modurile de realizare a invenţiei

Profilaxia se efectuează prin tratamentul cu IGF-1 până la sau în perioada în care este posibilă apariţia deteriorării rinichilor (IRA) sau deja a apărut, adică anterior evoluţiei deteriorării şi include perioada în care este posibilă apariţia deteriorării sau evoluţia acesteia.

De exemplu, tratamentul IGF-1 pentru prevenirea sau ameliorarea deteriorării rinichiului sau pentru prevenirea reacţiei de eliminare a tratamentului de rinichi începe până la sau în timp ce este posibilă apariţia deteriorării rinichiului sau la apariţie, adică până la sau în timpul chirurgiei selective in intervenţiile chirurgicale pe coronariene sau torace, până la sau în timpul administrării nefrotoxinei sau până la sau în timpul introducerii transplantului de rinichi.

Dacă tratamentul se efectuează până la o posibilă apariţie a deteriorării rinichiului sau la apariţia acesteia, este preferată administrarea cu circa 48 ore la 0,5 ore înainte de posibila apariţie a deteriorării sau de apariţia acesteia opţional, este indicată continuarea administrării IGF-1 după posibila apariţie a IRA sau după apariţia acesteia. Simptomele clinice ale deteriorării rinichilor, care în general nu apar imediat în timpul deteriorării, dar pot apărea într-o perioadă de până la 24 ore şi mai mult, includ creşterea nivelului de azot al ureei din sânge sau a creatininei sau reducerea transportului ionilor organici.

In diverse scopuri, IGF-1 se administrează direct mamiferelor prin orice modalităţi potrivite, incluzând administrarea parenterală, şi poate fi administrat local sau sistemic. Calea specifică de administrare va depinde, de exemplu, de anamneza bolii, incluzand orice efecte secundare anterioare sau anticipate la utilizarea IGF-1. Exemplele de administrare parenterală includ: administrarea subcutanată, intramusculară, intravenoasă, intraarterială sau intraperitoneală.

Este preferată administrarea prin infuzii continue (utilizând, de exemplu, minipompele, cum ar fi pompele osmotice şi calea de administrare subcutanată) sau într-o singură injecţie, sau în multiple injecţii (de exemplu, 2-4), de exemplu, intravenoase sau subcutanate, până la sau în timpul iniţierii leziunilor asemănătoare ictusului, care provoacă deteriorarea rinichilor.

Pentru IGF-1 este preferată administrarea subcutanată. De asemenea, mai poate fi administrat sub formă de globule solitare sau sub formă de depozite cu eliberare lentă.

În plus, este potrivită administrarea IGF-1 împreună cu una sau mai multe proteine de cuplare cu el, de exemplu, cele cunoscute curent, de exemplu, IGFBP-1; IGFBP-2; IGFBP-3; IGFBP-4; IGFBP-5 sau IGFBP-6. Pentru administrare, este potrivită de asemenea cuplarea IGF-1 la un receptor sau anticorp sau la un fragment de anticorp. Proteina liantă preferată pentru IGF-1 este IGFBP-3, care este descrisă în WO 89/09268, publicaţie din 5 octombrie 1989 şi de către Martin şi Baxter în J. Biol. Chem., 261: 8754-8760 (1986). Această proteină IGFBP-3 glicoxilată reprezintă un component acid stabil cu circa 53 Kd pe un gel SDS-PAGE nereducător al complexului glicoproteic cu 125-150 Kd din plasma umană, care conţine cei mai mulţi IGF-s şi reglată, de asemenea, de către GH. Administrarea proteinei cuplate a IGF cu IGF-1 se efectuează convenabil prin metoda descrisă în publicaţia internaţională WO 92/13556 din 20 august 1992. Succint, IGF-1 şi IGFBP se administrează în cantităţi eficiente prin injectarea bolurilor subcutanate cu raţia molară de la circa 0,5:1 la circa 3:1, de preferinţă, de circa 1:1.

Compoziţia IGF-1 poate fi utilizată în terapeutică, fiind formulată şi dozată succesiv cu o practică medicală bună, luând în consideraţie starea clinică individuală a pacientului (în special, efectele secundare la administrarea numai a IGF-1), locul administrării compoziţiei IGF-1, metoda de administrare, regimul de administrare şi alţi factori cunoscuţi de medicii practicieni. "Cantitatea eficientă" de IGF-1, în aceste scopuri, este determinată din următoarele considerente.

În linii generale, cantitatea totală farmacologic eficientă de IGF-1 se administrează parenteral în doză de la circa 1 mg/kg/zi la 10 mg/kg/zi de greutate corporală a pacientului, cu toate că, cum s-a indicat mai sus, aceasta o va hotărî terapeutul. Mai preferată este acea doză care conţine cel puţin 0,01 mg/kg/zi, cea mai preferată, pentru uz uman, este de până la circa 0,01 şi 1 mg/kg/zi de hormon. Dacă se administrează continuu, IGF-1 tipic se administrează în doze de circa 1 mg/kg/oră la circa 50 mg/kg/oră sau în 1-4 injecţii pe zi sau în infuzii subcutanate continue, de exemplu, utilizând o minipompă. De asemenea se pot folosi pungi cu soluţii pentru administrare intravenoasă.

Factorul cheie în selectarea dozei potrivite este rezultatul obţinut, care se apreciază prin regenerarea epiteliului tubului proximal, prevenirea catabolismului accelerat, prevenirea acumulării excesive de produse azotate, de lichide şi electroliţi, etc.

De asemenea este convenabilă administrarea IGF-1 în sisteme cu eliberare susţinută. Exemplele de compoziţii cu eliberare susţinută potrivite includ: matricele polimere semipermeabile sub formă de articole modelate, de exemplu, filme sau microcapsule. Matricele cu eliberare susţinută includ poliactide (Brevet nr. 3773919 U.S.; EP 58481); copolimeri ai acidului L-glutamic şi gama-etil-L-glutamat (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 [1983]), poli (2-hidroxietilmetacrilat) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15; 167-277 [1981] şi Langer, Chem. Tech., 12; 98-105 [1982]), etilen-vinil-acetat (Langer et al., supra) sau acid poli-D-(-)-3-hidroxibutiric (EP 133, 988). Compoziţiile IGF-1 cu eliberare susţinută includ de asemenea captatori lipozomali ai IGF-1. Lipozomii cu conţinut de IGF-1 se prepară prin metode cunoscute în: DE 3218121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985); Hewang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949; EP 142641; Japanese Pat. Appln. 83-118008; Br. nr. 4485045; 4544545 U.S. şi EP 102324. De obicei, lipozomii sunt de tip unilamelar cu dimensiuni mici (cca 200-800 Ĺ), cu lipide constituite din cca 30% mol colesterol, proporţiile selectate fiind ajustate pentru un tratament cu IGF-1 optim.

Pentru administrare parenterală, în una din realizări, IGF-1 se formulează prin amestecare, având un grad dezirabil de puritate, intr-o formă unică dozată (soluţie, suspensie sau emulsie) cu un purtător farmaceutic acceptabil, de exemplu, cu unul din recipienţi în doze şi concentraţii netoxice, şi compatibil cu alte ingrediente ale formulării. De exemplu, formularea preferată nu trebuie să includă agenţi de oxidare şi alţi compuşi, care se ştie că deteriorează polipeptidele.

In general, formulările se prepară prin contactul uniform şi intim al IGF-1 cu purtătorul lichid sau solid, fin divizat sau cu ambii. Apoi, dacă este necesar, produsului i se dă o formă dezirabilă. Purtătorul preferat este un purtător parenteral, mai preferată este soluţia izotonică cu sângele recipientului. Exemplele de astfel de purtători includ: apa, soluţia salină, soluţia Ringer şi soluţia de dextroză. În prezenta invenţie se folosesc, de asemenea, purtători, ce nu conţin apă, cum ar fi uleiurile nevolatile şi etil oleatul, de asemenea şi lipozomii.

Purtătorul potrivit conţine o cantitate minoră de aditivi, cum ar fi substanţele, care măresc izotonicitatea şi stabilitatea chimică. Aşa materiale sunt netoxice pentru recipienţi, în dozele şi concentraţiile utilizate, şi includ tampoane, cum ar fi de fosfat, citrat succinat; acid acetic şi alţi acizi organici sau sărurile acestora; antioxidanţi, cum ar fi acidul ascorbic; polipeptide (cel puţin cca 10 reziduuri micromoleculare, de exemplu, poliarginina sau tripeptidele; proteinele, cum ar fi albumina serică, gelatina sau imunoglobulinele; polimeri hidrofili, cum ar fi polivinilpirolidona; aminoacizi, cum ar fi glicina, acidul glutamic; acidul aspartic sau arginina; monozaharide, dizaharide şi alte hidrocarburi, inclusiv celuloza sau derivaţii lor, glucoza, manoza sau dextrinele; agenţi helatici, cum ar fi EDTA; alcooli zaharoşi, cum ar fi manitol sau sorbitol; contraioni, cum ar fi sodiu; şi/sau surfactanţi neionici, cum ar fi polisorbaţii, poloxamerii.

IGF-1 se formulează tipic în aşa purtători cu o concentraţie de la cca 0,1 mg/ml la 100 mg/ml, de preferinţă, 1...10 mg/ml, şi pH de la cca 3 la 8. Pe tot parcursul IGF-1 este, in general, stabil la pH nu mai mare de cca 6; des - (1-3)-IGF-1 este stabil de la cca 3,2 la 5. Trebuie de înţeles, că la utilizarea unor anumiţi excipienţi, purtători sau agenţi de stabilizare predecesori, se pot forma săruri ale IGF-1.

In plus, IGF-1, de preferinţă IGF-1 pe tot parcursul, formulat potrivit cu un purtător acceptabil, formează o compoziţie farmaceutică, de preferinţă una, care nu conţine celule. În una din variantele de realizare, tamponul utilizat pentru formulare depinde de faptul dacă compoziţia se va folosi imediat în amestec sau se va depozita pentru o utilizare ulterioară. Dacă se prevede utilizarea imediată, IGF-1, pe tot parcursul, poate fi formulat în manitol, glicină şi fosfat; pH 7,4. Dacă acest amestec se depozitează, el se formulează în tampon cu pH de cca 6, cum ar fi citrat, cu un surfactant care măreşte solubilitatea IGF-1 in acest pH, cum ar fi 0,1% polisorbat 20 sau poloxamer 188. Preparatul final poate fi un lichid stabil sau o substanţă solidă liofilizată.

IGF-1, utilizat pentru administrare terapeutică, trebuie să fie steril. Sterilizarea este uşor efectuată prin filtrarea prin membrane de filtrare sterile (de exemplu, membrane de 0,2 μm).

Compoziţiile terapeutice cu IGF-1, în general, se plasează în containere cu orificiu de acces steril, de exemplu, în pungi sau în fiole cu soluţii intravenoase utilate cu un dop, care poate fi străpuns cu un ac de injecţie hipodermic.

De obicei, IGF-1 se depozitează în containere de o doză sau de multe doze, de exemplu, în ampule şi fiole sigilate, sub formă de soluţie apoasă sau formulări lipofilizate pentru reconstrucţie. Exemplu de formulare liofilizată: fiole de 10 ml se umplu cu 5 ml soluţie apoasă de IGF-1 1% (w/v) sterilizată prin filtrare şi amestecul ce rezultă se liofilizează. Soluţia pentru infuzie se prepară prin reconstituţia IGF-1 liofilizat, utilizând apă bacteriostatică pentru injecţii.

GH, de asemenea, poate fi administrat mamiferelor, tratate cu IGF-1, conform prezentei invenţii. GH poate fi administrat în orice perioadă de timp potrivită în acest scop. Astfel, GH poate fi administrat până la sau în timp ce este posibilă apariţia sau a apărut IRA şi este, de asemenea, potrivită administrarea sau continuarea administrării după posibila apariţie a IRA sau după apariţia acesteia.

Dacă se utilizează GH, el poate fi administrat separat de IGF-1 sau asociat cu IGF-1, în doză şi utilizând administrarea potrivită, similar utilizării pentru IGF-1 de mai sus, tipic cel puţin 0,1 mg/kg/zi. Se constată că hGH este stabil la pH înalt, analogic IGF-1 , de exemplu, 7,4...7,8.

De asemenea, este potrivită administrarea GH împreună cu una sau mai multe proteine ce îl cuplează. O aşa proteină liantă bine caracterizată este proteina cuplată cu hormonul de creştere (GHBP) cu afinitate înaltă, constituind domeniul extracelular al receptorilor GH, care circulă în sânge şi funcţionează la unele specii ca GHBP (Yme şi Herington, Mol. Cell. Endocrinol., 41: 153 (1985); Smith şi Talamantes, Endocrinology, 123: 1489-1494 [1988]; Emtner şi Roos, Acta Endocrinologica (Copenh). 122: 296-302 [1990]), inclusiv la oameni. Baumann et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 134-141 (1986); EP 366710, publicaţia din 9 mai 1990; Herington et al., J. Clin. Invest., 77: 1817-1823 (1986); Leung et al., Nature, 330: 537-543 (1987).

BP secundă cu afinitate joasă pentru GH de asemenea este descrisă ca lipsită de relaţii structurale cu GH receptor. Baumann şi Shaw, J. Clin. Endocrinol. Metab., 70: 680-686 (1990).

Dozele ambilor GH şi IGF-1 se pot micşora, dacă se utilizează împreună, comparativ cu cele când IGF-1 se administrează singur.

Se relevă, că medicii practicieni divizează dozele ambilor IGF-1 şi GH, luând în consideraţie efectele secundare cunoscute, care pot apărea în cadrul tratamentului cu aceşti hormoni. Pentru h GH aceste efecte secundare includ retenţia sodiului şi expansiunea volumului extracelular (Ikkos et al., Acta Endocrinol. (Copenhagen), 32: 341-361 [1959]; Biglieri et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 21: 361-370 [1961]), precum şi hiperinsulinemia şi hiperglicemia. Cel mai grav efect secundar al IGF-1

este hipoglicemia. Guler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989), supra. Intr-adevăr, combinarea IGF-1 şi GH poate exercita reducerea apariţiei efectelor secundare ale ambilor (de exemplu, hipoglicemia pentru IGF-1 şi hiperinsulinismul pentru GH) şi restabilirea secreţiei GH, care este supresată de către IGF-1.

In plus, IGF-1 poate fi administrat in combinare cu alte remedii terapeutice pentru prevenirea sau ameliorarea în continuare a leziunii ischemice sau nefrotoxice. Substanţele utile în acest scop includ superoxidul dismutazei şi antagoniştii (de exemplu, anticorpii) VLA-1, LFA-1, Mac-1, p. 150, 95, EGF-α, etc. Aceşti agenţi pot fi administraţi concomitent, până la sau după administrarea IGF-1 şi pot fi administraţi pe aceleaşi căi sau pe căi diferite de cele de administrare ale IGF-1. Această invenţie va fi mai bine înţeleasă prin referinţa la exemplele ce urmează. Însă ele nu trebuie privite ca limitând invenţia.

Exemplul 1

Primul studiu in cadrul tratamentului iepurilor

Introducere

Pentru a monitoriza la animale progresarea IRA şi reacţia lor la supraveghere de durată, la excipient sau IGF-1 sau des-IGF-1, s-au măsurat nivelurile de BUN şi creatinină în ser. Nivelurile creatininei, produsului metabolic al activităţii musculare, rămân relativ constante în plasmă, măsurările corespunzătoare nu sunt efectuate după excitare maximă. Mărimile azotului ureei sunt mai puţin întemeiate, fiind afectate de starea metabolică, dietă, hidratare şi alţi factori. Cu toate acestea, epurarea (clearancul) azotului ureei şi creatininei, descreşte semnificativ în insuficienţa renală şi leziunea renală acută, independent de starea metabolică sau fiziologică. Aceşti doi constituenţi sunt acceptaţi ca indicatori ai funcţiei renale şi concentraţiile lor în sânge reflectă alţi compuşi dăunători în nefropatii. Creatinina este filtrată de către rinichi, însă nu secretată sau reabsorbită; azotul ureei este filtrat şi reabsorbit pasiv. Împreună ei estimează funcţia renală şi sunt parametrii-cheie de laborator în monitorizarea insuficienţei renale.

Protocol

IGF-1 uman recombinant (disponibil comercial de la KaliGen AB, Stokholm, Suedia (activitatea specifică > 14,000 U/mg, prin testare cu radioreceptor, utilizând membranele placentare) sau disponibil pentru investigaţii clinice de la Genetech, Inc., South San Francisco) se utilizează în toate experienţele cu IGF-1, detaliate in exemple. Pentru acest exemplu, 5 mg/ml IGF-1 se dizolvă în 10 mM tampon citrat şi 126 mM NaCl, ph 6,0.

Pe parcursul studiului s-au folosit iepuri albi de New Zeeland, masculi, cu greutatea corporală 2,5-3,0 kg. După o premedicaţie cu 0,1 ml Hypnorm™ şi anestezie intravenoasă (i.v.) 1,0 mg Fluanisone™ alfa factor al necrozei tumorii şi 0,135 mg Fentanyl/ml soluţie se colectează 1 ml de sange dintr-o arteră a urechii. Sângele se plasează imediat in tuburi de separare a serului cu Vacutainer™. Apoi animalele se anesteziază total cu 0,68 ml/kg Hypnorm™, administrat intramuscular (i.m.). Fiind fixate de o scândură, animalele se pregătesc pentru operaţie, în condiţii sterile: se tunde blana de pe abdomen, se prelucrează câmpul de operaţie cu soluţie de iod, se degresează cu alcool şi apoi iarăşi se prelucrează cu iod. În condiţii sterile, se realizează laparotomia. Folosind un tampon umectat cu soluţie salină, se deplasează intestinele pentru a avea acces la rinichi. Se disecă liber artera renală stângă şi se clampează cu clema Serrefin™ (Baby Dieffenbach Serrefin; Harward Apparatus; Cat. Nr. 52-3241 sau 52-3258). Apoi procedura se repetă pe artera renală dreaptă. După ocluzia ambelor artere renale, se plasează două pompe osmotice Alzet™ (Alza Corporation, Palo Alto, CA, Model 2NL completată cu 2144 µl), ce conţin 5 mg/ml de IGF-1 uman recombinant, pe oricare din părţile cavităţii abdominale. Aceste pompe sunt pregătite astfel încât, fiind amplasate, acţionează imediat. Fiecare pompă livrează 11,75 µl/oră. Astfel fiecare animal primeşte 2,82 mg/zi/animal sau circa 1 mg/kg/zi. Rana în urma laparotomiei se acoperă cu tifon umectat cu soluţie salină şi prosoape sterile. Pe parcursul perioadei de ischemie, timp de 2 ore, anestezia se menţine cu doze suplimentare de Hypnorm™ (0,2-0,5 ml) i.v.

După două ore de ischemie se înlătură clampele. Laparotomia se închide, utilizând sutura 4,0 Prolene™ pentru muşchii abdominali şi 2,0 Prolene™ - pentru piele. Apoi animalele, pentru recuperare, se plasează într-un incubator, încălzit cu apă, pentru tratament intensiv până când se reinstituie o stare stabilă. După aceasta se cazează individual cu acces liber la hrana standard de laborator şi apă din robinet. Operaţia s-a realizat pe un lot de 12 animale in 2 zile: 6 animale (2 de control şi 4 tratate) într-o zi şi 6 animale (3 de control şi 3 tratate) cu 11 zile mai târziu.

Probe de sange

După 24 ore şi apoi fiecare 24 ore, timp de 6 zile, din artera urechii sau din venă se colectează probe de sange - câte 1 ml. Sângele se coagulează în tuburile de separare a serului şi se centrifughează

la 10°C, pentru separarea serului. Se colectează serul, se plasează în tuburile Epindorf şi se păstrează la 20°C până se vor efectua analizele. Această perioadă este de obicei de 24-36 ore (rar mai mult de 48 ore). Probele se dezgheaţă şi cu un analizator centrifug Monarch, modelul 76, se măsoară nivelurile BUN, creatininei serice şi glucozei în sânge.

Analiza statistică

Diferenţele statistice între grupuri au fost evaluate, folosind analiza bilaterală a diferenţei (ANOVA) pentru măsurări repetate, urmate de un test pentru ultima diferenţă semnificativă (LSD), pentru identificarea diferenţelor semnificative între intervalele de timp individuale.

Rezultate

Din lotul de 5 animale de control - toate au supravieţuit 7 zile; un animal, din lotul de 7 animale tratate, a sucombat in ziua a 4-a (a 3-a zi după operaţie). Acest animal, ulterior a fost exclus din studiu.

BUN:

La animalele din lotul de control, înainte de operaţie, BUN constituia 16±0,89 mg/dL, crescând la un maximum de 109±25 mg/dL, in ziua a 4-a, inregistrandu-se astfel o creştere de 5,81 ori (vezi tabelul 1).

Tabelul 1

Valorile BUN la animalele din lotul de control, tratate cu soluţie salină

Ziua nr.	Media	Deviaţiile standard	SEM
1	16,00	2,00	0,89
2	81,80	15,97	7,14
3	106,80	35,60	15,92
4	109,00	56,03	25,06
5	97,60	64,43	28,82
6	86,00	71,83	32,12
7	79,20	72,12	32,25

Animalele randomizate şi tratate cu IGF-1 prezintă niveluri similare preoperatorii de BUN comparativ cu animalele din lotul de control. Creşterea maximă a nivelurilor BUN, la aceste animale, a fost cea mai joasă (73±15,6 mg/dL) în ziua a 3-a (tabelul 2 şi fig. 1). În plus, nivelurile BUN, la aceste animale, au revenit aproape la valorile de control spre ziua a 7-a (vezi tabelul 2).

Tabelul 2

Valorile BUN la animalele tratate cu IGF-1

Ziua nr.	Media	Deviaţiile standard	SEM
1	15,17	2,32	0,95
2	62,17	13,47	5,50
3	73,00	36,90	15,06
4	70,83	46,08	18,81
5	50,33	36,72	14,99
6	30,00	19,18	7,83
7	21,00	9,72	3,97

Concentraţia azotului ureei din sânge, la animalele tratate, este semnificativ mai redusă în ziua a 6-a şi a 7-a (vezi fig. 1).

Creatinina serică

Nu s-au relevat diferenţe semnificative în nivelurile de creatinină serică la animalele de control sau tratate (tabelele 3 şi 4, fig. 2), totuşi aceste valori în ziua a 5-a, a 6-a şi a 7-a, la animalele tratate, constituiau jumătate din valorile la animalele netratate.

Tabelul 3

Valorile creatininei serice la animalele din lotul de control tratate cu soluție salină

Ziua nr.	Media	Deviațiile standard	SEM
1	1,06	0,48	0,22
2	5,16	1,46	0,65
3	5,86	2,43	1,09
4	4,92	2,58	1,15
5	3,96	2,25	1,01
6	2,84	1,51	0,68
7	2,32	0,87	0,39

Tabelul 4

Valorile creatininei serice la animalele tratate cu IGF-1

Ziua nr.	Media	Deviațiile standard	SEM
1	1,03	0,14	0,06
2	4,58	1,60	0,65
3	5,02	2,94	1,20
4	3,75	2,17	0,89
5	2,45	1,31	0,54
6	1,65	0,72	0,29
7	1,27	0,42	0,17

Glucoza din sange

Nivelurile de glucoză din sânge, in ambele loturi, ating cifra de circa 60 mg/dL in primele zile după operație și se mențin la 130-160 mg/dL in ambele loturi, in decursul intregii perioade experimentale. Între cele 2 loturi nu se relevă nici o diferență statistică (tabelele 5 și 6).

Tabelul 5

Nivelurile de glucoză în sânge la animalele din lotul de control

Ziua nr.	Media	Deviațiile standard	SEM
1	182,40	22,23	9,94
2	119,60	13,24	5,92
3	142,60	21,20	9,48
4	155,80	22,61	10,11
5	148,20	34,22	15,30
6	156,60	32,30	14,45
7	165,40	32,75	14,64

Tabelul 6

Nivelurile de glucoză în sânge la animalele tratate cu IGF-1

Ziua nr.	Media	Deviațiile standard	SEM
1	181,00	33,39	13,63
2	124,83	20,44	8,34
3	134,00	10,37	4,23
4	140,83	7,91	3,23
5	134,33	12,56	5,13
6	130,50	14,72	6,01
7	146,00	21,89	8,94

Administrarea IGF-1 în timpul inducției ischemiei renale reduce substanțial nivelurile BUN și, probabil, reduce creatinina serică la iepurii, care au fost supuși ischemiei renale timp de 2 ore, urmată de 6 zile de reperfuzie. Spre ziua a 6-a, nivelurile BUN, la animalele tratate, relevă o revenire la valorile preoperatorii mai rapidă și completă, fiind semnificativ mai joase, comparativ cu cele înregistrate în lotul de control, tratat cu soluție salină. Aceasta indică că IGF-1 este capabil să prevină sau cel puțin să amelioreze deteriorările renale la mamiferele cu risc de IRA.

Exemplul II

Al doilea studiu asupra tratamentului iepurilor

În acest studiu au fost incluşi mai mulţi iepuri şi au fost măsurate nu numai nivelurile BUN şi creatininei, dar, în continuare, a fost evaluată şi funcţia rinichiului, prin studierea asimilării ionilor organici de către celulele tubului proximal, în scopul evaluării *in vitro* a funcţiei celulelor renale. Transportul cationilor de către tuburile renale a fost demonstrat la multe animale, inclusiv la iepuri şi la oameni (Besseghir et al., Am. J. Physiol., 241: F308-F314 [1981]; Rennick et al., Am. J. Physiol., 232: F443-F447 [1977]), şi are un rol esenţial în excreţia cationilor endogeni şi sintetici.

Pentru a pătrunde în lumenul tubular, moleculele trebuie să penetreze ambele membrane - bazolaterală şi celulară (BLM şi BBM, respectiv). Trecerea cationilor de gradientul electric, transportarea prin BBM este un contraschimb electroneutru între cation şi proton (Dantler et al., Am. J. Physiol., 256: F290-F297 (1989); Montrose-Rafizadeh et al., Am. J. Physiol., 257: F243-251 (1989)).

Conform schemei *in vitro* descrise mai jos, cationul concentrat, cel mai probabil, va trece prin BLM în mod similar, însă trecerea inversă prin BBM contratransportori secundari gradientului de concentrare este de asemenea posibilă. Secreţia anionilor reprezintă o combinare a transportului activ al BLM cu o difuzie ulterioară în fluidul lumenului. Tune et al., Am. J. Physiol., 217: 1057-1063 (1969).

În studiul prezent, aceşti transportori s-au studiat *in vitro* cu ^{14}C-TEA (tetraetilamoniu) şi ^{3}H-PAH. TEA nu se exclude din spaţiul intracelular, astfel serveşte ca o bună măsură pentru capacitatea asimilării. PAH este metabolizat, însă numai lent. Fragmentul tehnic de cortex, utilizat pentru prima dată în 1930, se utilizează pe larg abia în ultimul deceniu. Câteva variabile trebuie controlate: grosimea ţesutului, conţinutul mediu de oxigen, nivelurile medii de ioni şi agitarea în perioada de incubare. In acest exemplu, s-a ţinut cont de aceste variabile, aşa cum este descris în cele ce urmează.

Greutatea organelor şi greutatea corporală în lot, la fel şi nivelurile azotului ureei şi creatininei serice, sunt inscrise ca media in lot ±SEM. Datele pentru rezultatele fragmentului cortical sunt înscrise ca media fragmentului/mediu pentru timpul dat şi ieşire. Aceste rapoarte s-au adunat apoi in lot, pentru a obţine media şi SEM pentru fiecare lot. Valorile p pentru unu şi doi factori sunt raportate pentru ANOVA. Adesea, variabilele pentru factorul 2 ANOVA sunt: ziua tratamentului şi valoarea măsurării particulare contra lotului sub tratament. În cazurile în care se utilizează ziua, ziua 0 nu se include, deoarece aceasta este o măsurare de control şi în calcule uneori se exclude prima zi (intrucat acţiunea medicamentului este mai evidentă în zilele ce urmează) şi ultima zi a tratamentului (deoarece acei iepuri, care au supravieţuit până la ultima zi, de regulă, revin la starea aproape normală, iar acei care au murit de insuficienţă renală, se exclud din studiu).

In aceste exemple s-au studiat efectele IGF-1 şi ale moleculei trunchiate, des-IGF-1 asupra funcţiei rinichiului după deteriorarea rinichiului, provocată de ischemia rinichiului. În continuare, se arată că ambii - IGF-1 şi des-IGF-1, - sunt agenţi eficienţi în regenerarea rinichilor după deteriorarea acestora.

Protocol

Pregătirea animalului model

Iepurii albi de New Zeeland, masculi (2-3 kg), se aclimatizează la o îngrijire facilă timp de câteva zile şi apoi se includ in studiu. Ei se introduc intr-o cameră cu control asupra temperaturii şi luminii, fiind hrăniţi cu nucuşoarele iepurelui şi apă *ad libitum*.

Loturile experimentale

Animalele au fost repartizate in mod arbitrar in unul din cele 6 grupuri de tratament: ocluzia arterei renale plus IGF-1 (IRA+IGF-1) sau plus des-IGF-1 (IRA+des-IGF-1) sau ocluzia arterei renale plus excipient (IRA-control); numai laparotomie plus IGF-1 (LAP+IGF-1) sau numai laparotomie plus excipient (LAP-control), de asemenea a fost inclus un lot de iepuri, care nu au fost trataţi (Norma). În studiu au fost incluşi numai acei iepuri, care au supravieţuit până în ziua a doua, fiind zilnic flebotomizaţi şi cântăriţi. În plus, animalele ce supravieţuiesc până în ziua a 7-a se sacrifică, fiind obţinute greutăţile organelor umede, rinichii fiind luaţi pentru măsurările asimilării ionilor de către ţesutul cortical. Din cauza mortalităţii şi sincronizării investigaţiilor asociate, rinichii de la 5 animale tratate cu IGF-1 şi 3 animale tratate cu excipient au fost excluşi din studiul privind asimilarea ionilor (vezi tabelul ce urmează pentru loturi, abrevieri şi mărimea probei).

Tratamentul loturilor	Chimia serului* (Nr.=)	Fragment cortical** (Nr.=)
I Ocluzia arterei renale + Excipient (IRA-control)	11	6

II Ocluzia arterei renale+des-IGF-1 (IRA+des-IGF-1)	10	3
III Ocluzia arterei renale+IGF-1 (IRA+ IGF-1)	13	10
IV Laparotomia+IGF-1 (LAP+ IGF-1)	3	3
V Laparotomia + Excipient (LAP-control)	2	2
Normă. Netrataţi control (Normă)	2	4

* Include iepurii care nu au murit in sau inainte de ziua a 2-a.

** Include iepuri care au supravieţuit până la ziua a 7-a, cand experimentul cu fragmentul cortical a luat sfârşit.

Prepararea animalului model

Se înregistrează greutăţile preoperatorii şi, în continuare, sângele (1 cc) se colectează dintr-o arteră a urechii. Asociaţi câte 6, iepurii au fost anesteziaţi cu 1,7 ml Hypnorm™ i.m., administrat cu 20 minute înainte de operaţie şi apoi de 3 ori intraoperatoriu, doza totală fiind de 2,3 ml Hypnorm™ sau 0,4 ml/kg/oră.

După anesteziere, animalele se rad, se curăţă şi se drapează cavitatea peritoneală, efectuându-se o incizie axială. Utilizând desecarea bontă, se eliberează artera renală dreaptă, apoi cea stângă, şi se clampează cu clema Serrefin™ (Baby Dieffenbach Serrefin; Harvard Apparatus; Cat. # 52-3241 sau 52-3258). Concomitent cu ocluzia arterială, în cavitatea abdominală se introduc oricare din: pompă osmotică Alzet™ (Alza Corporation, Palo Alto, CA, Modelul 2ML-1) ce conţine 2,0 ml de 3,3 mg des-IGF-1/ml acid acetic (100 mM, pH 4,5) sau 2 pompe osmotice Alzet™, fiecare conţinând 2,0 ml din oricare din IGF-1 uman recombinant, conform descrierii ce urmează (5 mg/ml în tampon de clorură de sodiu (acetat de sodiu, pH 6,0) sau excipientul său). Aceste pompe au fost pregătite pentru acţiune imediată asupra amplasamentului. Fiecare pompă livrează 10,58 µl/oră, oferind animalelor tratate un total de circa 0,364 mg/kg/zi de des-IGF-1 sau 1,1 mg/kg/zi de IGF-1 pentru fiecare animal. Astfel, doza de IGF-1 administrată reprezintă o treime din doza de IGF-1. Animalele din lotul de control au primit pompe incluse în excipient. Animalele se acoperă apoi cu tifon umectat cu soluţie salină şi se lasă pentru 2 ore până la reperfuzie.

După 2 ore de ocluzie arterială, se extrag clemele, şi reperfuzia se verifică vizual. Se închide peretele abdominal cu 0.0 Prolene™, pielea suprapusă se suturează cu 2,0 Prolene™ şi nodurile se introduc sub piele pentru a preveni iritaţia. Apoi animalele se transferă pe pernuţe cu încălzire până la 35°C, se plasează în poziţia culcat şi se incubează în această poziţie până îşi vin în fire (circa 4-5 ore), apoi ele se plasează în cuşti de menţinere şi se aprovizionează cu hrană şi apă pentru perioada de experiment rămasă.

Colectarea datelor

In zilele 1-6 după ocluzie, se colectează 1,0 cc sânge din vena urechii, care se centrifughează şi serul se depozitează la 80°C.

Când fiecare grup a câte şase iepuri s-a completat, probele se topesc la temperatura camerei şi se examinează cu Monarch 2000 Chemical Systems Instrument (Allied Instrument Laboratories, Lexington, MA) pentru a determina creatinina, azotul ureei, glucoza, sodiul, potasiul, calciul, colesterolul, albumina, fosfataza alcalină (ALP) şi gama-glutamil transferaza (GGF). In a 7-a zi iepurii se sacrifică şi se extrage rinichiul drept, ficatul, splina, inima şi timusul şi se cântăresc. Organele se fixează în formalină şi se expediază pentru examen histologic. În plus, se extrage rinichiul stâng şi se cântăreşte, fragmentele corticale se utilizează pentru studiul asimilării ionilor *in vitro* cum urmează.

Ocluzia completă şi consecventă a arterelor renale în cadrul investigaţiei animalelor se confirmă prin nivelurile crescute ale azotului ureei şi creatininei în ser. La animalele expuse numai laparotomiei, nivelurile creatininei rămân relativ constante şi constituie în toate cazurile cifre mai joase de 1,6 mg/dL, şi nivelurile azotului ureei din ser persistă mai joase de 10 mg/dL în toate cazurile. La animalele care au suportat ocluzia, nivelurile de creatinină, în toate cazurile, se ridică mai sus de 3,5 mg/dL şi nivelurile azotului ureei se majorează mai sus de 65 mg/dL (Nr.=48).

Prepararea ţesutului cortical renal

Imediat după sacrificare, rinichiul stâng se decapsulează printr-o incizie de-a lungul axei orizontale cu adâncirea în ţesut la 1 cm şi se introduce în tampon salin fosfat (PBS) rece. Apoi cortexul renal se secţionează pe perimetrul fiecărei secţiuni orizontale şi ţesutul fragmentat (secţiunile) se introduce în Stadie-Riggs™, unde se secţionează (se taie) din fiecare rinichi optsprezece fragmente (secţiuni) de 0,3-0,4 mm cu greutatea 30-100 mg, fragmentele (secţiunile) din ţesutul mai superficial se îndepărtează. Fragmentele se incubează individual la 25°C într-un mediu ce conţine ^{14}C-TEA şi ^{3}H-PAH cu o atmosferă de 100% O_2 şi se agită continuu la 70 rot./min timp de 0;

15; 30; 45; 60 şi 90 minute, îndepărtând în fiecare perioadă de timp trei fragmente (secţiuni). Mediul de incubare constă din 20 mL tampon Cross şi PAH Taggart (72,8 μg/L PAH, 10,78 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 1,33 g/L KH_2PO_4; 1,48 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 35,07 g/L NaCl; 1,49 g/L KCl), cum este descris de Cross şi Taggard în Amer. J. Physiol., 161: 181-190 (1950); 10 mL lactat (0,90 g/100 mL) şi 55 mL apă deionizată, cu pH ajustat la 7,4, utilizând NaOH 1 M. Apoi se adaugă 2 mL $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,736 g/100 mL) şi volumul final se aduce până la 100 mL cu apă deionizată. Mediul se aerează cu 100% oxigen timp de 30 minute şi se adaugă ţesutul renal. Imediat înainte de utilizare se mai adaugă ^{14}C-PAH şi ^{3}H-TEA în concentraţii de 0,334 μCi/3 mL de mediu.

În perioadele de timp specificate, fragmentele (secţiunile) se extrag din mediul de incubare, se usucă, se cântăresc, se dizolvă în 1,0 mL Protoso™ (New England Nuclear, Boston, MA) şi se neutralizează cu acid clorhidric. Radioactivitatea fiecărui fragment (secţiune) din rinichi şi a 1,0 mL de mediu se măsoară utilizând sistemul lichid cu scintilare LS5000 TD (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Rezultatele se notează ca dpm (dezintegrări într-un minut) în 100 mg ţesut incubat împărţit la dpm a 100 μL mediu de incubare. Media şi SEM pentru fiecare grup din trei fragmente (secţiuni), pentru perioada de timp, se calculează pentru fiecare iepure. Aceste valori, media fragmentului/mediu şi SEM se calculează pentru grupurile IRA+IGF-1, IRA+des-IGF-1; IRA-control; normă şi LAP+IGF-1.

Analiza statistică

Rezultatele se analizează prin comparaţie între loturi în fiecare zi cu testul T-Student şi devierile în ziua a şasea sau a treia se evaluează pentru autenticitate, utilizând măsurarea repetată a 2-factori ANOVA şi folosind tratamentul şi zilele, ca două clasificări (indici). Calitatea histologică a fragmentelor de ţesut (secţiunilor) se clasifică în scara aranjării de la normale la deteriorări severe pentru fiecare din câteva categorii, cu diferenţa statistică calculată, utilizând testul Fischer.

Rezultatele din loturile cu iepuri se analizează individual şi dacă nu se depistează o diferenţă în funcţie de greutate, datele se exclud.

Eficienţa ischemiei renale se verifică vizual în timpul intervenţiei chirurgicale, fiind depistată creşterea postoperatorie a creatininei. La iepurii, la care nu s-a efectuat ocluzia, creatinina postoperatorie rămâne mai joasă de 1,6 mg/dL în toate zilele. Iepurii cu artera renală clampată, pe de altă parte, demonstrează în prima zi creatinina la nivelul 2,00-7,1 mg/dL, cu IRA, confirmată histologic, in a 7-a zi. Deoarece clamparea arterei renale provoacă deteriorări măsurabile succesive IRA la toţi iepurii, validitatea modelului experimental se acceptă.

Rezultatele: des-IGF-1

Controlul

Greutatea corporală a iepurelui:

In perioada postoperatorie, in ziua a 7-a, iepurele netratat a suferit o pierdere medie in greutate de circa 15% (vezi tabelul 7 şi figura 3). În lotul de animale ocluzionate, netratate, aceasta înseamnă o pierdere ce depăşeşte 350 mg spre ziua a 6-a. La administrarea des-IGF-1, animalele de asemenea înregistrează o pierdere în greutate, însă aceste pierderi sunt semnificativ mai mici comparativ cu pierderile in greutate în lotul netratat, şi ele constituie în medie 200 mg, deci o performanţă de circa 40%.

ANOVA relevă valori p nesemnificative pentru toate zilele, cu excepţia zilei a 2-a, cand p=0,0055. Oricum, 2-factori ANOVA, utilizând ziua şi greutatea corporală contra grup, atestă o valoare totală p de 0,048.

În loturile cu iepuri, care au fost supuşi laparotomiei, neocluzionaţi, după operaţie de asemenea sunt înregistrate modificări semnificative în greutate, care spre ziua a 6-a sunt egale cu cele inregistrate la iepurii ocluzionaţi netrataţi. În lotul netratat prin laparotomie, Nr.=2, spre ziua a 6-a pierderile în greutate înregistrau o medie de 335 mg. În lotul tratat prin laparotomie şi IGF-1, spre ziua a 6-a, aceste cifre constituiau 143 mg. Nu au fost depistate diferenţe semnificative între lotul tratat prin laparotomie şi IGF-1 şi cel netratat prin laparotomie, diferenţe semnificative nu au fost intre lotul tratat prin laparotomie cu IGF-1 şi grupa ocluzionată netratată. Importanţa acestei concluzii va fi discutată în continuare.

Tabelul 7

Pierderile zilnice în greutate (kg): iepurii trataţi cu IGF-1 comparativ cu lotul de control

Ziua X-Ziua 0	des	SEM	Control	SEM	Nr.=(cl+des)	lap	SEM
Ziua 1-0	-,07	,028	-,15		(4,4)	-,19	,03
Ziua 2-0	-,13	,02	-,23	-0,15	(4,4)	-,27	,05
Ziua 3-0	-,17	,033	-,27	,028	(4,4)	-,31	,06

Ziua 4-0	-,20	,042	-,34	,047	(4,4)	-,31	,1
Ziua 5-0	-,20	,077	-,34	,08	(4,4)	-,34	,15
Ziua 6-0	-,25	,061	-,38	,076	(9,8)*	-,34	,21
Ziua 7-0	-,06	,023	-,23	,08	(3,4)**	-,27	,24

* Valorile zilei a 6-a includ 9 iepuri adiţionali din acelaşi protocol, greutatea zilnică a cărora se măsura, însă greutatea în ziua a 6-a se cunoaşte.

** Un iepure din lotul de control a murit in ziua a 6-a.

Masele organelor

La animalele tratate cu des-IGF-1, analiza masei rinichiului (numai a rinichiului drept), relevă că masa medie a rinichiului animalelor tratate cu des-IGF-1 (Nr.=9) este de 1,5 ori mai mare decat cea la animalele netratate (Nr.=7) (14,87±0,774 g, comparativ cu 10,21±0,61 g respectiv, p=0,0004). Masa splinei, la animalele tratate a fost dublă, comparativ cu lotul de control (2,43±0,44 g, comparativ cu 1,17±0,21 g respectiv, p=0,028).

În masa inimii nu au fost depistate diferenţe între loturi, iar masa timusului nu a fost măsurată în acest prim lot de studiu (vezi fig. 4).

Nivelurile creatininei serice

La toţi iepurii nivelurile postocluzionale ale creatininei serice înregistrează o creştere de la o medie de control de 1,14±0,8 mg/dL la un maxim postocluzional, in ziua a 2-a, de 7,8±0,77 şi 6,9±0,63 mg/dL in loturile tratate cu des-IGF-1 şi lotul de control, respectiv (p=0,7). În ambele loturi aceste niveluri ridicate au revenit la nivelurile normale de 0,9±0,15 şi 1,18±0,12 mg/dL spre ziua a 7-a şi nivelurile de creatinină serică în aceste două loturi nu înregistrau o diferenţă statistică (tabelul 8 şi fig. 5).

Nivelurile azotului ureei in ser

Nivelurile postocluzionale ale azotului ureei în ser înregistrează o creştere de la nivelurile normale de 17,7±0,7 mg/dL la un maxim, in ziua a 2-a, de 124±9,3 mg/dL în lotul de control şi 110±9,3 mg/dL în lotul tratat. În lotul de control aceste niveluri regresează apoi la un minim în ziua a 6-a de 74±29,6 mg/dL, in timp ce la animalele tratate cu des-IGF-1 ele au revenit la 58±25,6 mg/dL.

Deşi ANOVA între loturi în oricare din zilele date nu a fost statistic semnificativ, măsurarea repetată a 2 factori: nivelul azotului ureei şi ziua, comparativ în loturi, rezultă cu p=0,058 şi nivelurile medii în orice zi dată în lotul tratat au fost mereu mai joase, comparativ cu lotul netratat (vezi tabelul 8 şi fig. 6).

Nivelurile de glucoză în ser

Nivelurile de glucoză în ser înregistrează o descreştere postoperatorie la animalele ocluzionate tratate cu des-IGF-1, cât şi la animalele ocluzionate netratate, de la un nivel mediu iniţial de 173±22 mg/dL în prima zi la 101±8,5 mg/dL şi 125±15,4 mg/dL, respectiv. După ziua 1 nivelurile se majorează la circa 140 mg/dL în ambele loturi şi se menţin între 127 şi 165 mg/dL pentru restul experimentului. La animalele tratate cu des-IGF-1 se înregistrează acelaşi declin postoperatoriu. Media iniţială de 164 mg/dL se reduce la un minim al zilei de 103±4,0 mg/dL în lotul tratat cu des-IGF-1 şi 129±7,0 mg/dL în lotul de control. Nivelurile se menţin în limitele de la 122 la 170 mg/dL (vezi tabelul 8).

Tabelul 8

Nivelurile de creatinină, de azot al ureei şi glucoză la iepurii trataţi cu des-IGF-1, comparativ cu iepurii ocluzionaţi-control

Ziua	0	1	2	3	4	5	6	7
Creatinina des-IGF-1 media	1,18	6,45	7,80	5,45	4,24±	3,16	2,72	0,90±
des-IGF-1 SEM	±,10	±,39	±,77	±,83	1,07	±1,10	±1,06	,15
control media	1,09	6,44	6,94	6,16	5,03	3,92	2,93	1,18
control SEM	±,05	±,52	±,63	±,97	1,11	±1,07	±1,00	±,12
Nr.=(ocl. des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9*	8,9*	4,3
2-factori ANOVA pentru tratament şi ziua 1 - ziua 7, comparativ cu lotul relevă p=0,29								
Azotul ureei des-IGF-1 media	18	91	110	98	82	62	58	15

des-IGF-1 SEM	±,9	±5,7	±9,3	±14,0	±20,7	±22,1	±25,6	±3,2
control media	17	102	125	126	111	93	74	19
control SEM	±0,8	±6,0	±9,3	±18,6	±24,4	±27,2	±29,6	±1,8
Nr.=(ocl. des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9	8,9	5,4
2-factori ANOVA tratament şi ziua 1 - ziua 7, comparativ cu lotul relevă p=0,058								
Glucoza des-IGF-1 media	177	101	143	137	131	131	139	127
des-IGF-1 SEM	±20,1	±8,5	±8,0	±4,2	±6,4	±7,5	±15,8	±3,7
control media	168	125	148	148	165	160	154	133
control SEM	±9,5	±15,4	±8,0	±3,8	±18,6	±20,0	±16,5	±5,5
Nr.=(ocl. des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9	8,9	5,4
2-factori ANOVA pentru tratament şi ziua 1 - ziua 7, comparativ cu lotul relevă p=0,09								

* Iepure tratat # 4 morţi.

** Iepure control # 7 morţi.

Rezultatele IGF-1 comparativ cu controlul

Greutatea corporală a iepurelui

Rezultatele de la iepurii - control, utilizaţi în experienţele cu IGF-1, nu au fost combinate cu rezultatele de la iepurii-control, utilizaţi în experienţele cu des-IGF-1, totuşi protocoalele pentru ambele loturi au fost aceleaşi. Conform aşteptărilor, IRA impune pierderi semnificative de greutate la toţi iepurii. Controalele IRA indică un deficit de 376±84 g în ziua a 6-a, o pierdere de 15% din greutatea corporală iniţială. Spre deosebire de des-IGF-1, oricum IGF-1 în doza administrată nu reduce semnificativ pierderile în greutate. Iepurii trataţi cu IGF-1 au pierdut 250±50 g spre ziua a 6-a, o pierdere in greutate de 9,5%, p=0,34. ANOVA relevă valori nesemnificative de p pentru toate zilele şi 2-factori ANOVA, utilizând zi şi tratament comparativ cu lotul, de 0,62 (vezi tabelul 9). Există o diferenţă nesemnificativă între loturile IRA+IGF-1 şi LAP+IGF-1.

Tabelul 9

Pierderea zilnică în greutate (kg): iepuri trataţi cu IGF-1, comparativ cu controlul

Ziua X - Ziua 0	IGF-1	SEM	control	SEM	Nr.=(cl., IGF-1)
Ziua 1-0	-,10	0,01	-,11	,02	(11,13)*
Ziua 2-0	-,25	0,03	-,26	,02	(11,13)
Ziua 3-0	-,29	0,03	-,30	,03	(6,10)**
Ziua 4-0	-,30	0,03	-,35	,04	(9,12)
Ziua 5-0	-,32	0,04	-,36	,05	(9,12)
Ziua 6-0	-,25	0,05	-,38	,08	(9,12)
Ziua 7-0	-,21	0,07	-,30	,14	(4,6)***

* Include iepurii 25-42 şi 44-49.

** Iepurii de control # 40, 42 şi 44 şi trataţi cu IGF-1 au murit in ziua a 3-a. In plus, iepurii 45-49 nu au fost cântăriţi în ziua a 3-a.

*** Include numai greutăţile corporale ale iepurilor 31-42. Iepurii precedenţi au fost sacrificaţi în ziua a 6-a.

Masele organelor

La animalele tratate cu IGF-1, masa rinichiului in ziua a 7-a se egalează cu cea a rinichilor lotului de control. Masa medie a rinichiului animalelor tratate cu IGF-1 constituia 11,85±0,62 g, in timp ce masa rinichiului animalelor netratate constituia 10,19±0,65 g, şi ANOVA relevă valoarea p=0,10.

Masa medie a timusului umed in lotul tratat cu IGF-1 era aproape dublă, comparativ cu cea înregistrată în lotul de control, 4,7±0,4 g şi 2,7±0,6 g, respectiv, valoarea p în ANOVA de 0,02. Când mărimea timusului este raportată la greutatea corporală a iepurelui, probabilitatea că masele medii ale timusului sunt reprezentante ale tratamentului semnificativ legate de diferenţe, creşte (p=0,01). Totuşi, o comparaţie a masei timusului normal al iepurelui cu masa timusului iepurelui tratat: IRA+IGF-1, indică că la iepurii trataţi şi la cei de control masele timusului sunt similare.

Splinele la iepurii din cele 2 loturi erau de mărime similară, 1,7±0,3 g şi 2,0±0,5 g în lotul tratat cu IGF-1 şi cel de control, respectiv.

În ce priveşte lotul tratat cu des-IGF-1, inima a fost de mărime similară, indiferent de tratament, şi ficatul animalelor tratate cu IGF-1 nu a indicat nici o diferenţă în mărime (vezi tabelul 10 şi fig. 7). 6

animale nu au fost cântărite şi alte 4 au decedat înainte de ziua a 7-a, de aceea datele includ 10 iepuri trataţi şi 6 de control.

Tabelul 10

Masele organelor iepurilor trataţi cu IGF-1 şi cu des-IGF-1 şi ale iepurilor ocluzionaţi-controlul

Lotul	Rinichiul	Splina	Timusul	Inima	Ficatul	Nr.=(R,S,T,L,F)
IGF-1	11,9	1,7	4,7	6,3	61,6	(10,10,6,10,10)**
SEM	±0,06	±0,3	±0,4	±0,3	±2,9	
IRA ocl.	10,2	2,0	2,7	6,3	72,3	(6,6,4,6,6)**
SEM	±0,7	±0,5	±0,6	±0,3	±6,5	
des	14,9	2,4	-	6,9	-	(9,8,0,4,0)***
SEM	±0,8	±0,4	±0,2	-	-	
des. ocl.	10,1	11,2	-	6,8	-	(7,7,0,6,0)
SEM	±0,6	±0,2	-	±0,5	-	
Normal	7,0	1,4	5,2	5,8	87,0	N=2
SEM	±0,4	±0,3	±1,7	±0,7	±25,2	

* R - Rinichi, S - Splină, T - Timus, I - Inimă, F - Ficat.

** La iepurii 31-42, animale tratate cu IGF-1 (Nr.=6) şi de control (Nr.=4), au fost cântărite toate organele. La iepurii 25-30, animale tratate cu IGF-1 (Nr.=4) şi de control (Nr.=2), au fost cântărite toate organele, cu excepţia timusului.

*** La iepurii 1-23, trataţi cu des-IGF-1, toate 9 animalele tratate cu des-IGF-1 şi 7 animale de control, care au supravieţuit până la ziua a 7-a, au fost cântăriţi rinichii. La iepurele 13 tratat n-a fost înregistrată greutatea splinei şi la 5 iepuri trataţi şi la 1-control nu a fost cântărită inima, cu toate că nu au fost depistate diferenţe în mărime şi deosebiri la examenul histologic. În acest grup de animale nu au fost înregistrate masele timusului şi ficatului, însă vizibil a fost relevată diferenţa de mărime în loturile de studiu.

Nivelurile creatininei serice

In lotul de animale tratate cu IGF-1 şi în lotul de control cu animale netratate se înregistrează o creştere postoperatorie a nivelurilor de creatinină serică de la valori normale în prima zi de 1,00±0,09 la valori maxime in ziua a 2-a de 5,8±0,7 mg/dL şi 6,5±0,8 mg/dL, respectiv. În ambele loturi aceste niveluri ridicate au revenit in ziua a 7-a la niveluri aproape normale de 1,17±0,12 şi 1,2±0,6, respectiv, la animalele tratate cu IGF-1 s-au înregistrat niveluri de creatinină în ser semnificativ mai joase, comparativ cu lotul de control, p=0,04 şi 0,01, respectiv. În aceste zile, valorile creatininei la animalele tratate erau cu 40% mai joase decât la animalele de control. Deşi, 2 - factori totali ANOVA nu au fost semnificativi (p=0,192 pentru zilele de la 1 la 6), totuşi efectele medicamentului sunt vizibile posibil in etapele mai tardive de vindecare, in zilele de la 4 la 6. Factorii - 2 ANOVA pentru aceste zile sunt semnificativi (p=0,0334) (vezi tabelul 11 şi fig. 8).

Nivelurile azotului ureei in ser

La animalele tratate cu IGF-1 şi la cele netratate se înregistrează niveluri postocluzionale de azot al ureei în ser ridicate. O medie de bază de 15,5±0,7 mg/dL în ziua 0, a crescut la 122,4±12,1 mg/dL in ziua a 2-a - la animalele-control cu IRA şi 89,9±12,0 mg/dL - la animalele cu IRA+IGF-1. Spre ziua a 7-a, in ambele loturi nivelurile au revenit la valori aproape normale sub 20±5,5 mg/dL in fiecare. ANOVA atestă că diferenţele zilnice au fost semnificate în ziua 1,4,5 şi 6 şi 2 - factori ANOVA tratament contra ambelor zile şi nivelul azotului ureei în ser din ziua 1 până în ziua a 6-a, relevă o valoare p=0,0348 (vezi tabelul 11 şi fig. 9).

Tabelul 11

Nivelurile creatininei, azotului ureei şi glucozei în ser la iepurii trataţi cu IGF-1, comparativ cu nivelurile la iepurii ocluzionaţi

Zile	0	1	2	3	4	5	6	7
Creatinina IGF-1 media	1,0	5,2	5,8	3,9	2,3	1,7*	1,3*	1,2
IGF-1 SEM	0,03	0,4	0,7	0,6	0,3	0,2	0,1	0,1
control media	1,0	5,4	6,5	5,4	3,7	2,7	2,1	1,2

control SEM	0,1	0,4	0,8	1,0	0,7	0,5	0,3	0,06
2-factori ANOVA pentru tratament cu ziua a 4-a - ziua a 6-a, comparativ cu lotul, relevă p=0,03								
IGF-1 media	15,3	74,2	89,9	79,2	49,4	32,8	24,4	19,0
IGF-1 SEM	0,6	4,7	12,0	11,2	9,3	6,3	5,5	5,5
control media	15,9	87,3	122,4	119,7	94,6	80,3	72,8	14,5
control SEM	0,7	4,1	12,1	19,5	20,6	21,6	21,3	0,5
valoarea lui p	1,0	0,05	0,07	0,07	0,04	0,03	0,02	-
Nr.=(cl, IGF)	11,13	11,13	11,13	10,13	9,12	9,12	9,12**	2,6***
2-factori ANOVA pentru tratament şi ziua 1 - ziua a 6-a, comparativ cu lotul, relevă p=0,0348								

* p<0,05 (vezi textul pentru valori exacte).

** Iepurii 40 şi 42 din lotul de control au decedat în ziua a 3-a şi a 4-a, respectiv. Iepurele tratat 45 a sucombat in ziua a 4-a. Ultimele măsurări ale creatininei la cei trei iepuri înainte de moarte indică 10,000; 11,30 şi 7,70 mg/dL, respectiv, şi ultimele măsurări ale azotului ureei indică 158; 215 şi 147 mg/dL, care împreună cu evaluarea histologică, ce confirmă granulaţie renală excesivă şi necroză celulară, indică insuficienţa renală acută drept cauza morţii.

*** Valorile indicilor menţionaţi în ser în ziua a 7-a nu au fost calculate la iepurii 25-30 şi 43-48 (trataţi cu IGF-1 Nr.=3; control Nr.=3). In plus, datele de laborator ale iepurelui - control 32 atestă un nivel al azotului ureei din ser in ziua a 7-a de 14 mg/dL, in timp ce nivelul zilei a 6-a era de 150 mg/dL. Această valoare de jos a fost exclusă. Nr. pentru nivelurile de creatinină în această zi este egal cu 3, pentru lotul de control; din ziua a 7-a valoarea nu a fost neaşteptat anormală.

^{3}H-PAH

Absorbţia anionului organic PAH de către secţiunile (fragmentele) cortexului renal, măsurată prin raportul anionilor marcaţi radioactiv în ţesut la anionii mediului, se majorează de la 0 iniţial la momentul zero la un nivel de 7,15±1,78 în minutul 90 la iepurii normali (Nr.=4). După ocluzia renală, eficienţa absorbţiei anionilor se reduce la animalele ocluzionate - control până la o rată a absorbţiei de 90 minute de 4,61±0,82 (p=0,16). Ratele în minutele 45 şi 60 s-au redus semnificativ (p=0,052 şi 0,043, respectiv) şi 2 - factori ANOVA prezintă diferenţa semnificativă până la p=0,077. Rata de 90 minute la animalele ocluzionate cu IGF-1 creşte până la o valoare de 5,09±0,56, însă nu a fost substanţial diferită de rata de 90 minute în lotul de animale ocluzionate - control (p=0,64).

Animalele din loturile tratate cu des-IGF-1 de asemenea au manifestat o capacitate de concentrare mai bună, comparativ cu cele din lotul de control, însă nu a fost depistată o diferenţă semnificativă la nici o etapă (vezi tabelul 12 şi fig. 10).

^{14}C-TEA

În secţiunile (fragmentele) cortexului renal de la iepurii normali absorbţia cationului organic TEA a atins o valoare de 7,36±1,40 in minutul 90. La animalele ocluzionate-control, această valoare scade considerabil până la 4,83±0,50, ceea ce reprezintă o descreştere cu 35% a capacităţii de concentrare. La animalele tratate cu IGF-1, rata de 90 minute a fost de 7,21±0,80 şi valorile la toate etapele au fost mai ridicate, comparativ cu animalele ocluzionate-control, cu autenticitate in toate momentele temporale, 2-factori ANOVA: timp şi grup, comparativ cu rata atestă p=0,0014.

In plus, in orice moment temporal 2-factori ANOVA, utilizând aceiaşi parametri, indică valoarea de p=0,71.

Rata de 90 minute in lotul animalelor tratate cu des-IGF-1 a fost de 8,48±1,04, rată, de asemenea ridicată, comparativ cu rata de absorbţie a TEA la animalele ocluzionate-control.

Tabelul 12

Absorbţia cationilor şi anionilor organici de către animalele normale, ocluzionate-control şi tratate cu des-IGF-1 şi IGF-1

Lotul	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	Nr.=
^{3}H-PAH Normal	0	1,50	2,84	4,22	5,76	7,15	4

SEM	0	0,08	0,46	0,86	1,14	1,78	
IRA-ocl.	0	1,08	1,90	2,48*	3,22*	4,61	10
SEM	0	0,14	0,28	0,39	0,54	0,82	
des-IGF-1	0	1,57	2,84	4,08**	4,34	6,68	3
SEM	0	0,10	0,21	0,34	0,23	0,65	
IRA+IGF-1	0	1,31	2,18	3,42	3,57	5,09	10
SEM	0	0,12	0,18	0,33	0,30	0,56	
LAP+IGF-1	0	1,21	2,15	3,09	3,50	4,78	3
SEM	0	0,02	0,15	0,21	0,02	0,54	
* Ambele aceste valori sunt considerabil mai joase, comparativ cu cele la iepurii normali							
** 45 min. Raportul fragment/mediu pentru cei tratați cu des-IGF-1 este semnificativ mai mare decat in lotul de control							
^{14}C-TEA Normal	0	2,13	4,04	4,97	6,58	7,36	4
SEM	0	0,31	0,76	0,92	0,95	1,40	
IRA ocl.	0	1,31	2,23	2,86	3,60	4,83	10
SEM	0	0,10	0,19	0,26	0,37	0,50	
IRA+des	0	2,49	3,95	6,11	6,47	8,48	3
SEM	0	0,84	0,88	1,17	0,88	1,04	
IRA+IGF-1	0	2,01	3,25	4,85	5,18	7,21	10
SEM	0	0,15	0,25	0,54	0,32	0,80	
valoarea lui p***		0,0012	0,0049	-,0036	0,0045	0,0192	
LAP+IGF-1	0	1,60	3,41	5,18	5,72	6,80	3
SEM	0	0,19	0,39	0,06	0,29	1,32	

Rezultatele sunt exprimate ca raportul dintre secțiunea (fragmentul) de țesut şi ionii din mediu la intervalele de timp indicate.

*** Semnificațiile între grupul tratat cu IGF-1 şi cel de control. 2-factori ANOVA indică p=0,0014. Nici o diferență între IGF-1 şi normal.

Histopatologia

Animalele, care au supraviețuit până în ziua a 7-a, au fost sacrificate, organele obținute au fost folosite pentru evaluare histologică (tabelul 13).

Tabelul 13

Rezultatele examenului histologic* al țesutului renal la iepurii cu IRA+IGF-1, comparativ cu iepurii cu IRA-control

Lotul	Degenerare	Congestie	Cilindri renali	Nefrite	Edem	Minerali-zare	Hiper-trofie	Dilatare
IRA	+2,4	0,2	0,9	0,4	1,8	1,7	2,6	1,9
IGF-1	±0,5	±0,1	±0,3	±0,2	±0,1	±0,4	±0,2	±0,4
IRA	1,5	0,3	1,1	0,8	2,4	2,2	2,4	2,3
Ocl.	±0,3	±0,2	±0,3	±0,3	±0,3	±0,4	±0,3	±0,3

*Scara se bazează pe o creştere de la 0 până la 4, când 4 reprezintă leziune "severă" şi 0 - "normal".

La examenul histologic al inimii, splinei şi ficatului nu se relevă nici o diferență statistic semnificativă între loturile de studiu. Deşi s-a depistat o creştere a masei timusului, evaluarea a 11 timusuri de control şi 6-tratate cu IGF-1 nu relevă deteriorării morfologice. În secțiunile (fragmentele) rinichiului la toate animalele cu IRA se atestă mineralizare tubulară, dilatare şi degenerare.

Loturile au fost examinate pentru depistarea prezenței următoarelor simptome: nefritei cronice multifocale interstițiale; edemului; inflamației capsulare subacute; hipertrofiei epiteliale medulare şi mineralizării tubulare; dilatării; degenerării; congestiei şi cilindrilor renali hialini. Secțiunile au fost marcate cu valori 0-4, bazate pe absența modificărilor uşoare, moderate, marcante sau severe. A fost calculată media acestor valori pentru fiecare categorie şi media pentru fiecare lot de tratament a fost comparată utilizând testul-T cu 2 cazuri neîmperecheate. Nu a fost depistată nici o diferență semnificativă în careva din aceste categorii, însă în medie, iepurii tratați cu IGF-1 manifestă tendințe

spre a avea mai puțin: congestii, cilindri renali, nefrită, edem, mineralizare şi dilatare, iepurii aceştia manifestă o tendință mai mult spre a avea hipertrofie.

Discuție

Aceste date sugerează că IGF-1 şi des-IGF-1 exercită evidente efecte benefice asupra funcției renale ischemice la iepuri. Un efect favorabil al des-IGF-1 se relevă în cazul pierderii în greutate, care este ameliorat cu 40% la iepurii tratați cu des-IGF-1 (p=0,048). Efectele IGF-1 asupra pierderii in greutate nu au fost aşa impresionante şi nici statistic semnificative. În cadrul multor măsurări ale efectului anabolic, des- IGF-1 manifestă o triplă creştere asupra succesiunii complete IGF-1.Totuşi, chiar cu reducerea compensatorie de 2/3 a dozei utilizate în experiențele prezentei invenții, masele renale ale iepurilor tratați cu des-IGF-1 depăşesc cu 50% cele ale iepurilor de control, după o perioadă de 7 zile (p=0,0004). Rinichii tratați cu IGF-1 nu au manifestat aceeaşi creştere a masei renale, însă ambii - şi IGF-1 şi des-IGF-1 au grăbit vindecarea renală. Acesta este un moment important, deoarece se relevă un efect benefic al IGF-1 asupra regenerării renale, fără schimbări marcante ale mărimii organului.

În ambele loturi există manifestări evidente de necroză, granulație şi leziuni generale celulare. Unii rinichi prezintă porțiuni de calcificare, ca rezultat al morții celulelor şi sunt, de asemenea, semne extracelulare de depunere proteică, ce cauzează edeme în ambele loturi. Examenul histologic relevă că animalele tratate cu IGF-1 prezintă mai puține deteriorări renale şi mai multe dovezi de regenerare renală.

Datele înregistrate indică nu numai o creştere a masei splinei, timusului şi rinichilor, dar măsurările creatininei şi azotului ureei în ser sugerează o ameliorare specifică a funcției renale în ambele loturi: tratați cu des-IGF-1 şi tratați cu IGF-1. Lotul tratat cu IGF-1 prezintă niveluri semnificativ mai joase ale ambilor indici: de creatinină şi azot al ureei în ser, nivelurile azotului ureei erau cu 50% mai joase, comparativ cu valorile de control, inregistrate din ziua a 2-a până în ziua a 6-a. Excesul azotului ureei este indezirabil şi revenirea la niveluri normale, cât mai repede posibil, este examinată ca răspuns pozitiv. Animalele tratate cu IGF-1 de asemenea manifestă o revenire, mai rapidă, la nivelurile normale de creatinină serică, comparativ cu animalele de control şi aceste două momente sugerează că tratamentul cu IGF-1 ameliorează filtrația şi reținerea ulterioară a ultrafiltratului. La iepurii tratați cu des-IGF-1 nivelurile creatininei serice au fost similare celor înregistrate la animalele lotului de control. Nivelurile azotului ureei în ser, totuşi, au fost nesemnificativ mai joase (p=0,058). Astfel, datele sugerează că IGF-1 este mai eficient, comparativ cu proteina trunchiată, în ce priveşte creşterea masei renale funcționale, necesare pentru reducerea nivelurilor în ser. Se pare, că IGF-1 restabileşte mai convingător funcțiile normale renale în IRA, mai repede şi mai radical decât excipientul, cu schimbări precoce posibile până la 24 ore.

În studiul anionilor şi cationilor organici sunt depistate, de asemenea, efectele pro-renale ale IGF-1. Aşa, cum s-a menționat mai sus, reținerea renală a cationilor şi anionilor de către membrana bazală şi apicală, are o importanță clinică. În investigațiile prezentate, ictusul ischemic a redus evident capacitatea fragmentelor (secțiunilor) corticale renale de concentrare a anionilor şi cationilor, comparativ cu gradientul în structura experimentală, moment verificat prin diferența semnificativă intre raporturile fragment/mediu la iepurii normali şi iepurii ocluzionați-control. Reducerile capacității funcționale pentru o unitate de masă au constituit 35% pentru ambii ioni. La administrarea IGF-1 animalele nu manifestă o ameliorare considerabilă a capacității țesutului lor renal de concentrare a anionului (deşi tendința sugerează că cu mai multe subiecte pot fi reduse erorile şi se poate atinge semnificația).

Totuşi, la animalele tratate cu IGF-1 se atestă un raport fragment/mediu pentru cation considerabil mai înalt, ambele loturi prezentând capacitate de concentrare normală. Astfel administrarea IGF-1 timp de 7 zile după declanşarea ictusului acut produce restabilirea radicală a capacității de concentrare: absorbția TEA creşte la 70% şi absorbția PAH la 50%, comparativ cu IRA la controale. Cu alte cuvinte, la administrarea oricăror din IGF-1 sau des-IGF-1, compoziția celulară a fragmentelor corticale renale este afectată în aşa mod încât să revină la normal eficiența transportorilor cationici pentru masa dată. Majorarea transportului de ioni *in vitro* la şobolanii tratați cu IGF-1 sugerează că cantitatea de țesut funcțional a crescut.

Concluzii

In modelul leziunii, descrise mai sus, la iepure s-a produs o leziune ischemică renală evidentă, ce poate fi măsurată, care se manifestă prin descreşterea capacităţii funcţionale renale, verificată prin majorarea nivelului creatininei serice şi azotului ureei în ser şi reducerea transportului de ioni organici. In plus, pierderile postischemice in greutate par a fi o măsură utilă a funcţiei renale, deşi pierderi "postoperatorii" in greutate s-ar putea dovedi a fi un termen mai reuşit.

Tratamentul cu IGF-1, cu o consecutivitate absolută, în perioada ictusului renal este benefic pentru iepurii, incluşi în acest studiu, prin asigurarea unor niveluri mai joase de creatinină serică şi azot ureic în ser. La iepurii trataţi cu IGF-1 se relevă, de asemenea, creşterea masei timusului şi, posibil, deşi nesemnificativă, reducerea pierderii în greutate. La animalele tratate cu des-IGF-1, de asemenea, se atestă reducerea nivelului azotului ureei în ser şi capacitate normală de concentrare a ionilor. În plus, se înregistrează majorarea maselor splinei şi rinichilor şi reducerea pierderii în greutate. De aceea, IGF-1 şi des-IGF-1 sunt agenţi potenţiali utili în prevenirea sau ameliorarea ischemiei renale la iepure şi pot fi folosiţi şi la alte genuri de animale.

În plus, rezultatele indică că în urma tratamentului cu des-IGF-1 şi IGF-1 s-a redus în jumătate numărul iepurilor sucombaţi, comparativ cu iepurii din lotul de control, la care nu s-a administrat un astfel de tratament.

Exemplul III

Tratamentul şobolanilor

Introducere

Acest studiu are ca scop determinarea capacităţilor des-IGF-1 şi IGF-1 de a preveni sau cel puţin de a ameliora leziunile rinichilor la alte specii de animale, la şobolan, şi posibilităţii acestor factori de creştere de a reduce catabolismul accelerat, care se presupune că se asociază insuficienţei renale.

Protocolul

S-au efectuat trei testări, în care IRA a fost indusă operatoriu prin clamparea ambilor rinichi la şobolani Sprague-Dawlez masculi anesteziaţi (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Anestezia (Ketamine/Xyluzine intraperitoneal, i.p.) s-a monitorizat pe parcursul investigaţiei şi ulterior se suplimenta pentru a menţine câmpul de operaţie. Preoperatoriu, proba de sânge bazală se colectează preorbital sub anestezie şi apoi în părţile laterale se fac mici incizii subcutanate deasupra fiecărui rinichi. Accesul la rinichi s-a realizat prin incizia peretelui abdominal. Se externează fiecare rinichi, se localizează artera şi vena renală şi se clampează pentru 30 sau 60 minute, utilizând o clemă pentru aneurism de 2,5 cm Schwartz™. La animalele la care a fost simulată operaţia, au fost realizate aceleaşi proceduri, cu excepţia clampării rinichiului. Rinichii se declampează, inciziile se suturează şi animalele se plasează pe perioada vindecării pe o pernuţă încălzită. Analiza biochimică a sângelui se efectuează utilizând Monarch 2000 Clinical Chemistrz Analyser.

Planul investigaţiilor

Studiul 1: În primul studiu 16 şobolani au fost clampaţi pentru 30 minute fiecare. Lor li s-a administrat oricare din: 50 mg/zi des-IGF-1 sau excipient (100 mM acid acetic, PH 4,5) printr-o minipompă osmotică Alza™ 2001, plasată subcutanat, fiecare pompă fiind pregătită pentru a acţiona imediat după amplasament. La toţi şobolanii li se injectează 50 mg des-IGF-1 sau de excipient al acestuia 90 minute după declampare. Şobolanii se cântăresc zilnic şi se colectează zilnic probe de sânge din vena codală şi în ziua a 7-a se sacrifică.

Studiul 2: Această investigaţie se efectuează pentru determinarea timpului mai eficient de clampare, ce provoacă deteriorarea rinichiului. În studiul 1 era evident că clamparea timp de 30 minute provoacă leziuni uşoare. 6 şobolani se clampează pentru 30 minute, 6 şobolani - pentru 60 minute şi la 4 şobolani de control se simulează operaţia. Şobolanii se cântăresc zilnic şi zilnic se colectează probe de sânge din vena codală, şi în ziua a 4-a se sacrifică.

Studiul 3: 18 şobolani se clampează pentru 60 minute fiecare şi la 4 şobolani de control se simulează operaţia. La 6 şobolani li se administrează oricare din: 265 mg/zi des-IGF-1; 436 mg/zi IGF-1 sau excipient printr-o minipompă osmotică Alza ™ 2001, plasată subcutanat, fiecare pompă fiind pregătită pentru a acţiona imediat după amplasament. După declampare, la toţi şobolanii li se administrează subcutanat în injecţii 100 mg des-IGF-1; IGF-1 sau de excipient al acestuia. Şobolanii se cântăresc zilnic şi zilnic se colectează probe de sânge din vena codală până în ziua a 4-a inclusiv şi in ziua a 7-a se sacrifică.

Rezultate

În fig. 12, se compară eficienţele IGF-1 şi des-IGF-1, ca stimulatori ai creşterii rinichilor la şobolanii hipofizectomizaţi. Ca factor de creştere al rinichiului, eficienţa IGF-1 trunchiat depăşeşte de

9 ori eficienţa IGF-1. Datorită acestor efecte puternice ale des-IGF-1, ambii IGF-1 se des-IGF-1 au fost testaţi în leziunile renale pe modelul cu animale.

Studiul 1. Evoluţia insuficienţei renale, ca urmare a ocluziei arterelor renale timp de 30 minute la şobolanii de control şi cei trataţi cu des-IGF-1, este prezentată în fig. 13-15 prin aşa indici, cum ar fi adaosul în greutate, BUN şi creatinina. Se relevă un adaos în greutate mai semnificativ in lotul animalelor tratate, incepand cu ziua a 5-a de la ocluzionare.

Nivelul BUN creşte similar la ambele loturi cu leziuni, însă din acest moment, se menţine la un nivel mai jos in lotul tratat. Acest efect al des-IGF-1 devine statistic semnificativ în zilele 6 şi 7 şi reflectă efectul anabolic al moleculei. Creatinina serică creşte şi se reduce în mod similar în ambele loturi. Acestea reflectă evoluţia leziunilor uşoare, care se autolimitează. Creatinina s-a luat drept măsură a funcţiei renale, în genere drept măsură indirectă a ratei filtraţiei glomerulare. BUN serveşte drept măsură a ambelor funcţii renale şi a stării catabolice a şobolanilor.

Studiul 2. Evoluţia insuficienţei renale ca urmare a ocluziei renale timp de 20 sau de 60 minute se monitorizează în vederea determinării timpului de clampare, care provoacă leziuni renale severe, fără a fi letale (vezi fig. 16-18). Adaosul în greutate a fost considerabil sub influenţa operaţiei în toate loturile, însă numai animalele clampate timp de 60 minute au manifestat un catabolism menţinut.

BUN atestă o creştere radicală în lotul clampat timp de 60 minute. Natura severă a efectului clampării timp de 60 minute se confirmă, se asemenea, prin nivelul creatininei în ser.

Evident, clamparea arterelor renale timp de 60 minute provoacă o insuficienţă renală severă, comparativ cu clamparea timp de 30 minute, însă nu a fost letală pe parcursul întregului studiu. Respectiv, modelul de 60 minute a fost utilizat în experienţele ulterioare.

Studiul 3. Evoluţia insuficienţei renale, ce urmează ocluzia arterelor renale timp de 60 minute, a fost urmărită la animalele, la care li s-a administrat prin minipompe excipient, des-IGF-1 sau IGF-1 (vezi fig. 19-21). Şobolanii cu insuficienţă renală netratată nu adaugă în greutate, in schimb, tratamentul timp de 3 zile cu des-IGF-1 relevă un adaos în greutate. Spre comparaţie, aceeaşi doză de IGF-1 exercită un efect mai redus. BUN creşte până la o extindere similară în ambele loturi clampate. Totuşi, tratamentul cu des-IGF-1 este asociat cu o scădere rapidă a nivelurilor BUN.

Nivelurile creatininei serice, de asemenea, cresc în toate loturile cu animale clampate, însă tratamentul cu des-IGF-1 pare a fi cauza unei reduceri mai rapide, comparativ cu alte loturi clampate.

(57) Revendicări:

1. Metodă de profilaxie a insuficienței renale acute la mamifere care include administrarea unui remediu, **caracterizată prin aceea că** în calitate de remediu se utilizează o cantitate eficientă a factorului de creştere de tip insulinic IGF-I.

2. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** in calitate de mamifer este prezentat omul.

3. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** IGF-I este opțional combinat cu o proteină de aglutinare IGF.

4. Metodă, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** proteina de aglutinare IGF reprezintă IGFBP-3.

5. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** cantitatea eficientă de IGF-I constituie 0,01…1 mg/kg/zi.

6. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** insuficiența renală acută este o consecință a afecțiunii ischemice a rinichilor.

7. Metodă, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** omul este supus operației la cord.

8. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** mamiferul este supus transplantării renale.

9. Metodă, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** IGF-I se administrează înainte de transplantare.

10. Metodă, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** IGF-I se administrează în timpul transplantării.

11. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** insuficiența renală acută este o consecință a afecțiunii cu nefrotoxine.

12. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** adițional se administrează o cantitate eficientă de hormon de creştere.

13. Aplicare a unei cantități eficiente a factorului de creştere de tip insulinic IGF-I pentru profilaxia insuficienței renale acute.

14. Aplicare, conform revendicării 13, în care IGF-I reprezintă IGF-I uman.

15. Aplicare, conform revendicării 13 sau 14, în care IGF-I se aplică combinat cu o proteină de aglutinare IGF.

16. Aplicare, conform revendicării 15, în care proteina de aglutinare IGF reprezintă IGFBP-3.

17. Aplicare, conform oricăreia din revendicările 13-16, in care cantitatea eficientă de IGF-I constituie 0,01…1 mg/kg/zi.

18. Aplicare, conform oricăreia din revendicările 13-16, în care cantitatea eficientă de IGF-I constituie 1…50 μg/kg/h.

19. Aplicare, conform oricăreia din revendicările 13-16, in care IGF-1 se administrează cu o cantitate eficientă de hormon de creştere.

(56) Referințe bibliografice:

1. Тареев И. Е. и др. Справочник по нефрологии. Москва, Медицина, 1986, с. 254-261

Şef secție: EGOROVA Tamara

Examinator: TIMONIN Alexandr

Redactor: CANȚER Svetlana

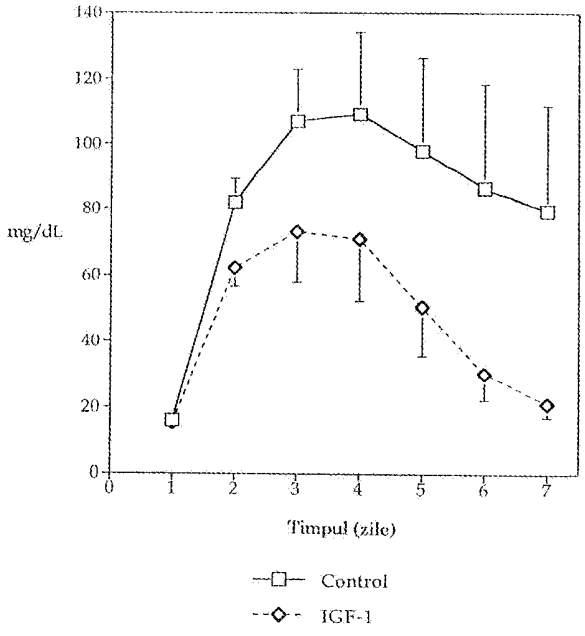

140
120
100
80
60
40
20
0
mg/dL
0
1
2
3
4
5
6
7
Timpul (zile)
Control
IGF-1

Fig. 1

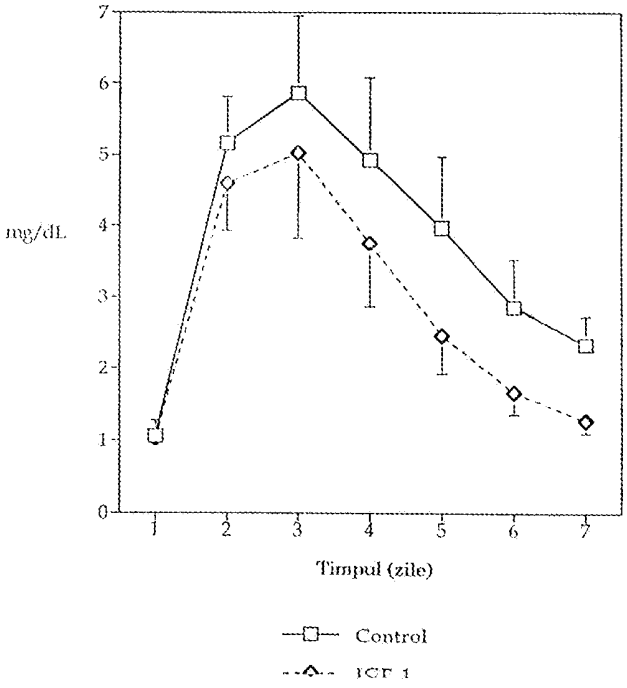

7
6
5
4
3
2
1
0
mg/dL
1
2
3
4
5
6
7
Timpul (zile)
Control
IGF-1

Fig. 2

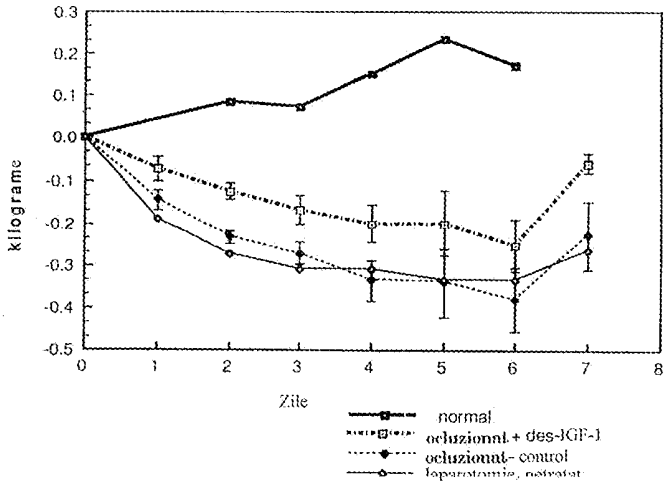

0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
kilograme
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Zile
normal
ocluzionat + des-IGF-1
ocluzionat- control

Fig. 3

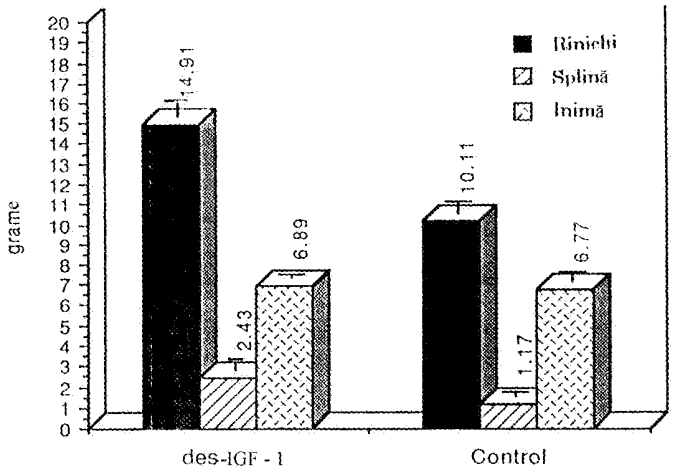

20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
grame
14.91
2.43
6.89
10.11
1.17
6.77
Rinichi
Splină
Inimă
des-IGF - 1
Control

Fig. 4

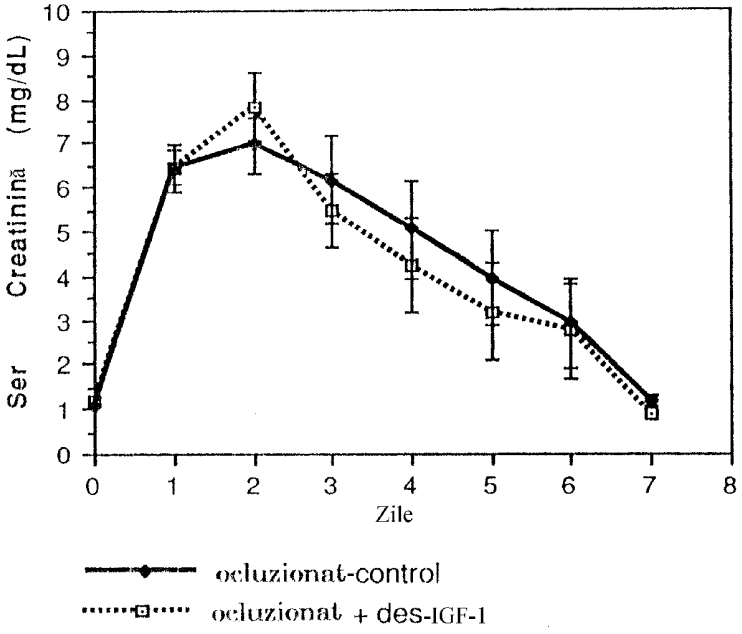

Ser Creatinină (mg/dL)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
Zile
ocluzionat-control
ocluzionat + des-IGF-1

Fig. 5

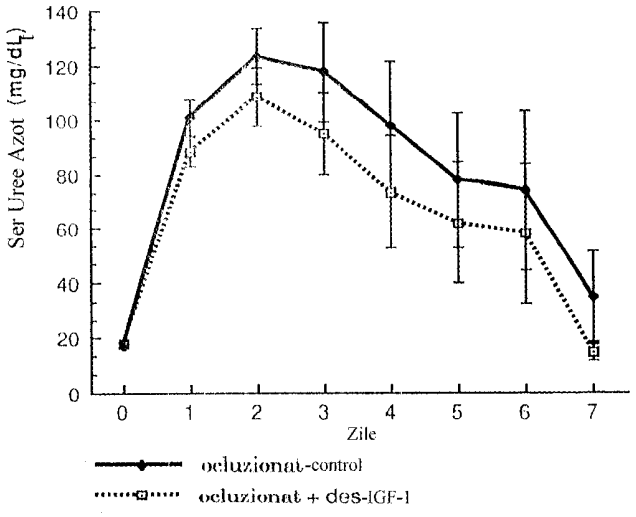

Ser Uree Azot (mg/dL)
140
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7
Zile
ocluzionat-control
ocluzionat + des-IGF-1

Fig. 6

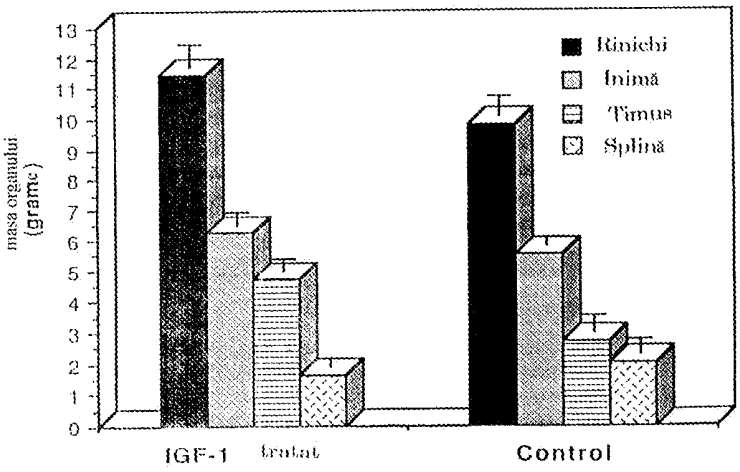

masa organului (grame)
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Rinichi
Inimă
Timus
Splină
IGF-1
Control

Fig. 7

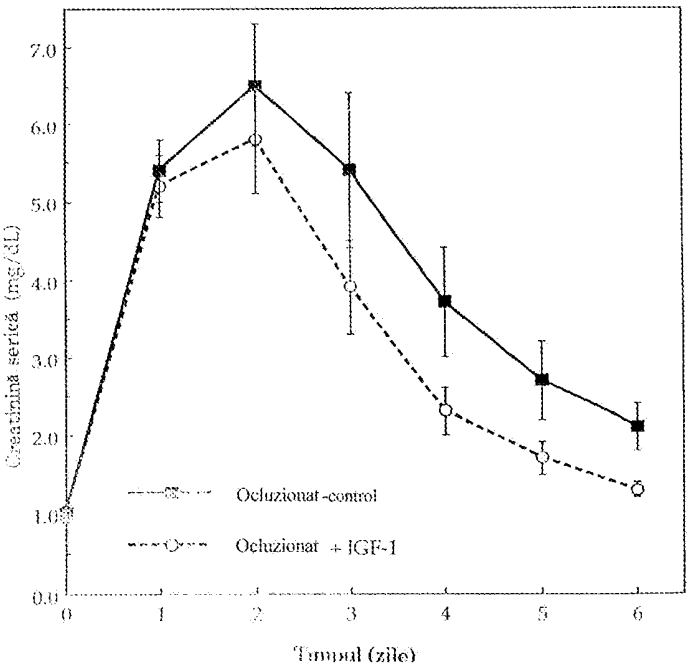

Creatinină serică (mg/dL)
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
1
2
3
4
5
6
Ocluzionat -control
Ocluzionat + IGF-1
Timpul (zile)

Fig. 8

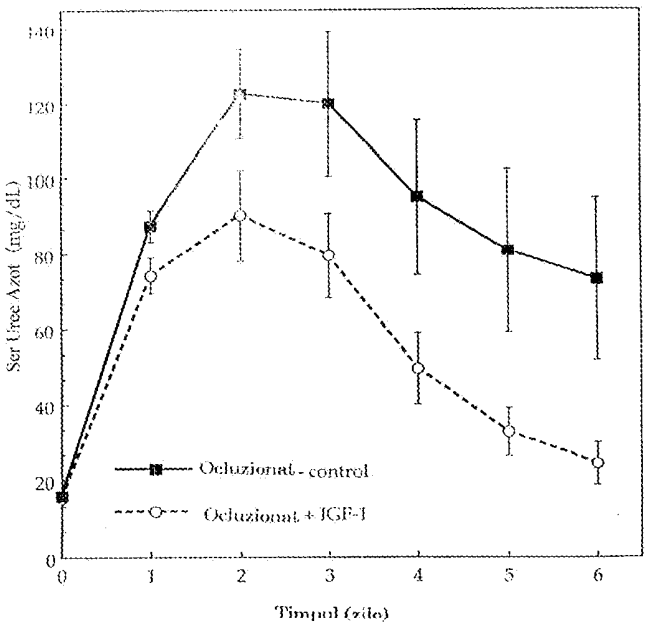

Ser Uree Azot (mg/dL)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Timpul (zile)
Ocluzionat - control
Ocluzionat + IGF-I

Fig. 9

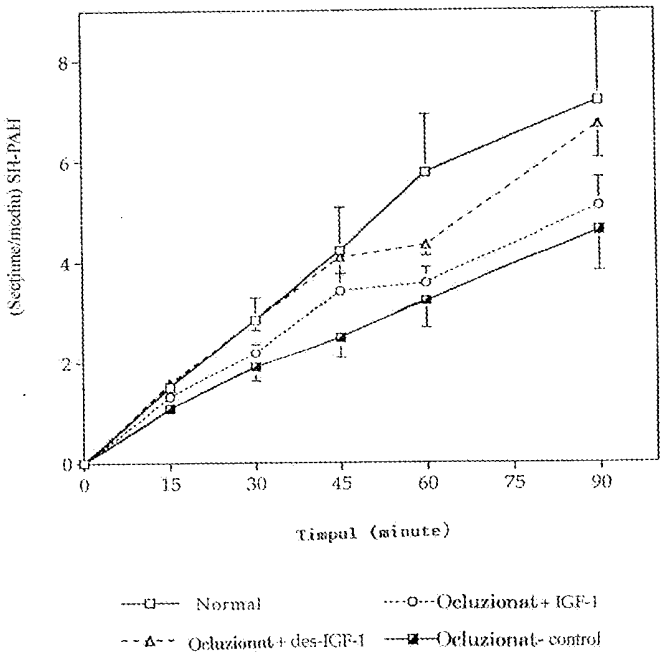

(Secțiune/mediu) SH-PAH
8
6
4
2
0
0
15
30
45
60
75
90
Timpul (minute)
Normal
Ocluzionat + IGF-I
Ocluzionat + des-IGF-I
Ocluzionat - control

Fig. 10

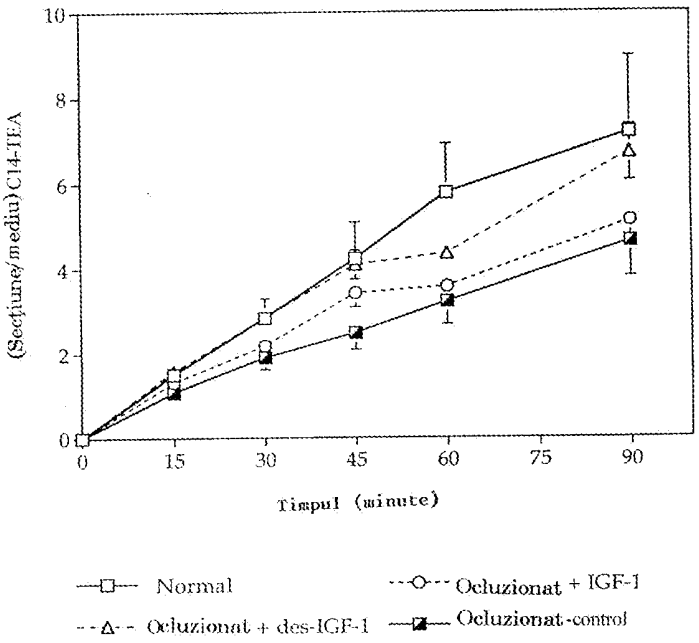

(Secțiune/mediu) C14-TEA
Timpul (minute)
Normal
Ocluzionat + IGF-1
Ocluzionat + des-IGF-1
Ocluzionat-control

Fig. 11

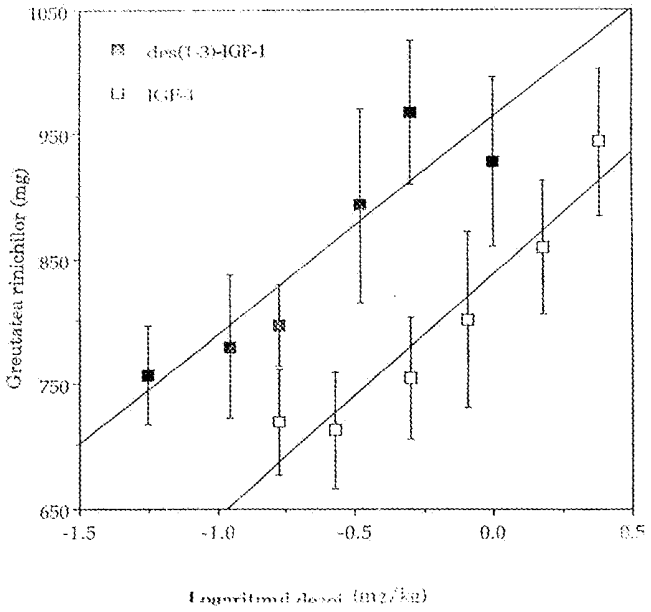

Greutatea rinichilor (mg)
des(1-3)-IGF-1
IGF-1

Fig. 12

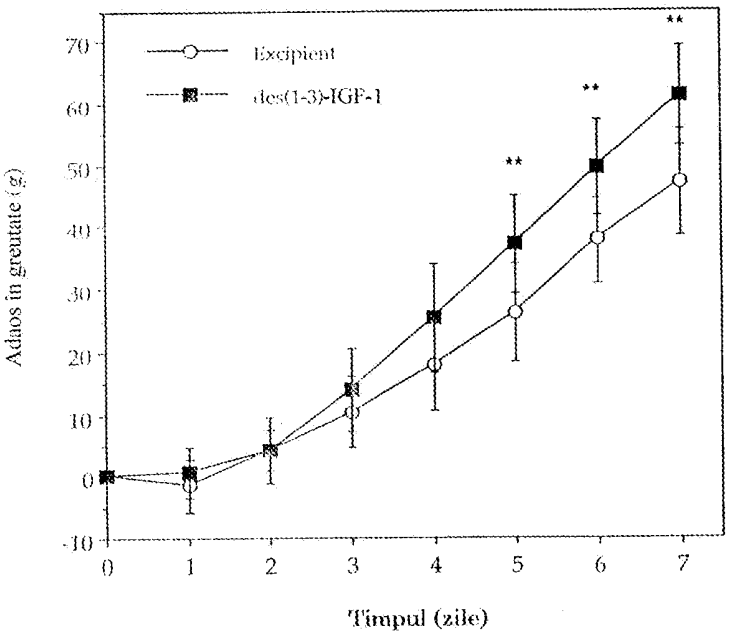

Excipient
des(1-3)-IGF-1
Adaos în greutate (g)
Timpul (zile)
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0
1
2
3
4
5
6
7
**
**
**

Fig. 13

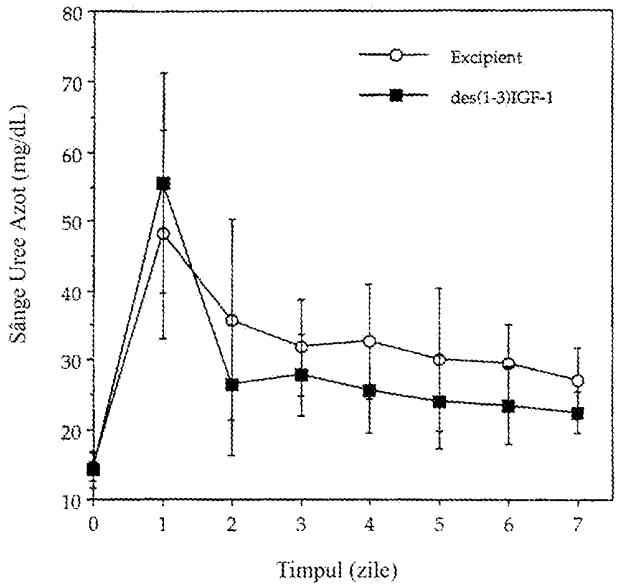

Excipient
des(1-3)IGF-1
Sânge Uree Azot (mg/dL)
Timpul (zile)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
6
7

Fig. 14

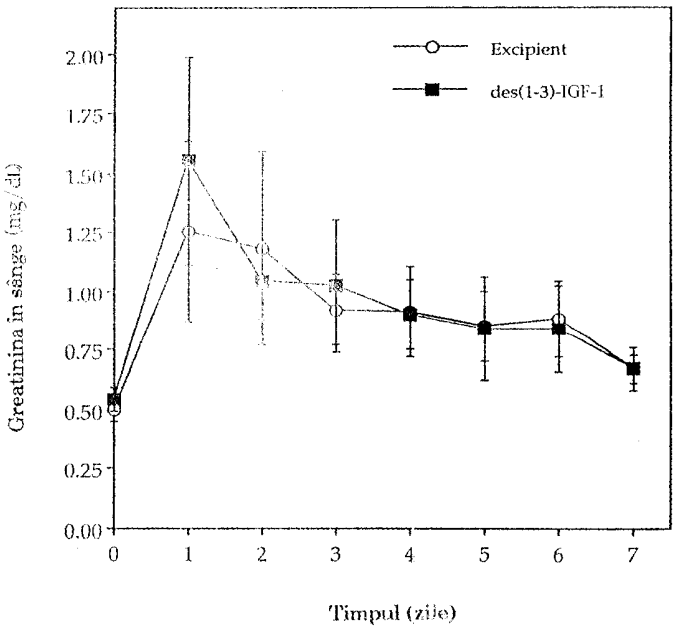

Excipient
des(1-3)-IGF-1
Creatinina în sânge (mg/dl)
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
1
2
3
4
5
6
7
Timpul (zile)

Fig. 15

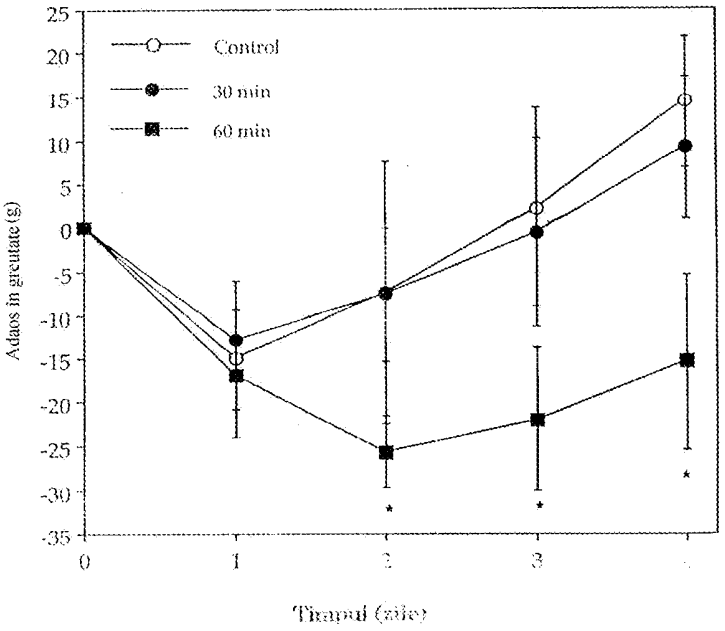

Control
30 min
60 min
Adaos în greutate (g)
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
0
1
2
3
Timpul (zile)

Fig. 16

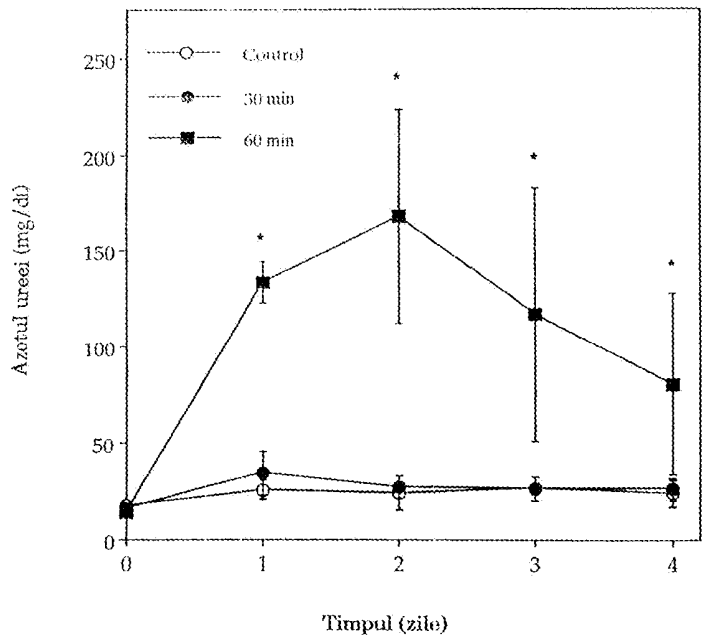

Control
30 min
60 min
Azotul ureei (mg/dl)
250
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
Timpul (zile)

Fig. 17

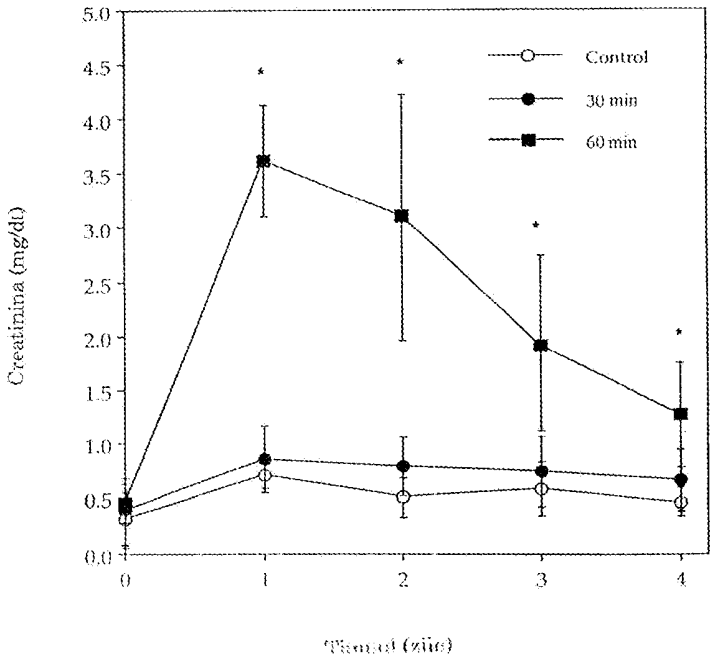

Control
30 min
60 min
Creatinina (mg/dl)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4

Fig. 18

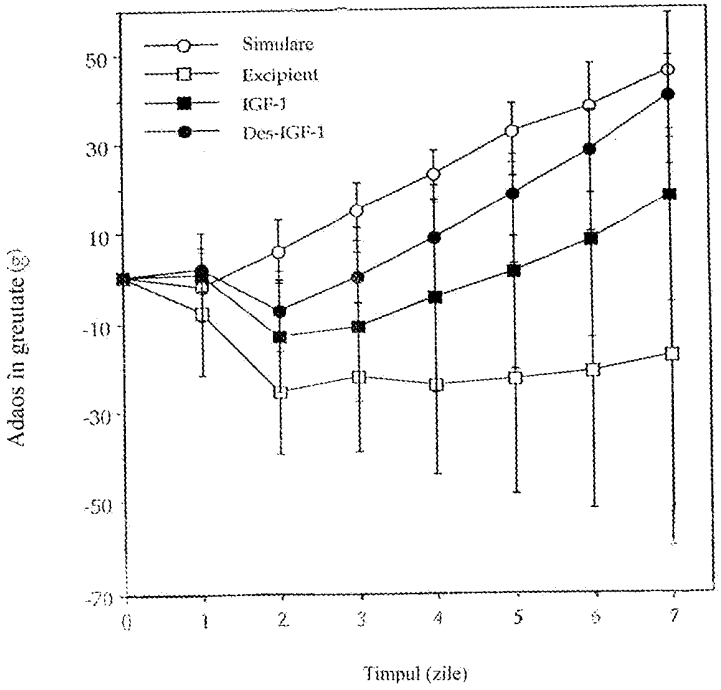

Simulare
Excipient
IGF-1
Des-IGF-1
50
30
10
-10
-30
-50
-70
0
1
2
3
4
5
6
7
Adaos în greutate (g)
Timpul (zile)

Fig. 19

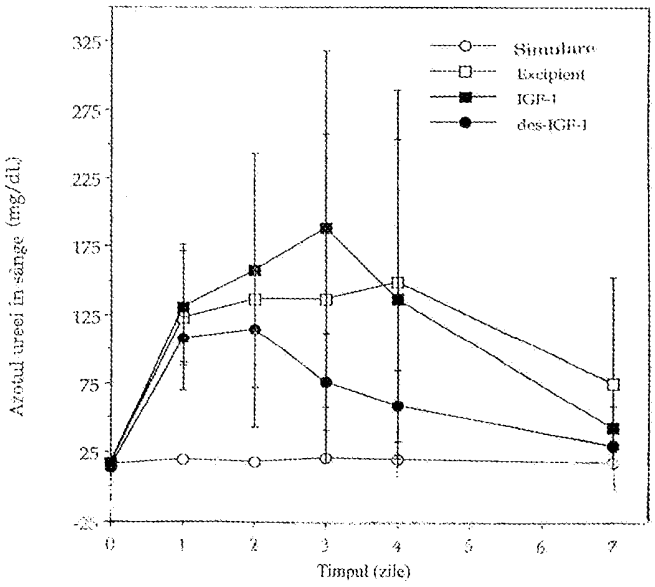

Simulare
Excipient
IGF-1
des-IGF-1
325
275
225
175
125
75
25
0
1
2
3
4
5
6
7
Azotul ureei în sânge (mg/dL)
Timpul (zile)

Fig. 20

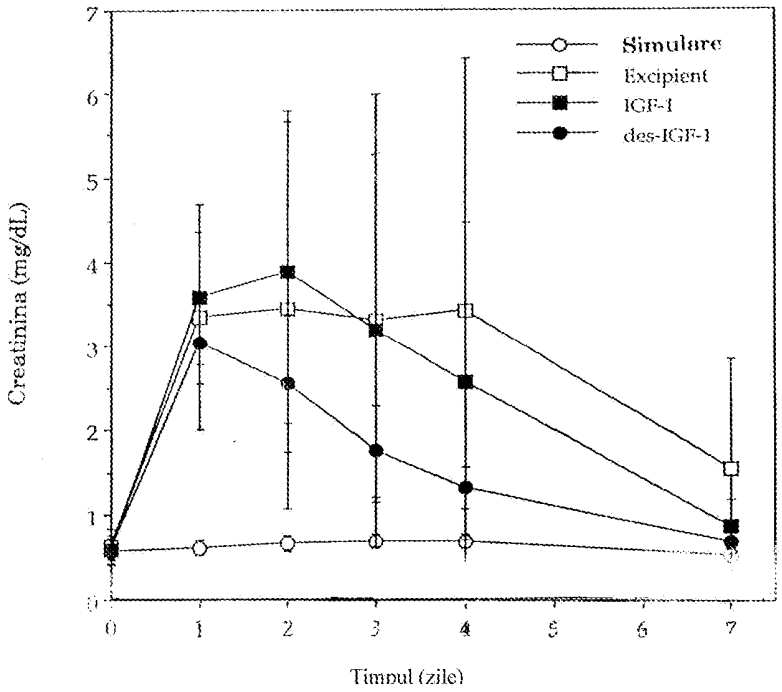

Simulare
Excipient
IGF-I
des-IGF-I
Creatinina (mg/dL)
Timpul (zile)
0
1
2
3
4
5
6
7

Fig. 21

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 96-0244 (22) Data depozit: 1993.09.15	(85) Data fazei naţionale PCT: 1996.06.25 (86) Cerere internaţională PCT: PCT/US93/08734, 1993.09.15

Prioritatea invocată:
(31) nr.: 07/949,594 32) data:1992.09.22 33) ţara :US
(51) Int. Cl. (7) : A 61 K 37/24, 37/36//(A61K37/24,37:02)(A61K37/36,37:24); A61P 13/12
Alţi indici de clasificare:
(54) **Titlul** : Metodă de profilaxie a insuficienţei renale acute la mamifere cu aplicarea factorului de creştere de tip insulinic IGF-I
(71) Solicitantul : Genentech, Inc., US
Termeni caracteristici : insuficienţa renală acută, IGF

I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării şi indici de clasificare Int. Cl. - 7)

MD Perioada: 1994-2000

EA Perioada: 1996-2000

II. Documente considerate ca relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate

☐ **Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II**	☐ **Informaţia referitoare la brevete paralele se anexează**
***categoriile speciale ale documentelor consultate:**	**P** - document publicat înainte de data depozitului naţional reglementat dar după data priorităţii invocate
A - document care defineşte statutul general al tehnicii	**T -** document publicat după data depozitului sau a priorităţii invocate, care nu aparţine stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidenţa principiul sau teoria care conţine baza invenţiei
E - document anterior dar publicat la data de depozit naţional reglementar sau după aceasta data	**X** - document de relevanţă deosebită: invenţia revendicată nu poate fu considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuţie data priorităţii invocate, poate contribui la data publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)	**Y** - document de relevanţă deosebită: invenţia revendicată nu poate fu considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceiaşi natură, aceasta combinaţie fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	**&** - document care face parte din aceiaşi familie de documente

Data efectuării de documentare: 2000.08.23

Examinatorul Timonin Alexandr