

### Область изобретения

Данное изобретение относится к области медицины и способам консервативного лечения. В частности, оно относится к лечению стресса и более конкретно к способу и композиции для лечения млекопитающих, в том числе людей, для обеспечения их улучшенными ответными реакциями и устойчивостью в отношении стресса.

#### Предпосылки и предшествующий уровень техники

Действия стресса на млекопитающее обычно проявляются в увеличении температуры тела вместе с изменением гемодинамических параметров, в том числе частоты сердечных сокращений и увеличения кровяного давления. Для пациентов, уже страдающих от повышенного кровяного давления (гипертензии), эти эффекты стресса могут быть, следовательно, особенно опасными, так как гипертензия представляет собой основной фактор риска для сердечно-сосудистого заболевания.

Стрессы, которым может подвергаться млекопитающее и которые могут приводить к этим эффектам, могут выражаться в большом разнообразии физических форм. Психологические стрессы, индуцированные механическим сдерживанием пациента, физической изоляцией, неожиданным воздействием опасности, шоком и т.п., превращаются в физические стрессы, влияющие на один или несколько органов тела. Подобным образом, физический стресс, такой как воздействие жары или холода, повреждение, в том числе хирургическое вмешательство, перенапряжение и т.п., приводит к отклоняющемуся от нормы функционированию органов тела. В настоящее время стресс признается как основной вредный фактор во многих заболеваниях, таких как сердечно-сосудистое заболевание, рак и иммунологическая дисфункция. Общие физиологические события, которые, по видимому, лежат в основе всех ответных реакций на стресс, включают в себя индукцию или положительную регуляцию синтеза во всех клетках тела группы специализированных внутриклеточных белков, известных как белки теплового стресса или белки теплового шока (БТШ). Эти БТШ функционируют, защищая эти клетки от потенциального повреждения любой формой прилагаемого стресса.

Одним конкретным видом физического стресса является ишемия, которая представляет собой депривацию (лишение) кислорода, являющуюся результатом уменьшенного кровотока. Ишемия в органе тела при достаточной тяжести вызывает, в конечном счете, гибель клеток в этом органе. Реперфузия этого ишемического органа посредством возобновления тока крови к нему часто приводит к дополнительно повреждению этого органа вследствие восстановления и не восстанавливает жизнеспособность уже поврежденных клеток. Повторяемое приложение слабого ишемического стресса к орга-

ну часто приводит к повышенной способности противостоять вызываемой стрессом ишемии, эффекту, который, как считают, частично связан с положительно регулируемым синтезом БТШ. Ишемия может встречаться в виде патологического состояния, например как результат спазма, тромбоза или другой обструкции (закупорки) кровеносного сосуда. Ишемия может быть намеренно индуцирована пережиманием кровеносных сосудов во время операции.

Известно предварительное формирование условных рефлексов (предкондиционирование) организма пациента-млекопитающего путем подвергания его контролируемому стрессам для лучшего оснащения организма для последующих воздействий неконтролируемых стрессов того же типа. Физические упражнения и тренировка, например, позволяют организму лучше справляться со стрессами, вызываемыми физическими нагрузками. Было показано, что повторяющееся нагревание тела или органа тела при контролируемых условиях обеспечивает тело или орган тела предварительным формированием условных рефлексов для лучшего перенесения последующих тепловых стрессов. Даже в отношении ишемии такой орган тела, как сердце, который прежде страдал от слабой ишемии, способен лучше противостоять действиям более поздней ишемии типа, вызывающего инфаркт миокарда. Как утверждают Gersh et al., "предварительное формирование условных рефлексов является важным феноменом, возможно, с клиническими проявлениями, поскольку повторяющиеся приступы стенокардии у пациентов могут развиваться в полный сформированный инфаркт. Пациенты с предынфарктной стенокардией могут страдать от менее тяжелого инфаркта, чем те пациенты, которые, как предполагается, подверглись внезапной коронарной окклюзии без возможности предварительного формирования условных рефлексов. В противоположность этому, пациенты с множественными кратковременными приступами ишемии могут стать устойчивыми посредством развития защитного предварительного формирования условных рефлексов согласно результатам, полученным на животных. Однако предварительное формирование условных рефлексов путем подвергания действию нагревания или ишемии явно является непрактичным в отношении большинства тел и органов тела млекопитающих.

В патенте Соединенных Штатов U.S. Patent 4 968 483 Mueller et al. описано устройство для оксигенации крови обработкой аликвоты крови пациента, экстракорпорально, смесью кислород/озон и ультрафиолетовым светом при контролируемой температуре. Это устройство предложено для применения в терапии с использованием гематологического окисления.

В патенте Соединенных Штатов U.S. Patent 5 591 457 Bolton описан способ ингибирования агрегации тромбоцитов крови у челове-

ка, способ стимуляции иммунной системы и способ лечения заболеваний периферических сосудов, таких как болезнь Рейно (симметричная гангрена), путем извлечения аликвоты крови из пациента, воздействия на нее смесью газов озон/кислород и ультрафиолетовым излучением при температуре в диапазоне приблизительно 37-43°C и затем повторного введения обработанной крови в пациента-человека.

В международной патентной заявке PCT/GB93/00259 Bolton описан сходный способ для увеличения содержания оксида азота (V) в крови пациента-млекопитающего, потенциально применимый в лечении таких состояний, как высокое кровяное давление, у пациентов-млекопитающих.

### **Существо изобретения**

Задачей данного изобретения является обеспечение нового способа лечения стресса у пациента-млекопитающего.

Следующей задачей является способ предварительного формирования условных рефлексов (предварительного кондиционирования) пациента-млекопитающего для улучшения устойчивости и реакции этого пациента на встречающийся впоследствии стресс.

Еще одной и важной задачей данного изобретения является обеспечение средства защиты целевых органов против вызываемого ишемией/реперфузией повреждения.

Данное изобретение основано на открытии, что аликвота крови пациента, подвергнутая экстракорпорально действию одного или нескольких стрессоров (факторов напряжения, т.е. агентов, вызывающих реакцию напряжения) и затем повторно введенная в пациента, оказывает благоприятные действия на последующую способность пациента противостоять неблагоприятным действиям встречающихся впоследствии стрессов, а также благоприятные действия на симптомы стресса. В соответствии с данной информацией приложение выбранных стрессоров к аликвоте крови экстракорпорально вызывает, по-видимому, изменения в некоторых клетках крови этой аликвоты. Это оказывает благоприятные действия на кровь пациента, в том числе индуцирует повышенную устойчивость к встречающимся впоследствии стрессам, как сообщается более подробно ниже.

Таким образом, в одном аспекте данное изобретение обеспечивает способ лечения пациента-млекопитающего для противодействия неблагоприятным действиям стресса и/или предварительного формирования условных рефлексов (предварительного кондиционирования) пациента для улучшенной сопротивляемости и реакции на встречающийся впоследствии стресс, предусматривающий извлечение из пациента аликвоты крови, экстракорпоральное воздействие на эту аликвоту одним или несколькими стрессорами и повторное введение

(инъекцию) этой обработанной аликвоты крови в пациента.

Стрессоры, которые могут быть, соответственно, использованы в данном изобретении, включают в себя окислительные стрессоры, тепловые стрессоры и ультрафиолетовое излучение, отдельно или в виде комбинации двух или трех таких стрессоров, и применяются одновременно или последовательно к этой аликвоте крови. Таким образом, в соответствии с более конкретным аспектом данного изобретения, обеспечен способ лечения пациента-млекопитающего для противостояния неблагоприятным эффектам стресса и/или предварительного формирования условных рефлексов пациента для улучшенной сопротивляемости и реакции на встречающийся впоследствии стресс, предусматривающий извлечение из пациента аликвоты крови, экстракорпоральное воздействие на извлеченную аликвоту крови, по меньшей мере, одним стрессором, выбранным из окислительной среды, ультрафиолетового излучения (УФ) и повышенной температуры, и повторное введение, по меньшей мере, части этой обработанной аликвоты крови в пациента.

### **Рисунки**

На сопутствующих рисунках

фиг. 1 - графическое представление результатов, полученных в соответствии с конкретным примером 1, описанным ниже;

фиг. 2 - графическое представление результатов температуры тела, полученных в соответствии с примером 2, описанным ниже;

фиг. 3 - графическое представление результатов частоты сердечных сокращений, полученных в соответствии с примером 2, описанным ниже;

фиг. 4 - графическое представление результатов диастолического кровяного давления, полученных в соответствии с примером 2, описанным ниже;

фиг. 5 - графическое представление результатов температуры тела, полученных в соответствии с примером 3, описанным ниже;

фиг. 6 - графическое представление результатов температуры тела, полученных в соответствии с примером 4, описанным ниже;

фиг. 7 - графическое представление результатов температуры тела, полученных в соответствии с примером 5, описанным ниже;

фиг. 8 - графическое представление результатов частоты сердечных сокращений, полученных в соответствии с примером 5, описанным ниже;

фиг. 9, 10, 11 и 12 - графические представления результатов, полученных в соответствии с примером 6, описанным ниже;

фиг. 13 и 14 - графические представления результатов, полученных в соответствии с примером 7 ниже; и

фиг. 15 - графическое представление результатов примера 8.

### Предпочтительные варианты

Способ данного изобретения включает в себя извлечение аликвоты крови из пациента, экстракорпоральное воздействие на эту аликвоту крови одним или несколькими стрессорами и повторное введение обработанной аликвоты крови в пациента. Такая обработка противодействует эффектам стресса, от которых пациент страдает в это время и вскоре после того, как получает эту обработку. Более существенно и важно, в результате этой обработки, предпочтительно ряда обработок, пациент лучше подготавливается для противостояния неблагоприятным действиям встречающегося впоследствии стресса. Способ обработки в соответствии с данным изобретением заставляет пациентов-млекопитающих при последующих стрессах проявлять пониженные ответные реакции на стресс, как определено меньшими повышениями температуры тела, меньшими увеличениями частоты сердечных сокращений и/или меньшими увеличениями диастолического кровяного давления.

Таким образом, в другом аспекте данное изобретение обеспечивает применение, для приготовления лекарственного средства для лечения стресса у пациента и для формирования условных рефлексов пациента для лучшего противостояния неблагоприятным эффектам встречающегося впоследствии стресса, аликвоты крови, которая была подвергнута экстракорпорально действию, по меньшей мере, одного стрессора, выбранного из окислительной среды, УФ-излучения и повышенной температуры.

Размер аликвоты крови, подлежащей обработке, находится в случае пациентов-людей обычно в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 400 мл, предпочтительно от приблизительно 0,1 до 100 мл и наиболее предпочтительно 5-15 мл, с подходящей пропорциональностью в соответствии с относительным весом тела для пациентов, не являющихся чело-веком. Следует обращать внимание на то, чтобы не применять избыточный уровень стрессоров до такой степени, которая вызовет разрушение клеточных мембран лейкоцитов, или будет индуцировано другое необратимое повреждение избыточного числа этих клеток в крови.

В предпочтительном способе данного изобретения аликвота крови может быть экстракорпорально подвергнута действию только теплового стрессора, действию только УФ-стрессора или действию только окислительного стрессора. Она может быть также подвергнута экстракорпорально действию как теплового стрессора, так и УФ-стрессора, как теплового стрессора, так и окислительного стрессора и как УФ-стрессора, так и окислительного стрессора. Она может быть также подвергнута действию всех трех стрессоров: теплового стрессора, окислительного стрессора и УФ-стрессора. При применении комбинации двух или более стрес-

соров они могут применяться последовательно в любом порядке или одновременно. Особенно благоприятные результаты получают посредством одновременного применения двух или трех стрессоров, в частности окислительного стрессора и УФ-стрессора, или одновременного применения всех трех стрессоров, как показано в характерных примерах, приведенных ниже.

Температурный стрессор должен поддерживать аликвоту в жидкой фазе и не должен нагревать ее выше приблизительно 45°C.

Термин "повышенная температура" в применении здесь означает температуру, более высокую, чем температура, которую кровь имеет в начале воздействия на кровь стрессоров в способе данного изобретения. В зависимости от конкретного способа манипулирования с аликвотой крови ее температура в начале способа могла бы быть такой низкой, как 15°C. Хотя аликвота крови находится при температуре тела (приблизительно 37°C) при начальном извлечении из пациента, процедура извлечения, добавление антикоагулянта, введение в устройство для обработки и хранение этой аликвоты крови - все могут осуществлять охлаждающее действие на кровь, снижая ее температуру вплоть до 15°C, когда начинается способ обработки. Таким образом, "стрессором повышенной температуры", применяемым в способе данного изобретения, является нагревание выше этой предварительной температуры. Для нагревания крови может быть использован любой подходящий источник тепла, известный в данной области, предпочтительно одна или несколько инфракрасных ламп. Таким образом, в предпочтительном способе данного изобретения аликвоту крови подвергают инфракрасному излучению в качестве стрессора, одному или в комбинации с другими стрессорами, а именно УФ-излучением и окислительной средой, причем инфракрасное излучение обычно, но необязательно, вызывает нагревание аликвоты крови.

Температурный стрессор предпочтительно нагревает аликвоту, подлежащую обработке, до температуры выше нормальной температуры тела, т.е. до приблизительно 38-44°C и наиболее предпочтительно до приблизительно 38-43°C, например до приблизительно 42,5°C, в течение периода времени от приблизительно 1/2 до приблизительно 10 мин и предпочтительно приблизительно 1-5 мин, наиболее предпочтительно приблизительно 3 мин.

Применение окислительного стрессора предпочтительно включает в себя воздействие на аликвоту смеси газов кислорода и озона медицинской чистоты, наиболее предпочтительно барботированием через аликвоту, в вышеупомянутом диапазоне температур, причем поток газа кислорода медицинской чистоты содержит в себе озон в качестве минорного (малого) компонента. Газ озон может быть обеспечен с использованием любого общепринятого источни-

ка, известного в данной области. Пригодным является поток газа, имеющий содержание озона  $\sim 1,0-100$  мкг/мл, предпочтительно 3-70 мкг/мл и наиболее предпочтительно  $\sim 5-50$  мкг/мл. Этот поток газа подают в аликвоту при скорости  $\sim 0,01-2$  л/мин, предпочтительно 0,05-1,0 л/мин и наиболее предпочтительно при 0,06-0,30 л/мин (стандартные условия (STP)). Альтернативное применение окислительных стрессоров включает в себя добавление пероксидов, таких как пероксид водорода, к крови и добавление биохимически приемлемых окислительных агентов, таких как перманганаты и периодаты, к аликвоте крови.

Стрессор ультрафиолетового излучения применяют подходящим образом посредством облучения аликвоты, подлежащей обработке, из подходящего источника УФ-излучения. Ультрафиолетовое излучение может быть обеспечено любым общепринятым источником, известным в данной области, например многочисленными ультрафиолетовыми лампами низкого давления. Способ данного изобретения предпочтительно использует стандартный источник УФ-С ультрафиолетового излучения, а именно УФ-лампы, излучающие длины волн С-диапазона, т.е. длины волн, более короткие, чем 280 нм. Может быть также использовано ультрафиолетовое излучение, соответствующее стандартным источникам УФ-А и УФ-В. Предпочтительно применяемыми являются ультрафиолетовые лампы низкого давления, которые генерируют линейчатый спектр, в котором, по меньшей мере, 90% излучения имеют длину волны приблизительно 253,7 нм. Подходящую дозу такого УФ-излучения, применяемого одновременно с вышеупомянутыми температурным стрессором и стрессором окислительной среды, получают из ламп с выходной мощностью от приблизительно 5 до приблизительно 25 Вт, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 10 Вт, при выбранной длине волны УФ, размещенных вокруг резервуара для проб, содержащего аликвоту. Каждая такая лампа обеспечивает интенсивность на расстоянии 1 м от приблизительно 40-80 мкВт/см<sup>2</sup>. Выгодно использовать несколько таких ламп, окружающих резервуар для проб, с объединенной выходной мощностью при 253,7 нм 15-40 Вт, предпочтительно 20-40 Вт, действующих при максимальной интенсивности. При поверхности падения лучей (поверхности крови) прилагаемая УФ-энергия может быть от  $\sim 0,25$  до 4,5 Дж/см<sup>2</sup> во время 3-минутной экспозиции, предпочтительно 0,9-1,8 Дж/см<sup>2</sup>. Такая обработка обеспечивает аликвоту крови, которая подходящим образом модифицирована в соответствии с данным изобретением и готова для повторного введения в пациента.

Время, в течение которого аликвоту подвергают воздействию стрессора (стрессоров), может быть от нескольких секунд до прибли-

тельно 60 мин. Обычно оно находится в диапазоне времени от приблизительно 0,5 до 60 мин. Это зависит до некоторой степени от выбранной интенсивности УФ-излучения, температуры и скорости, с которой окислительный агент подается в аликвоту. Некоторое экспериментирование для установления оптимальных периодов времени и доз может быть необходимым со стороны оператора после установки уровней других стрессоров. При наиболее сильных стрессорных условиях предпочтительные периоды времени будут находиться в приблизительном диапазоне 0,5-10 мин, наиболее предпочтительно 2-5 мин и обычно около 3 мин. Исходная температура крови и скорость, с которой она может нагреваться или охлаждаться до заданной температуры, имеет тенденцию варьирования от пациента к пациенту.

В практике предпочтительного способа данного изобретения аликвота крови (или разделенных клеточных фракций крови или смесей разделенных клеток, в том числе тромбоцитов, причем эти различные содержащие лейкоциты комбинации вместе с цельной кровью называются во всем описании обобщенно "аликвотой") может быть обработана стрессорами при помощи устройства типа, описанного в патенте Соединенных Штатов 4 968 483 Mueller. Аликвоту помещают в подходящий стерильный, пропускающий УФ-излучение резервуар, который затем вставляют в эту машину. Температуру аликвоты доводят до заданной величины, например  $42,5 \pm 1^\circ\text{C}$ , при помощи подходящего источника тепла, такого как ИК-лампа, и УФ-лампы включают на фиксированный период времени перед подачей потока газа в аликвоту для обеспечения окислительного стресса, давая выходной мощности УФ-ламп стабилизироваться. Затем газовую смесь кислород/озон известного состава и с регулируемой скоростью потока подают в аликвоту в течение заданной продолжительности времени 0,5-60 мин, предпочтительно 2-5 мин и наиболее предпочтительно около 3 мин, как обсуждалось выше, так что аликвота испытывает действие всех трех стрессоров одновременно. Таким путем аликвоту крови подходящим образом модифицируют в соответствии с данным изобретением достаточно для достижения желаемых эффектов.

Повторная инъекция (реинъекция) обработанной аликвоты крови в пациента может быть выполнена внутривенно, внутримышечно, подкожно или другими общепринятыми способами введения. Предпочтительной является внутримышечная реинъекция.

Способ данного изобретения демонстрирует применимость как в лечении симптомов стресса пациента, очевидных в момент введения обработанной крови, так и в предварительном формировании условных рефлексов пациента-млекопитающего против неблагоприятных действий встречающегося впоследствии стресса

любого из вышеупомянутых типов. Это предварительное формирование условных рефлексов (предкондиционирование) не является специфическим в отношении обеспечения устойчивости к конкретному стрессу или типу стресса, но, по видимому, является формированием условных рефлексов общего применения. Пациент, который подвергался обработке или ряду обработок в соответствии со способом данного изобретения, будет проявлять явно пониженные неблагоприятные реакции на встречающийся впоследствии стресс, такие как явно уменьшенное повышение температуры тела, и/или уменьшенное увеличение частоты сердечных сокращений, и/или уменьшенное увеличение диастолического кровяного давления в ответ на стресс в сравнении с подобным, но не подвергнутым обработке пациентом. Таким образом, этот способ применим, в частности, для пациентов, которые запланированы для программы с возможностью стресса, такой как хирургическое вмешательство с заранее определенной датой в будущем. Они могут предварительно формировать условные рефлексы их тел для готовности к операции путем прохождения обработки или ряда обработок в соответствии с данным изобретением перед операцией, в результате чего они будут противостоять хирургическому вмешательству лучше и будут приходить в нормальное состояние после операции более быстро, снижая таким образом время госпитализации.

Другим предпочтительным применением данного изобретения является защита тканей и органов от индуцированного стрессом повреждения способом, сходным с предварительным формированием условных рефлексов в отношении ишемии. Как отмечалось ранее, повторяющиеся слабые ишемические (стенокардитические) приступы могут делать ткани и органы менее чувствительными к индуцированному стрессом повреждению посредством предварительного формирования условных рефлексов к ишемии, хотя применение ишемического предварительного формирования условных рефлексов существующими в настоящее время способами является в значительной степени непрактичным. Способ данного изобретения может заменить ишемическое предварительное формирование условных рефлексов, поскольку ишемия представляет собой вид физического стресса. Таким образом, способ данного изобретения предоставляет потенциал для лечения нестабильной стенокардии и для уменьшения размера инфаркта, лечения, не используемого эффективно доступными способами терапии.

Подобным образом способ данного изобретения применим в защите органов тела, предназначенных для трансплантации. Обработка тела донора по способу данного изобретения служит для защиты органов тела против повреждения, возникающего в результате неизбежной ишемии, от которой этот орган будет

страдать при удалении из тела донора, транспортировке и последующем хирургическом введении в тело реципиента. Обработка в соответствии с данным изобретением продлевает полезную жизнь трансплантируемого органа между его удалением из тела донора и его хирургическим введением в тело реципиента, уменьшая тем самым потери жизнеспособных трансплантируемых органов вследствие задержек транспортировки.

Далее, особое клиническое применение способа данного изобретения заключается в лечении пациентов, страдающих от преходящих (временных) нарушений мозгового кровообращения (ТИА, прединсультов), которые обусловлены временной обструкцией кровотока к определенным участкам мозга. Обычно они являются указанием на возможность страдания от основного инсульта в ближайшем будущем. Подвергание таких пациентов обработке в соответствии со способом данного изобретения при возникновении ТИА будет предварительно формировать условные рефлексы мозга для избежания или, по меньшей мере, ослабления тяжести эффектов приближающегося основного инсульта.

Стрессоры, применяемые для обработки аликвоты крови в способе данного изобретения и описанные в экспериментах, подробно разъясненных ниже, находятся среди стрессоров, о которых известно, что они действуют посредством активации пути стресс-активируемой протеинкиназы (САП-киназы) в клетках крови. Ожидается, что другие стрессоры, о которых известно, что они активируют путь САП-киназы, при применении к крови будут иметь такие же действия на аликвоту крови в способе данного изобретения, а именно приведение аликвоты крови в состояние, в котором после реинъекции в пациента она будет оказывать благоприятные действия на органы тела в защите их против стресса, как описано выше. Такие другие стрессоры включают в себя гамма-излучение, гиперосмолярность, химиотерапевтические агенты (цисплатина и митомицин С, например), воспалительные цитокины, такие как TNF $\alpha$  и IL-1, туникамицин, анизомицин и арсенит натрия. Стресс-активируемые протеинкиназы (САПК), также известные как cJun-аминоконцевые киназы (JNK), представляют собой семейство протеинкиназ, подобных Erk-1- и Erk-2 MARK (митоген-активируемым протеинкиназам). Они могут активироваться через их пути трансдукции сигналов (путь САП-киназы или путь САП/JN-киназы) для осуществления их функции фосфорилирования. Члены семейства САП-киназы включают в себя p38 HOG, JNK (Jun N-концевую киназу) и BMK-1. Известно, что эти же стрессоры активируют также путь белков теплового шока.

Определение состояния активации пути САП-киназы может быть полезным индикато-

ром того, была или не была аликвота крови обработана в соответствии со способом данного изобретения, делающим ее готовой для реинъекции в пациента для целей предварительного формирования условных рефлексов против стресса. Имеются известные стандартные способы, доступные и опубликованные в литературе, для определения активации пути САП-киназы. Они включают в себя иммунопреципитацию антителами, специфическими для индивидуальных САП-киназ (JNK, p38 и SAP-K3, например), с последующим блоттингом фосфотирозина, который, если он положительный, свидетельствует об активации пути САП-киназы.

Полезные эффекты данного изобретения были продемонстрированы *in vivo* клиническими экспериментами на молодых и взрослых крысах, в частности на крысах инбредного штамма генетически гипертензивных крыс (SHR). Генетически гипертензивные крысы (SHR) являются наиболее широко используемой моделью животных для исследования гипертензии и хорошо известны и легко доступны исследователям в данной области. SHR имеют несколько генетических дефектов, причем одним из наиболее важных является неспособность продуцирования подходящих количеств БТШ при воздействии стресса. SHR развивают гипертензию быстро и обнаруживают значительное увеличение частоты сердечных сокращений, кровяного давления и температуры тела в ответ на стресс. Они представляют модель повышенной чувствительности к стрессу. Результаты, полученные с использованием этих крыс, обеспечивают надежные указания на потенциальные результаты, получаемые с пациентами-людьми. Эти эффекты были также показаны клиническими экспериментами *in vivo* на собаках, подробно описанными ниже в примере 8.

#### Пример 1.

Кровь из умерщвленных крыс (SHR) того же самого штамма, который использовали в качестве тест-животных, собирали, обрабатывали антикоагулянтом цитратом натрия и объединяли. Затем часть этой крови помещали в стерильный резервуар и подвергали одновременно действию стрессоров: УФ-излучения, окислительной среды газовой смеси озон/кислород и повышенной температуры, в устройстве, описанном в общих чертах в вышеупомянутом патенте Соединенных Штатов 4 968 483 Mueller. Более конкретно пробу крови в стерильном прозрачном для УФ резервуаре нагревали инфракрасными лампами до 42,5°C и при поддержании при этой температуре подвергали УФ-излучению с длиной волны 253,7 нм при вышеописанных предпочтительных условиях. Одновременно через эту пробу крови барботировали газовую смесь медицинской чистоты кислорода и озона с содержанием озона 13,5-15,5 мкг/мл при скорости потока в диапазоне от 60 до 240

мл/мин. Время одновременного воздействия УФ и газовой смеси было 3 мин.

Дополнительную порцию объединенной крови в качестве контроля подобным образом помещали в стерильный резервуар и в вышеупомянутое устройство, но не нагревали, не подвергали действию УФ-излучения и действию газовой смеси озон/кислород. Кроме того, для обеспечения дополнительного контроля готовили стерильный водный физиологический солевой раствор.

Всего 44 семинедельные крысы (SHR) отбирали и делили на три группы, группу А, содержащую 15 животных, группу В, содержащую 15 животных, и группу С, содержащую 14 животных. В течение периода 10 дней (при возрасте 7-9 недель) каждое животное группы А получало ежедневную внутриягодичную инъекцию 150 мкл обработанной УФ, нагреванием и озоном крови. Каждое животное группы В получало в то же самое время такую же ежедневную инъекцию необработанной крови. Каждое животное группы С получало в то же самое время подобную инъекцию физиологического солевого раствора.

В возрасте 9 недель спустя 4 дня после завершения инъекций животных анестезировали и в бедренную артерию каждого животного хирургически вводили телеметрический зонд. Этот телеметрический зонд (товарное название DATAQUEST LABPRO, доступный из Data Sciences International) представляет собой коммерчески доступный зонд, снабженный радиопередатчиком, позволяющим получать и регистрировать сигналы частоты сердечных сокращений, систолического кровяного давления, диастолического кровяного давления и другие сигналы без дополнительного манипулирования с животными, которое может индуцировать дополнительные, неконтролируемые реакции на стресс. Дополнительный зонд был хирургически введен в перитонеальную полость каждого животного для измерения температуры тела.

Непрерывные ежедневные регистрации температуры тела, кровяного давления и частоты сердечных сокращений производили для каждого животного в течение 10-дневного периода после операции, причем считываемые показания регистрировались во время неактивной части (при отдыхе) суточного цикла животного, т.е. части с дневным светом ("при свете"), и во время активности (ночью). Животные группы А, которые получали инъекции крови, обработанной в соответствии со способом данного изобретения, продемонстрировали значимо более быстрое восстановление нормальной температуры крови после хирургического вмешательства (6 дней против 10 дней) в сравнении с животными группы В, которые получали необработанную кровь, и животными группы С, которые получали инъекции солевого раствора, как показано, в частности, показаниями, взятыми во

время периодов отдыха. Различия являются менее явными из показаний в ночное время, фазы активности, что позволяет предположить, что более высокие уровни кортизола, присутствующие во время активности, могут оказывать влияние на эти результаты. Это демонстрирует значимое действие обработки данного изобретения на ослабление ответной реакции организма млекопитающего на стресс, вызванный хирургическим вмешательством.

Результаты этих экспериментов представлены графически на фиг. 1, графике измеренных температур тела в зависимости от дней после операции, причем каждая нанесенная на график величина представляет собой среднее значение, полученных из всей группы во время периодов отдыха. Кривая А получена из животных группы А, кривая В из животных группы В и кривая С из животных группы С. Результаты группы, инъецированной солевым раствором, и группы необработанной крови (В против С) не обнаружили значимого различия (величина Р 0,6764). Однако результаты из группы обработанной крови являются значимо различными (А против В,  $p=0,008$ ; А против С,  $p=0,0002$ ).

Пример 2.

44 животных, обработанных, как описано в примере 1, а именно группу А, содержащую 15 животных, которые получали инъекции крови, обработанной в соответствии со способом данного изобретения, группу В, содержащую 15 животных, которые получали инъекцию необработанной крови, и группу С, содержащую 14 животных, которые получали солевой раствор, спустя 10 дней после операции по имплантации зонда, описанной в примере 1, подвергали психологическому стрессу посредством стандартного теста иммобилизационного стресса путем помещения их в небольшие сдерживающие клетки на период 30 мин (возраст животных - 11 недель). Во время этого периода иммобилизации регистрировали показания температуры тела, кровяного давления и частоты сердечных сокращений с интервалами, равными 1 мин.

Прилагаемая фиг. 2 является графическим представлением результатов измерений температуры тела этих трех групп, а именно графиком времени (ордината) против температуры тела (абсцисса) на протяжении 30-минутной продолжительности теста иммобилизационного стресса. Как показывает фиг. 2, кривая 2А, полученная из экспериментальной группы А, находится постоянно и значимо ниже кривой 2В, полученной из контрольной группы В, и кривой 2С, полученной из контрольной группы С. Статистический анализ всех полученных данных подтверждает высокую значимость различий в фигурах, полученных из экспериментальной группы А.

Фиг. 3 из прилагаемых рисунков представляет графически результаты измерений частоты сердечных сокращений на трех группах, причем

частота сердечных сокращений (удары в минуту, у/мин, (bpm)) нанесена на график в виде ординаты против времени теста на стресс. Эти результаты (усредненные на животных в каждой группе) опять показывают, что группа, которая получала инъекции крови, обработанной в соответствии с данным изобретением, группа А, имела меньшее увеличение частоты сердечных сокращений в сравнении с двумя другими группами на протяжении, по существу, всей продолжительности этого теста. Различия между соответствующими группами являются статистически значимыми:  $p=0,0001$  в каждом случае.

Фиг. 4 прилагаемых рисунков представляет графически результаты измерений диастолического кровяного давления каждой из трех тест-групп, причем диастолическое кровяное давление (мм рт.ст.) нанесено на график в виде ординаты против времени теста на стресс. Величины из группы А (усредненные), группы, которая получала инъекции крови, обработанной в соответствии с данным изобретением, опять постоянно и значимо ( $p=0,0001$  в каждом случае) находятся ниже величин из двух других групп.

Пример 3.

Животных группы С из примера 2, т.е. контрольной группы, которая получала в возрасте 7-9 недель инъекции физиологического солевого раствора, делили на три подгруппы Са, Сб и Сс. В каждой группе проводили курс 10-дневных инъекций, соответственно 150 мкл обработанной крови, 150 мкл необработанной крови и 150 мкл физиологического солевого раствора. Курс инъекций начинали, когда животные имели возраст 12 недель, т.е. были полностью зрелыми животными. Телеметрические зонды оставались на месте. Тот же самый 30-минутный тест иммобилизационного стресса проводили на каждом животном в возрасте 16 недель и регистрировали частоту сердечных сокращений, кровяное давление и температуру тела.

В ответной реакции температуры тела группа Са, инъецированная кровью, обработанной в соответствии со способом данного изобретения, обнаружила значимо более притупленное увеличение во время периода стресса. Это иллюстрировано на фиг. 5, графическом представлении результатов, одинаковом с фиг. 2. Можно видеть, что кривая Са, полученная из животных группы Са, находится постоянно ниже, чем кривая Сб, полученная из животных группы Сб, и постоянно ниже, чем кривая Сс, полученная из животных группы Сс. Результаты варианта с обработанной кровью против результатов варианта с необработанной кровью и результаты варианта с обработанной кровью против результатов варианта с солевым раствором являются статистически значимыми:  $p=0,0001$  в каждом случае.

#### Пример 4.

Экспериментально обработанных животных группы А из примера 2, которые получали инъекции крови, обработанной в соответствии с данным изобретением, в возрасте 7-9 недель делили на три подгруппы, помеченные как Аа, Аb и Ас, 5 животных в каждой группе. Затем их подвергали второй серии 10-дневных инъекций 150 мкл, соответственно, обработанной крови, необработанной крови и физиологического солевого раствора. Курс инъекций начинали, когда животные имели возраст 12 недель. Телеметрические зонды оставляли на месте, где они находились в примере 1, так что не требовалась операция. Затем этих животных опять подвергали в возрасте 16 недель тому же самому тесту иммобилизационного стресса, описанному в примере 2, в течение 30 мин, и производили измерения с интервалами, равными 1 мин, частоты сердечных сокращений, кровяного давления и температуры тела.

Различия между этими группами в отношении увеличения температуры тела были очень значимыми. Они иллюстрированы на фиг. 6, графике температуры тела в зависимости от времени, на основе средних величин, подобном фиг. 2. После приблизительно 12-ой минуты этого теста группа Аа, которая получила 2 курса инъекций кровью, обработанной в соответствии с данным изобретением, обнаруживала постоянно и значимо ( $p=0,0019$  или менее в каждом случае) самое низкое повышение температуры тела. Кривая Аа, полученная из группы Аа, находится постоянно ниже кривой Аb, полученной из группы Аb, и кривой Ас, полученной из группы Ас. Можно видеть, что величины на кривой Аа являются также более низкими, чем величины на кривой А фиг. 2, что указывает на то, что вторая обработка в соответствии с данным изобретением давала дополнительные преимущества в формировании условных рефлексов этих животных в отношении переносимости стресса. В противоположность этому, величины на кривой Ас были более высокими, чем величины на кривой А фиг. 2, и более низкими, чем величины на кривой С фиг. 2, указывая на то, что эффекты этой обработки склонны утрачиваться после приблизительно 24 дней от завершения курса обработки при отсутствии второй "бустерной" обработки в соответствии с данным изобретением.

#### Пример 5.

Ответные реакции на стресс животных из примера 1, которые прошли два курса инъекции одной и той же жидкостью (солевым раствором с последующим солевым раствором, необработанной кровью с последующей необработанной кровью и обработанной кровью с последующей обработанной кровью), при возрасте 7 недель и 12 недель измеряли во время второго теста иммобилизационного стресса, проводимого, как описано ранее, на животных в возрасте 16 не-

дель. Результаты, полученные из измерений температуры тела, показаны на фиг. 7, графике температуры тела против времени во время 30-минутного теста на стресс, одинаковом с фиг. 2. Кривая АА получена из измерений (среднее 5 животных) животных, которые получили два курса 10-дневных инъекций крови, обработанной в соответствии с данным изобретением. Кривая ВВ получена из измерений (среднее 5 животных) животных, которые получали два таких курса инъекций необработанной крови. Кривая СС получена из измерений (среднее 5 животных) животных, которые получали два таких курса инъекций солевого раствора. Как показывает эта фигура, величины, полученные из животных, обработанных в соответствии со способом данного изобретения, находятся стойко и значимо ( $p=0,0001$ ) ниже величин, полученных из двух других групп.

Фиг. 8 из прилагаемых рисунков подобным образом представляет измерения частоты сердечных сокращений для этих трех групп во время теста на стресс. Опять кривая АА, полученная из животных, которые получили два курса инъекции крови, обработанной в соответствии с данным изобретением, находится значимо ( $p=0,0001$ ) ниже, чем две другие кривые.

#### Пример 6.

В дополнительных демонстрациях применения способа данного изобретения в предварительном формировании условных рефлексов органов и тканей тела человека против неблагоприятных воздействий ишемического стресса и последующей реперфузии проводили эксперименты на генетически гипертензивных крысах (SHR) описанного выше типа посредством индукции ишемии в почках этих животных, после того как они были обработаны согласно способу данного изобретения. Процедура была следующей.

Группу из 63 SHR делили на две приблизительно равные подгруппы, А и В. Подгруппа А получала два курса инъекций крови из объединенной крови (пула), описанной в примере 1, причем инъекцируемая кровь была обработана стрессорами ультрафиолетовым светом, газовой смесью озон-кислород и повышенной температурой одновременно так же, как описано в примере 1. Первый курс инъекций начинался в возрасте 7 недель и включал в себя 10 инъекций, на протяжении периода 10 дней, алиquot 150 мкл обработанной крови, инъекцируемой внутриягдично. Второй курс инъекций начинался в возрасте 12 недель и включал в себя 10 инъекций, вводимых ежедневно, тех же самых объемов обработанной крови, вводимых таким же образом. Животные подгруппы В получали инъекции физиологического солевого раствора, в тех же самых временных точках и в тех же количествах и, следовательно, служили контролями.

Спустя 1 день после второго курса инъекций крыс анестезировали под легкой газовой

(N<sub>2</sub>O) анестезией и правую почку каждого животного извлекали через разрез спинки. Оклюзивный зажим помещали на оставшуюся почечную артерию и вену для подвергания левой почки преходящей ишемии (временному прекращению кровоснабжения) в течение 60 мин. Кожу временно закрывали скобками. Затем животных наблюдали в отношении степени повреждения, возникающего вследствие ишемии и/или последующей реперфузии, посредством взятия проб крови для определения креатинина в сыворотке и мочевинового азота крови (BUN) и посредством определения коэффициента выживаемости. После взятия исходной пробы крови кожу окончательно закрывали.

Коэффициент выживаемости подвергали мониторингу ежедневным подсчетом выживших животных. Спустя 14 дней выживали 55% животных подгруппы А, которые получали инъекции обработанной крови, в сравнении только с 32% животных подгруппы В, обработанных солевым раствором. Коэффициенты выживаемости показаны более подробно на прилагаемой фиг. 9, графике процента выживших животных по ординате в зависимости от дней после почечной ишемии по абсциссе. На фиг. 9 сплошная линия получена из результатов из животных подгруппы А, а пунктирная линия получена из результатов из животных подгруппы В.

Эти результаты показывают значимое ( $p < 0,05$ , логарифмический ранговый критерий) улучшение в животных, которые получили обработку в соответствии с данным изобретением, свидетельствуя об успешном предварительном формировании условных рефлексов против повреждения, возникающего вследствие ишемии и/или последующей реперфузии, посредством способа данного изобретения.

Пробы крови объемом 100-200 мкл брали из выживших реперфузированных животных в дни 1, 3, 6 и 12 после ишемии из хвостовой артерии и анализировали на содержание креатинина и на содержание мочевинового азота крови (BUN). Высокое содержание креатинина свидетельствует о нарушенной почечной функции, заключающейся в том, что почки не функционируют адекватно в отношении выведения креатинина из крови. Содержание BUN подобным образом является мерой эффективности почечной функции: чем ниже BUN и содержание креатинина крови, тем более эффективна почечная функция. Оба теста являются стандартными определениями почечной функции в пациентах-млекопитающих.

Фиг. 10 является графическим представлением результатов определений содержания BUN, усредненного в каждой группе животных. Каждая кривая является графиком величин BUN в зависимости от количества дней после ишемии. Кривая 10В получена из животных контрольной подгруппы В, кривая 10А из животных подгруппы А, которые получали обрабо-

танную кровь. В день 6 средняя величина BUN для животных группы А была значимо более низкой ( $p < 0,025$ ).

Фиг. 11 прилагаемых рисунков подобным образом дает графическое представление результатов измерений креатинина сыворотки, причем кривая усредненных величин 11А из обработанных животных подгруппы А является постоянно и значимо более низкой, чем кривая усредненных величин из контрольных животных подгруппы В, в дни 1, 3 и 6 ( $p < 0,025$ ). Эти результаты показывают постоянно более низкие уровни креатинина и более низкие уровни BUN в пробах из животных, получавших обработку в соответствии с данным изобретением, демонстрируя, что эта обработка эффективно преформирует условные рефлексы индивидуальных органов и тканей тела для лучшей устойчивости к последующему стрессу, вызываемому ишемией и/или реперфузионным повреждением.

Увеличение креатинина и BUN в каждой подгруппе имеет максимум в день 3 с возвратом к базовому уровню в день 12. Это максимальное увеличение в животных подгруппы А является значимо более низким. Спустя 6 дней после ишемии/реперфузии уровни как креатинина, так и BUN в пробах из животного подгруппы А составляют половину от уровней в пробах из контрольных животных. В первые 24 ч после ишемии (прекращения кровоснабжения) 83% крыс в контрольной подгруппе В имели олигурию (менее 2 мл мочи, выделяемой за 24 ч), тогда как олигурия присутствовала только в 42% крыс подгруппы А ( $p < 0,01$ ). Это показано на прилагаемой фиг. 12, диаграмме в виде столбцов числа животных в каждой группе, отводящих мочу во время 24 ч после почечной ишемии/реперфузии в объеме, соответствующем тому, чтобы классифицировать этих животных как имеющих олигурию, имеющих легкую олигурию или нормальных. Черные столбцы на фиг. 12 относятся к животным подгруппы А, незачерненные столбцы относятся к животным подгруппы В.

Пример 7.

Самцов крыс SHR, всего 48, делили на пять групп, 12 животных на группу. Пробы объединенной крови из умерщвленных крыс SHR того же самого штамма получали четыре различные стрессорные обработки, как описано в примере 1, но с использованием следующих, одновременно применяемых комбинаций стрессоров:

1 - барботирование газовой смеси O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> при экспонировании на УФ-свете при повышенной температуре 42,5°C, поддерживаемой ИК-лампами;

2 - барботирование газовой смеси O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> при экспонировании на УФ-свете;

3 - барботирование газовой смеси O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> при поддержании при повышенной температуре (42,5°C) при помощи ИК-ламп;

и

4 - барботирование газа  $O_2$  при поддержании при  $42,5^\circ C$  ИК-лампами и при воздействии УФ-света (это не создает окислительной среды).

Количества стрессоров, время воздействия, интенсивности и т.д. подробно описаны в примере 1.

Пробы обработанной крови вводили в соответствующие группы 1, 2, 3 и 4 животных, причем группа 5 получала физиологический солевой раствор в тех же самых количествах и по той же самой схеме введения, а именно внутримышечной инъекцией 150 мкл ежедневно в течение первого курса из 10 дней, начинающегося, когда животные имели возраст 7 недель, и второго, такого же курса в течение 10 дней, когда животные имели возраст 12 недель. Это описано в примере 6.

Спустя 1 день после завершения второго курса инъекций животных анестезировали и подвергали унинефрэктомии (удалению одной почки), как в примере 6. Оставшуюся левую почку подвергали преходящей (временной) ишемии (прекращению кровоснабжения) в течение 60 мин путем зажимания оставшейся почечной артерии. Коэффициенты выживания подвергали мониторингу в течение 8 дней после ишемии и реперфузии. Выходы мочи измеряли в течение 24 ч после операции.

Фиг. 13 из прилагаемых рисунков показывает коэффициенты выживаемости животных в различных группах спустя 8 дней после хирургического вмешательства. Группа 5, контрольная группа, которая получала инъекции солевого раствора, имела коэффициент выживаемости только 25%, причем все остальные группы имели значимо более высокий коэффициент выживаемости. Результаты в группе 2, которая получала кровь, обработанную окислительным стрессором и УФ-светом, были особенно хорошими, с коэффициентом выживаемости 75%, что свидетельствует об очень хорошем предварительном формировании условных рефлексов для противостояния встречающимся впоследствии стрессам, вызываемым ишемией/реперфузией.

Фиг. 14 из прилагаемых рисунков представляет результаты измерений выхода мочи, причем выход 6 мл или менее мочи в течение 24-часового периода после операции определяет животных, имеющих олигурию, т.е. серьезно нарушенную или несуществующую почечную функцию. Число животных, имеющих олигурию, представлено на вертикальной оси. Наибольшее число имеющих олигурию животных наблюдается в контрольной группе 5, причем результаты во всех группах, обработанных в соответствии с данным изобретением, являются значимо улучшенными.

Пример 8.

Экспериментальную процедуру примера 6, демонстрирующую применение данного спосо-

ба в предформировании условных рефлексов против ишемического стресса и реперфузии в ишемическом тесте на почках *in vivo*, проводили на экспериментальных собаках, а именно на чистопородных здоровых коротконогих гончих собаках (beagles) в возрасте 1-2 года, с равными количествами самцов и самок в каждой группе и подгруппе.

Таким образом, этих животных делили на четыре группы, А, В, С и D, причем каждая группа состояла из 6 животных, 3 самцов и 3 самок. Животных групп А и С подвергали способу данного изобретения с двумя 10-дневными курсами взятия ежедневной аликвоты крови (3 мл), экстракорпоральной обработки этой аликвоты крови смесью озон/кислород, УФ-излучением и нагреванием, как описано в примере 6, и повторного введения обработанной аликвоты в то же самое животное внутримышечной инъекцией. Каждое животное имело трехнедельный период отдыха между 10-дневными курсами обработки. Группы В и D были контрольными группами, получаемыми два 10-дневных курса ежедневных инъекций 3 мл физиологического солевого раствора, с трехнедельным периодом отдыха между 10-дневными курсами.

Спустя 1 день после второго курса инъекций животных анестезировали под легкой газовой ( $N_2O$ ) анестезией и правую почку каждого животного извлекали через разрез спинки. Окклюзивный зажим помещали на оставшуюся почечную артерию и вену для подвергания левой почки преходящей ишемии (временному прекращению кровоснабжения) в течение 60 мин. Затем из животных брали пробы крови и анализировали на креатинин и мочевиновый азот крови, индикаторы нарушенной почечной функции, как описано в примере 6.

Результаты по креатинину представлены графически на прилагаемой фиг. 15, графике зависимости содержания креатинина в крови от времени, на протяжении периода 6 дней после ишемии. Кривая AC результатов, полученных из животных группы А и группы С, находится стойко ниже, чем кривая BD результатов из контрольных групп В и D, указывая на значимо лучшую почечную функцию для собак, обработанных по способу данного изобретения. Отметка ARF указывает острую почечную недостаточность. Изменения на протяжении времени внутри групп являются высокозначимыми ( $p < 0,0001$ ).

Повреждение органа, подвергнутого ишемии, может иметь место как следствие только ишемии (например, в случаях, когда ишемия вызвана сгустком крови, который впоследствии растворяется, но кровь не течет обратно в пораженный участок этого органа после растворения сгустка: так называемый феномен "отсутствия обратного тока") или как следствие последующей реперфузии этого органа кровью после

ишемии, когда лейкоциты или свободные радикалы или т.п. могут повреждать кровеносные сосуды и клетки данного органа. Термин "повреждение, являющееся следствием ишемии и/или реперфузии" и термин "ишемия/реперфузионное повреждение" в применении здесь охватывает оба типа повреждения, встречающиеся по отдельности или в сочетании.

Приведенные выше результаты процедуры данного изобретения могут защищать почки от повреждения, вызываемого ишемией и/или реперфузией, как измерено по коэффициенту выживаемости, уровням мочи и креатинина в крови и отхождению мочи в крысах (SHR). Это свидетельствует о применимости этой процедуры в защите органов тела в общем от ишемии/реперфузионного повреждения, в том числе сердца, печени, мозга, спинного мозга и других жизненно важных органов и тканей, а также почек, и свидетельствует о практическом применении этой процедуры на пациентах, включенных в план хирургических процедур, включающих в себя ишемию/реперфузию органа тела, таких как хирургическая репарация, удаление или трансплантация органа тела.

В частности, ишемическая острая почечная недостаточность представляет собой важную клиническую проблему с высокой распространенностью и высокой смертностью. Способ данного изобретения предоставляет новый подход к борьбе с этим нарушением. Он может быть применен перед трансплантацией почки на доноре, или реципиенте, или на обоих. Он может быть применен перед реваскуляризацией почки. Он может быть применен перед инвазивной оценкой в субъектах высокого риска, например ангиографией у диабетиков. Он может быть применен перед абдоминальной аортальной хирургией, такой как репарация аневризмы аорты, и почечной настольной хирургией (т.е. когда почку временно удаляют и оперируют *ex vivo* и затем реимплантируют).

Что касается применения в связи с процедурами, связанными с сердцем, процедура данного изобретения может проводиться перед коронарной ангиопластикой и шунтированием или перед пересадкой, как в случае почки. Она показана для применения в случае пациентов, которые должны быть подвергнуты операции на открытом сердце с искусственным (экстракорпоральным) кровообращением для трансплантации с шунтированием коронарной артерии, замене клапана или хирургической репарации врожденных или приобретенных структурных пороков сердца. В случае мозга или других жизненно важных органов и тканей, в том числе кишечника, почек и конечностей, процедура данного изобретения может быть использована перед ангиопластикой или эндартерэктомией в субъектах высокого риска.

Применение способа данного изобретения перед общей анестезией в связи с обширным

оперативным вмешательством ("большой" операцией) может рассматриваться как общее предварительное формирование условных рефлексов организма (предварительное кондиционирование) для лучшего противостояния связанным с ишемией-реперфузией повреждениям, которым будут позднее подвергнуты основные органы. Оно показано для применения перед проведением обширных хирургических процедур, включающих в себя общую анестезию, на пациентах, о которых известно, что они имеют или, возможно, имеют значительную степень основного атеросклероза в артериях, снабжающих мозг, сердце, печень, кишечник, спинной мозг, почки или конечности, причем атеросклероз делает их более чувствительными к тромбоишемическому событию в операционном или послеоперационном периоде. Такое одинаковое общее предварительное формирование условных рефлексов организма по способу данного изобретения показано также для применения в ослаблении эффектов встречающегося впоследствии шока, приводящего к гипоперфузии жизненно важных органов и тканей из-за сердечной недостаточности, потери крови или других жидкостей тела, избыточной дилатации (расширения) кровеносных сосудов и излишне низкого кровяного давления. Примеры включают в себя большую кровопотерю, травму, сепсис и кардиогенный шок. Индивидуумы с возможной перспективой быть подвергнутыми таким факторам риска, в том числе пациенты, ожидающие хирургического вмешательства, команды спасения и помощи в случае природных бедствий, могли бы быть бенефициариями способа данного изобретения.

Другие области применимости процедуры данного изобретения в связи с предформированием условных рефлексов (предкондиционированием) тела и органа тела пациента перед действием стресса, например ишемического стресса как части хирургической процедуры, общего психологического стресса или физиологического стресса как части хирургического вмешательства или других предвиденных стрессовых ситуаций, будут очевидны для специалистов в данной области.

#### Ссылки

1. Gersh, B.J., Braunwald, E., and Rutherford, J.D.: Mechanism of Cardiac Contraction and Relaxation. In: "Heart Disease: Textbook of Cardiovascular Medicine" Braunwald, E. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 5th Edition, pages 360-393, 1997.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента-млекопитающего для уменьшения симптомов стресса у этого пациента или для предварительного формирования условных рефлексов (предкондиционирования) его тела и получения по-

ниженных проявлений симптомов стресса, возникающих в результате воздействия стресса на пациента после этого лечения и представляющих собой увеличение частоты сердечных сокращений, увеличение температуры тела и/или увеличение кровяного давления пациента, или уменьшения размера инфаркта, или защиты органов донора-млекопитающего, предназначенных для трансплантации из донора-млекопитающего реципиенту-млекопитающему, или предварительного формирования условных рефлексов пациента-млекопитающего для лучшего противостояния неблагоприятным эффектам ишемического стресса, с которыми он может встретиться в результате последующей ишемии-реперфузии органа тела пациента, характеризующийся введением аликвоты совместимой крови млекопитающего, подвергнутой экстракорпорально действию, по меньшей мере, двух стрессоров, выбранных из окислительной среды, УФ-излучения и повышенной температуры вплоть до приблизительно 45°C, или подвергнутой воздействию экстракорпорально инфракрасного излучения необязательно в сочетании с окислительной средой или/и УФ-излучением, или воздействию экстракорпорально, по меньшей мере, двух стрессоров, являющихся эффективными в индукции ответной реакции на стресс, обычно свидетельствующей об активации пути САП-киназы в клетках крови при применении к крови млекопитающего.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что аликвотой крови является собственная кровь пациента.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что аликвота крови имеет объем от приблизительно 0,1 до 400 мл.

4. Способ по любому предыдущему пункту, отличающийся тем, что стрессором окислительной среды, действию которого подвергают аликвоту крови, является смесь кислорода и озона медицинской чистоты с содержанием озона от приблизительно 0,1 до 100 мкг/мл.

5. Способ по любому предыдущему пункту, отличающийся тем, что стрессорами ультрафиолетового излучения является ультрафиолетовое излучение из УФ-ламп, излучающих, в основном, при длинах волн 280 нм или более коротких.

6. Способ по любому предыдущему пункту, отличающийся тем, что стрессором повышенной температуры является температура в диапазоне от приблизительно 38 до 43°C.

7. Способ по любому предыдущему пункту, отличающийся тем, что выбранную комбинацию стрессоров применяют к аликвоте крови в течение периода времени в диапазоне 0,5-60 мин.

8. Способ по любому из пп.1-5 или 7, отличающийся тем, что аликвоту крови подвергают

действию агрессора окислительной среды и стрессора УФ-излучения одновременно.

9. Способ по любому из пп.1-4, 6 или 7, отличающийся тем, что аликвоту крови подвергают действию стрессора окислительной среды и стрессора повышенной температуры одновременно.

10. Способ по любому из пп.1-3 или 5-8, отличающийся тем, что аликвоту крови подвергают действию стрессора УФ-излучения и стрессора повышенной температуры одновременно.

11. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что аликвоту крови подвергают действию всех трех указанных стрессоров одновременно.

12. Способ по любому из пп.1-7 или 9-11, отличающийся тем, что стрессор повышенной температуры применяют в виде инфракрасного излучения.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что ишемический стресс является ишемией-реперфузией почки, сердца, печени, кишечника или мозга пациента.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что ишемический стресс является ишемией-реперфузией почки.

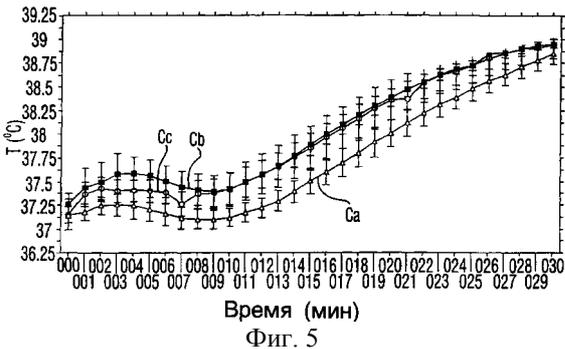
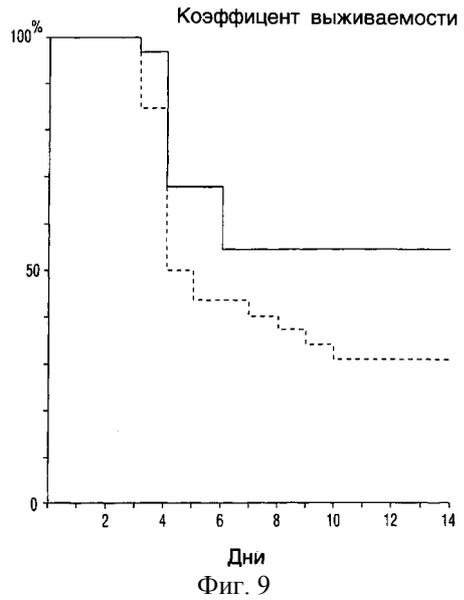
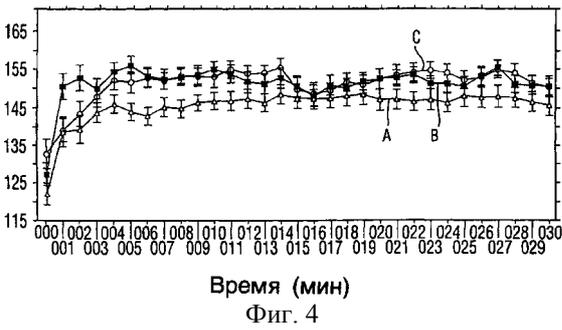
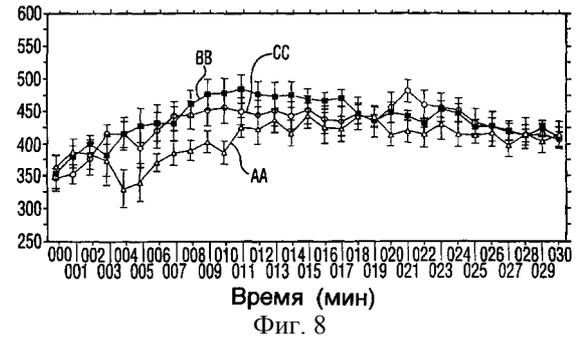
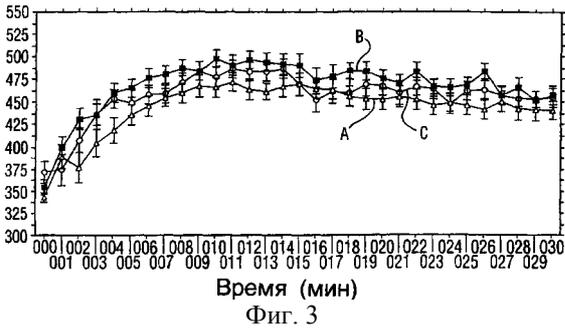
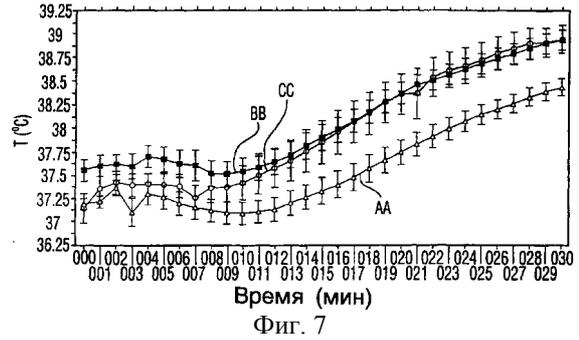
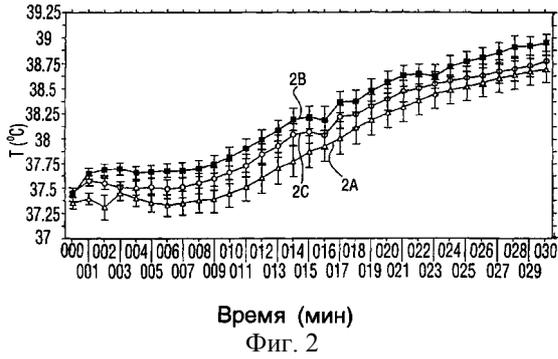
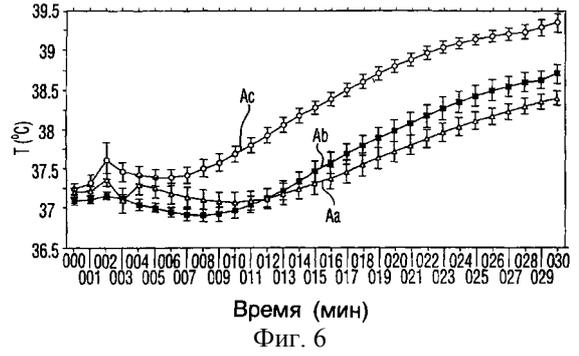
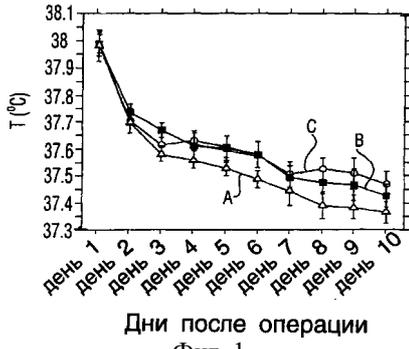
15. Способ по п.1, отличающийся тем, что аликвота крови является аликвотой собственной крови пациента объемом приблизительно 0,1-400 мл, подвергнутой действию всех трех стрессоров одновременно или любых двух из указанных стрессоров одновременно.

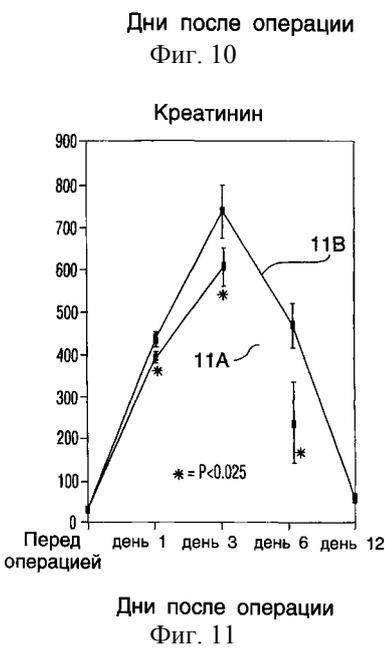
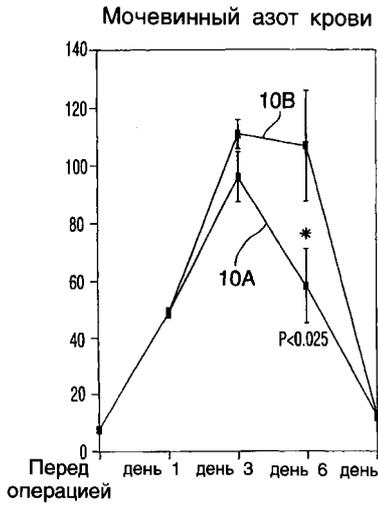
16. Способ по п.15, отличающийся тем, что стрессор окислительной среды, действию которого подвергают аликвоту крови, является смесью кислорода и озона медицинской чистоты с содержанием озона от приблизительно 0,1 до 100 мкг/мл, стрессорами ультрафиолетового излучения является ультрафиолетовое излучение из УФ-ламп, излучающих, в основном, при длинах 280 нм или более коротких, а стрессором повышенной температуры является температура в диапазоне приблизительно 38-43°C, при этом каждый указанный стрессор применяют к аликвоте крови в течение периода времени в диапазоне 0,5-60 мин.

17. Способ по п.1, отличающийся тем, что пациент страдает от атеросклероза и запланирован для общей анестезии перед ишемией (прекращением кровоснабжения) жизненно важного органа в хирургической процедуре.

18. Способ по п.1, отличающийся тем, что пациент запланирован для операции на открытом сердце с искусственным (экстракорпоральным) кровообращением.

19. Способ по любому предыдущему пункту, отличающийся тем, что множество вышеупомянутых обработанных аликвот крови вводят при интервалах, по меньшей мере, 1 день.





24-ый диурез после повреждения вследствие почечной ишемии/реперфузии

С олигурией С легкой олигурией Нормальные

