

Invenția se referă la medicină, și anume la o metodă de prevenire sau ameliorare a insuficienței renale acute la mamifere. Insuficiența renală acută poate fi provocată de reducerea fluxului sanguin renal sau de nefrotoxinele, care cauzează necroza celulelor și reduc funcția rinichilor.

Este cunoscut că factorul de creștere de tip insulinic I (IGF-1) poate majora fluxul plasmei renale și rata filtrației glomerulare. Într-adevăr, IGF-1 se depistează în cazul majorării filtrației glomerulare și fluxului plasmei renale (Guler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2868-2872, 1989) și la stimularea transportului renal de fosfat și plasmă 1,25-dihidroxitamina D₃ (Caverzacio et al., Endocrinol., 127: 453-459, 1990). Ulterior, o singură infuzie de scurtă durată de IGF la șobolani ce au îndurat foame în decurs de 60-72 ore cauzează o creștere stabilă a ratei filtrației glomerulare (Hirschberg and Koppel, J. Clin. Invest., 83: 326-330, 1989 și Hirschberg et al., J. Clin. Invest., 87: 1200-1206, 1991), iar administrarea IGF-1 oamenilor sporește rata filtrației glomerulare și fluxul plasmei renale (Norman et al., Clin. Sci., 78: 445-450, 1990). În plus, IGF apare la regenerarea țesutului renal în insuficiența renală acută postischemică (Coimbra Am. J. Physiol., 259: F438, 1990) și 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 și Patent US 5 106 832, 1992). Administrarea descrisă a IGF-1 oamenilor mărește viteza filtrării glomerulare și circulația renală.

Insuficiența renală acută (IRA) complică evoluția afecțiunii la circa 5% din toți pacienții internați în spital și la 20% pacienți cu tratament intensiv. La 1% din toate cazurile de spitalizare se observă că insuficiențele renale sunt severe, determinând creșterea riscului total de sucombare de șase ori.

Sunt cunoscute metode de profilaxie a IRA cu ajutorul preparatelor medicinale. Astfel de metode sunt descrise în "Справочник по нефрологии", Тареев И.Е., Андросова С.О. и др., Москва, Медицина, 1986 г., с. 254-261 [1].

Terapia curentă include diagnosticul precoce și tratamentul de susținere, care include echilibrul fluid, homeostaza electrolitică, dializa pentru oarecare nefrotoxine implicate și monitorizarea precisă. În 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 instanță sau, cel puțin, ameliorarea efectelor acesteia.

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

Problema se soluționează prin aceea că metoda propusă de profilaxie a insuficienței renale acute la mamifere cu risc mărit al apariției IRA include administrarea mamiferului a unei cantități eficiente de factor de creștere de tip insulinic IGF-II.

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

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

Metoda propusă poate fi și în cazurile în care IRA apare ca rezultat al afecțiunii renale ischemice, în timpul operației la cord, în timpul transplantării rinichiului, administrând IGF-1 înaintea și/sau în timpul transplantării, la fel ca urmare a afecțiunii cu nefrotoxină.

Se propune aplicarea unei cantități eficiente de IGF-1 pentru profilaxia insuficienței renale acute.

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

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

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

Se propune aplicarea unei cantități eficiente de IGF-1 pentru profilaxia insuficienței renale acute.

Totodată este posibilă și combinarea IGF-1 cu IGF-proteina aglutinantă, drept care se ia YGFBP-3, precum și combinarea cu o cantitate eficientă de hormon de creștere.

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 obține:

sporirea ratei de filtrație glomerulară, a circulației renale, resorbției tubulare proximale a fosfatului și a neogenezei proximale tubulare a glucidelor;

hipertrofia glomerulelor și a tuburilor proximale;

stimularea transferului renal de fosfat și a plasmei 1,25 - hidroxivitamina D₃, ce asigură prevenirea sau minimalizarea IRA la mamiferele cu un risc mărit de apariție a IRA.

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

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

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

- fig. 3, graficul greutateii zilnice a iepurilor tratați cu des-IGF-1 și controlul-ocluzionați, după o perioadă de șapte zile, cu pătratele întunecate cu punct - fiind normală; cu romb deschis cu punct - în ocluzie plus des-IGF-1, cu romb întunecat - în ocluzie - control și cu romb întunecat cu punct deschis - în caz de laparotomie, netratați. Des-IGF-1 este similară cu IGF-1;

- fig. 4, graficul greutateii organice la iepurii tratați cu des-IGF-1 și controlul-ocluzionați: a rinichilor (întunecat), splina (cu diagonală) și a inimii (cu două tipuri de diagonale). Analiza valorii variantei (ANOVA) p este semnificativă pentru rinichi (0,0004) (controlul □[CI] Nr.=7, des Nr.=9), și pentru splină (0,028) (CI. Nr.=7, des Nr.=8), însă nesemnificativă statistic pentru inimă (0,84) (CI Nr.=6, des Nr.=4);

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

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

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

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

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

- fig. 10, graficul asimilării ³H-p-aminohipuratului (³H-PAH) după 90 minute de către țesutul cortical renal. Pătratul deschis reprezintă norma, triunghiul cu linie punctată reprezintă ocluzionați+des-IGF-1; cercul cu linie punctată reprezintă ocluzionați+IGF-1 și pătratul pe jumătate întunecat reprezintă ocluzionați - control;

- fig. 11, graficul asimilării ¹⁴C-TEA după 90 minute de către țesutul cortical renal. Triunghiul cu linie punctată reprezintă ocluzionați-des-IGF-1; pătratul deschis reprezintă norma; cercul cu linie punctată reprezintă ocluzionați+IGF-1 și pătratul pe jumătate întunecat reprezintă ocluzionați - control;

- fig. 12, graficul dependenței greutateii rinichilor de doza des-IGF-1 (pătratul întunecat) și IGF-1 (pătratul deschis) la șobolanii hipofizectomizați. Șobolanii au fost tratați timp de 7 zile prin intermediul minipompelor subcutanate cu infuzii, ce conțin câte 6 doze de IGF-1 sau des-IGF-1, apoi au fost sacrificați și au fost cântăriți ambii rinichi obținuți;

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

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

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

- fig. 16, graficul creșterii greutateii șobolanilor după 4 zile în control (cercuri), după 30 minute de clampare (cercuri) și după 60 minute de clampare (pătrate);

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

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

- fig. 19, graficul creșterii greutateii șobolanilor după 4 zile, având leziuni renale (60 minute de clampare), care au fost tratați cum urmează: simulare (cercuri deschise), clemă (pătrate deschise); clemă+IGF-1 (pătrate întunecate) și clemă+des-IGF-1 (cercuri întunecate);

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

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

Descrierea realizărilor preferabile

“Insuficiența renală acută” sau “IRA”, utilizată în prezenta invenție se referă la o condiție cauzată de reducerea fluxului sanguin (leziune ischemică renală), provocată de distrucția tubului proximal renal sau de către nefrottoxinele ce produc necroza celulelor.

Acest termen cuprinde IRA moderată și severă, incluzând necroza tubulară acută, care cauzează oligurie și azotemie, și insuficiența renală neoligurică. Se caracterizează prin așa simptome, cum ar fi retenția produselor azotului, lichidelor, electroliților și catabolism accelerat. În 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 interstițial 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 menține integritatea rinichilor până la sau în timpul transplantului de rinichi.

Exemplele nefrotoxinelor, care provoacă necroza celulei includ: cefalosporine, metale grele toxice, substanțe de contrast administrate intravenos, antibiotice, cum ar fi aminoglicozidele, de exemplu, tobramicina, gentamicina, ampicacina și streptomycină, și antifungicidele, cum ar fi amfotericina.

“Profilaxia” IRA se referă la prevenirea sau cel puțin ameliorarea IRA.

Mamiferele “cu risc” pentru IRA includ mamiferele importante din punct de vedere economic, cum ar fi bovinele, ovinele și porcinele, la fel și oamenii, ultimii fiind preferați, care sunt predispuși să manifeste IRA, aceasta fiind declanșată de operațiile sau transplantele realizate sau de boli.

Termenul “IGF-1”, utilizat în prezenta invenție, se referă la factorul de creștere de tip insulenic pentru orice specie, incluzând bovine, ovine, porcine, cai, păsări și, preponderent, oameni, în succesiune nativă sau în formă variată și de la orice sursă, sau naturală, sintetică sau recombinată. Preferată, în prezenta invenție, pentru uz animal este cea formă de IGF-1, necesară pentru tratamentul speciilor în 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 invenție, 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, publicația din 5 august 1987, EP 128733, publicația din 19 decembrie 1984, sau EP 288451, publicația din 26 octombrie 1988. Succesiunea nativă de IGF-1, mai preferată, este produsă recombinat și furnizată de la Genentech, Inc., South San Francisco, SA pentru investigațiile clinice. De asemenea este preferată pentru uz IGF-1, care posedă o activitate specifică ce depășește circa 14.000 unități (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., publicația din 31 decembrie 1991; PCT WO 87/01038, publicația din 26 februarie 1987 și PCT WO 89/05822, publicația din 29 iunie 1989, în care, de exemplu, cel puțin reziduu acidului glutamic este absent în poziția 3 de la N-terminal al moleculei mature sau cele cu ștergere de până la cinci aminoacizi la N-terminal. Cea mai preferată variantă are șterși 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. Modulurile de realizare a invenției

Profilaxia se efectuează prin tratamentul cu IGF-1 până la sau în perioada în care este posibilă apariția deteriorării rinichilor (IRA) sau deja a apărut, adică anterior evoluției deteriorării și include perioada în care este posibilă apariția deteriorării sau evoluția acesteia.

De exemplu, tratamentul IGF-1 pentru prevenirea sau ameliorarea deteriorării rinichiului sau pentru prevenirea reacției de eliminare a tratamentului de rinichi începe până la sau în timp ce este posibilă apariția deteriorării rinichiului sau la apariție, adică până la sau în timpul chirurgiei selective în intervențiile 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 apariție a deteriorării rinichiului sau la apariția acesteia, este preferată administrarea cu circa 48 ore la 0,5 ore înainte de posibilă apariție a deteriorării sau de apariția acesteia opțional, este indicată continuarea administrării IGF-1 după posibilă apariție a IRA sau după apariția 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 și mai mult, includ creșterea nivelului de azot al ureei din sânge sau a creatininei sau reducerea transportului ionilor organici.

În diverse scopuri, IGF-1 se administrează direct mamiferelor prin orice modalități potrivite, incluzând administrarea parenterală, și poate fi administrat local sau sistemic. Calea specifică de administrare va depinde, de exemplu, de anamneza bolii, incluzând 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 și calea de administrare subcutanată) sau într-o singură injecție, sau în multiple injecții (de exemplu, 2-4), de exemplu, intravenoase sau subcutanate, până la sau în timpul inițierii 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, publicație din 5 octombrie 1989 și de către Martin și 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 conține cei mai mulți IGF-s și reglată, de asemenea, de către GH. Administrarea proteinei cuplate a IGF cu IGF-1 se efectuează convenabil prin metoda descrisă în publicația internațională WO 92/13556 din 20 august 1992. Succint, IGF-

1 și IGFBP se administrează în cantități eficiente prin injectarea bolurilor subcutanate cu rația molară de la circa 0,5:1 la circa 3:1, de preferință, de circa 1:1.

Compoziția IGF-1 poate fi utilizată în terapeutică, fiind formulată și dozată succesiv cu o practică medicală bună, luând în considerație starea clinică individuală a pacientului (în special, efectele secundare la administrarea numai a IGF-1), locul administrării compoziției IGF-1, metoda de administrare, regimul de administrare și alți factori cunoscuți 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 conține cel puțin 0,01 mg/kg/zi, cea mai preferată, pentru uz uman, este de până la circa 0,01 și 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 injecții pe zi sau în infuzii subcutanate continue, de exemplu, utilizând o minipompă. De asemenea se pot folosi punji cu soluții pentru administrare intravenoasă.

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

De asemenea este convenabilă administrarea IGF-1 în sisteme cu eliberare susținută. Exemplele de compoziții cu eliberare susținută potrivit includ: matricele polimere semipermeabile sub formă de articole modelate, de exemplu, filme sau microcapsule. Matricele cu eliberare susținută includ poliactide (Brevet. nr. 3773919 U.S.; EP 58481); copolimeri ai acidului L-glutamic și 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] și Langer, *Chem. Tech.*, 12; 98-105 [1982]), etilen-vinil-acetat (Langer et al., supra) sau acid poli-D-(-)-3-hidroxibutiric (EP 133, 988). Compozițiile IGF-1 cu eliberare susținută includ de asemenea captatori lipozomali ai IGF-1. Lipozomii cu conținut 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. și EP 102324. De obicei, lipozomii sunt de tip unilamelar cu dimensiuni mici (cca 200-800 Å), cu lipide constituite din cca 30% mol colesterol, proporțiile 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, într-o formă unică dozată (soluție, suspensie sau emulsie) cu un purtător farmaceutic acceptabil, de exemplu, cu unul din recipienti în doze și concentrații netoxice, și compatibil cu alte ingrediente ale formulării. De exemplu, formularea preferată nu trebuie să includă agenți de oxidare și alți compuși, care se știe că deteriorează polipeptidele.

În general, formulările se prepară prin contactul uniform și 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 soluția izotonică cu sângele recipientului. Exemplele de astfel de purtători includ: apa, soluția salină, soluția Ringer și soluția de dextroză. În prezenta invenție se folosesc, de asemenea, purtători, ce nu conțin apă, cum ar fi uleiurile nevolatile și etil oleatul, de asemenea și lipozomii.

Purtătorul potrivit conține o cantitate minoră de aditivi, cum ar fi substanțele, care măresc izotonicitatea și stabilitatea chimică. Așa materiale sunt netoxice pentru recipienti, în dozele și concentrațiile utilizate, și includ tampoane, cum ar fi de fosfat, citrat succinat; acid acetic și alți acizi organici sau sărurile acestora; antioxidanți, cum ar fi acidul ascorbic; polipeptide (cel puțin cca 10 reziduuri micromoleculare, de exemplu, poliarginina sau tripeptidele; proteinele, cum ar fi albumina serică, gelatina sau imunoglobulinele; polimeri hidrofilii, cum ar fi polivinilpirolidona; aminoacizi, cum ar fi glicina, acidul glutamic; acidul aspartic sau arginina; monozaharide, dizaharide și alte hidrocarburi, inclusiv celuloza sau derivații lor, glucoza, manoză sau dextrinele; agenți helatici, cum ar fi EDTA; alcoolii zaharoși, cum ar fi manitol sau sorbitol; contraioni, cum ar fi sodiu; și/sau surfactanți neionici, cum ar fi polisorbitați, poloxamerii.

IGF-1 se formulează tipic în așa purtători cu o concentrație de la cca 0,1 mg/ml la 100 mg/ml, de preferință, 1...10 mg/ml, și pH de la cca 3 la 8. Pe tot parcursul IGF-1 este, în 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 înțeles, că la utilizarea unor anumiți excipienți, purtători sau agenți de stabilizare predecesori, se pot forma săruri ale IGF-1.

În plus, IGF-1, de preferință IGF-1 pe tot parcursul, formulat potrivit cu un purtător acceptabil, formează o compoziție farmaceutică, de preferință una, care nu conține celule. În una din variantele de realizare, tamponul utilizat pentru formulare depinde de faptul dacă compoziția 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 și 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 mărește solubilitatea IGF-1 în acest pH, cum ar fi 0,1% polisorbitat 20 sau poloxamer 188. Preparatul final poate fi un lichid stabil sau o substanță solidă liofilizată.

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

Compozițiile terapeutice cu IGF-1, în general, se plasează în containere cu orificiu de acces steril, de exemplu, în pungi sau în fiole cu soluții intravenoase utilizate cu un dop, care poate fi străpuns cu un ac de injecție hipodermic.

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

GH, de asemenea, poate fi administrat mamiferelor, tratate cu IGF-1, conform prezentei invenții. 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 apariția sau a apărut IRA și este, de asemenea, potrivită administrarea sau continuarea administrării după posibilă apariție a IRA sau după apariția acesteia.

Dacă se utilizează GH, el poate fi administrat separat de IGF-1 sau asociat cu IGF-1, în doză și utilizând administrarea potrivită, similar utilizării pentru IGF-1 de mai sus, tipic cel puțin 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 așa proteină liantă bine caracterizată este proteina cuplată cu hormonul de creștere (GHBP) cu afinitate înaltă, constituind domeniul extracelular al receptorilor GH, care circulă în sânge și funcționează la unele specii ca GHBP (Yme și Herington, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 41: 153 (1985); Smith și Talamantes, *Endocrinology*, 123: 1489-1494 [1988]; Emtner și Roos, *Acta Endocrinologica (Copenh)*. 122: 296-302 [1990]), inclusiv la oameni. Baumann et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 134-141 (1986); EP 366710, publicația 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 relații structurale cu GH receptor. Baumann și Shaw, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 680-686 (1990).

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

Se relevă, că medicii practicieni divizează dozele ambilor IGF-1 și GH, luând în considerație efectele secundare cunoscute, care pot apărea în cadrul tratamentului cu acești hormoni. Pentru h GH aceste efecte secundare includ retenția sodiului și 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 și hiperinsulinemia și hiperglicemia. Cel mai grav efect secundar al IGF-1 este hipoglicemia. Guler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989), supra. Într-adevăr, combinarea IGF-1 și GH poate exercita reducerea apariției efectelor secundare ale ambilor (de exemplu, hipoglicemia pentru IGF-1 și hiperinsulinismul pentru GH) și restabilirea secreției GH, care este supresată de către IGF-1.

În plus, IGF-1 poate fi administrat în combinație cu alte remedii terapeutice pentru prevenirea sau ameliorarea în continuare a leziunii ischemice sau nefrotice. Substanțele utile în acest scop includ superoxidul dismutazei și antagoniștii (de exemplu, anticorpii) VLA-1, LFA-1, Mac-1, p. 150, 95, EGF- α , etc. Acești agenți pot fi administrați concomitent, până la sau după administrarea IGF-1 și pot fi administrați pe aceleași căi sau pe căi diferite de cele de administrare ale IGF-1. Această invenție va fi mai bine înțeleasă prin referința la exemplele ce urmează. Însă ele nu trebuie privite ca limitând invenția.

Exemplul 1

Primul studiu în cadrul tratamentului iepurilor

Introducere

Pentru a monitoriza la animale progresarea IRA și reacția lor la supraveghere de durată, la excipient sau IGF-1 sau des-IGF-1, s-au măsurat nivelurile de BUN și creatinină în ser. Nivelurile creatininei, produsului metabolic al activității musculare, rămân relativ constante în plasmă, măsurările corespunzătoare nu sunt efectuate după excitare maximă. Mărimile azotului ureei sunt mai puțin întemeiate, fiind afectate de starea metabolică, dietă, hidratare și alți factori. Cu toate acestea, epurarea (clearancul) azotului ureei și creatininei, descrește semnificativ în insuficiența renală și leziunea renală acută, independent de starea metabolică sau fiziologică. Acești doi constituenți sunt acceptați ca indicatori ai funcției renale și concentrațiile lor în sânge reflectă alți compuși dăunători în nefropatii. Creatinina este filtrată de către rinichi, însă nu secretată sau reabsorbită; azotul ureei este filtrat și reabsorbit pasiv. Împreună ei estimează funcția renală și sunt parametrii-cheie de laborator în monitorizarea insuficienței renale.

Protocol

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

Pe parcursul studiului s-au folosit iepuri albi de New Zealand, masculi, cu greutatea corporală 2,5-3,0 kg. După o premedicație cu 0,1 ml Hypnorm™ și anestezie intravenoasă (i.v.) 1,0 mg Fluanisone™ alfa factor al necrozei tumorii și 0,135 mg Fentanyl/ml soluție se colectează 1 ml de sânge dintr-o arteră a urechii. Sângele se plasează imediat în 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 operație, în condiții sterile: se tunde blana

de pe abdomen, se prelucrează câmpul de operație cu soluție de iod, se degresează cu alcool și apoi iarăși se prelucrează cu iod. În condiții sterile, se realizează laparotomia. Folosind un tampon umectat cu soluție salină, se deplasează intestinele pentru a avea acces la rinichi. Se disecă liber artera renală stângă și se clampează cu clema Serrefin™ (Baby Dieffenbach Serrefin; Harvard 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 conțin 5 mg/ml de IGF-1 uman recombinant, pe oricare din părțile cavității abdominale. Aceste pompe sunt pregătite astfel încât, fiind amplasate, acționează imediat. Fiecare pompă livrează 11,75 μl/oră. Astfel fiecare animal primește 2,82 mg/zi/animal sau circa 1 mg/kg/zi. Rana în urma laparotomiei se acoperă cu tifon umectat cu soluție salină și prosoape sterile. Pe parcursul perioadei de ischemie, timp de 2 ore, anestezia se menține 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 mușchii abdominali și 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 și apă din robinet. Operația s-a realizat pe un lot de 12 animale în 2 zile: 6 animale (2 de control și 4 tratate) într-o zi și 6 animale (3 de control și 3 tratate) cu 11 zile mai târziu.

Probe de sânge

După 24 ore și apoi fiecare 24 ore, timp de 6 zile, din artera urechii sau din venă se colectează probe de sânge - câte 1 ml. Sângele se coagulează în tuburile de separare a serului și se centrifughează la 10°C, pentru separarea serului. Se colectează serul, se plasează în tuburile Ependorf și 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 dezgheață și cu un analizator centrifug Monarch, modelul 76, se măsoară nivelurile BUN, creatininei serice și glucozei în sânge.

Analiza statistică

Diferențele statistice între grupuri au fost evaluate, folosind analiza bilaterală a diferenței (ANOVA) pentru măsurări repetate, urmate de un test pentru ultima diferență semnificativă (LSD), pentru identificarea diferențelor semnificative între intervalele de timp individuale.

Rezultate

Din lotul de 5 animale de control - toate au supraviețuit 7 zile; un animal, din lotul de 7 animale tratate, a suferit în ziua a 4-a (a 3-a zi după operație). Acest animal, ulterior a fost exclus din studiu.

BUN:

La animalele din lotul de control, înainte de operație, BUN constituia $16 \pm 0,89$ mg/dL, crescând la un maximum de 109 ± 25 mg/dL, în ziua a 4-a, înregistrându-se astfel o creștere de 5,81 ori (vezi tabelul 1).

Tabelul 1

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

Ziu a nr.	Media	Deviațiile 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 și tratate cu IGF-1 prezintă niveluri similare preoperatorii de BUN comparativ cu animalele din lotul de control. Creșterea maximă a nivelurilor BUN, la aceste animale, a fost cea mai joasă ($73 \pm 15,6$ mg/dL) în ziua a 3-a (tabelul 2 și 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

Ziu a nr.	Media	Deviațiile 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
---	-------	------	------

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

Creatinina serică

Nu s-au relevat diferențe semnificative în nivelurile de creatinină serică la animalele de control sau tratate (tabelele 3 și 4, fig. 2), totuși aceste valori în ziua a 5-a, a 6-a și 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

Ziu a 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

Ziu a 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 sânge

Nivelurile de glucoză din sânge, în ambele loturi, ating cifra de circa 60 mg/dL în primele zile după operație și se mențin la 130-160 mg/dL în ambele loturi, în decursul întregii 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

Ziu a 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

Ziu a 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 reperfuție. 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 incluși mai mulți iepuri și au fost măsurate nu numai nivelurile BUN și creatininei, dar, în continuare, a fost evaluată și funcția rinichiului, prin studierea asimilării ionilor organici de către celulele tubului proximal, în scopul evaluării *in vitro* a funcției celulelor renale. Transportul cationilor de către tuburile renale a fost demonstrat la multe animale, inclusiv la iepuri și la oameni (Bessegir et al., Am. J. Physiol., 241: F308-F314 [1981]; Rennick et al., Am. J. Physiol., 232: F443-F447 [1977]), și are un rol esențial în excreția cationilor endogeni și sintetici.

Pentru a pătrunde în lumenul tubular, moleculele trebuie să penetreze ambele membrane - bazolaterală și celulară (BLM și BBM, respectiv). Trecerea cationilor de gradientul electric, transportarea prin BBM este un contraschimb electroneutral între cation și 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. Secreția 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, acești transportori s-au studiat *in vitro* cu ^{14}C -TEA (tetraetilamoniu) și ^3H -PAH. TEA nu se exclude din spațiul intracelular, astfel servește 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 țesutului, conținutul mediu de oxigen, nivelurile medii de ioni și agitarea în perioada de incubare. În acest exemplu, s-a ținut cont de aceste variabile, așa cum este descris în cele ce urmează.

Greutatea organelor și greutatea corporală în lot, la fel și nivelurile azotului ureei și creatininei serice, sunt înscrise ca media în lot \pm SEM. Datele pentru rezultatele fragmentului cortical sunt înscrise ca media fragmentului/mediu pentru timpul dat și ieșire. Aceste rapoarte s-au adunat apoi în lot, pentru a obține media și SEM pentru fiecare lot. Valorile p pentru unu și doi factori sunt raportate pentru ANOVA. Adesea, variabilele pentru factorul 2 ANOVA sunt: ziua tratamentului și 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 și în calcule uneori se exclude prima zi (întrucât acțiunea medicamentului este mai evidentă în zilele ce urmează) și ultima zi a tratamentului (deoarece acei iepuri, care au supraviețuit până la ultima zi, de regulă, revin la starea aproape normală, iar acei care au murit de insuficiență renală, se exclud din studiu).

În aceste exemple s-au studiat efectele IGF-1 și ale moleculei trunchiate, des-IGF-1 asupra funcției rinichiului după deteriorarea rinichiului, provocată de ischemia rinichiului. În continuare, se arată că ambii - IGF-1 și des-IGF-1, - sunt agenți eficienți în regenerarea rinichilor după deteriorarea acestora.

Protocol

Pregătirea animalului model

Iepurii albi de New Zealand, masculi (2-3 kg), se aclimatizează la o îngrijire facilă timp de câteva zile și apoi se includ în studiu. Ei se introduc într-o cameră cu control asupra temperaturii și luminii, fiind hrăniți cu nucșoarele iepurelui și apă *ad libitum*.

Loturile experimentale

Animalele au fost repartizate în mod arbitrar în 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 tratați (Norma). În studiu au fost incluși numai acei iepuri, care au supraviețuit până în ziua a doua, fiind zilnic flebotomizați și cântăriți. În plus, animalele ce supraviețuiesc până în ziua a 7-a se sacrifică, fiind obținute greutatea organelor umede, rinichii fiind luați pentru măsurările asimilării ionilor de către țesutul cortical. Din cauza mortalității și sincronizării investigațiilor asociate, rinichii de la 5 animale tratate cu IGF-1 și 3 animale tratate cu excipient au fost excluși din studiul privind asimilarea ionilor (vezi tabelul ce urmează pentru loturi, abrevieri și 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 Laparotomie+IGF-1 (LAP+IGF-1)	3	3
V Laparotomie + Excipient (LAP-control)	2	2
Normă. Netratați control (Normă)	2	4

* Include iepurii care nu au murit în sau înainte de ziua a 2-a.

** Include iepuri care au supraviețuit până la ziua a 7-a, când experimentul cu fragmentul cortical a luat sfârșit.

Prepararea animalului model

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

După aneștizie, animalele se rad, se curăță și se drapează cavitatea peritoneală, efectuându-se o incizie axială. Utilizând desecarea bontă, se eliberează artera renală dreaptă, apoi cea stângă, și 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 conține 2,0 ml de 3,3 mg des-IGF-1/ml acid acetic (100 mM, pH 4,5) sau 2 pompe osmotice Alzet™, fiecare conținând 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 acțiune imediată asupra amplasamentului. Fiecare pompă livrează 10,58 μ l/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 soluție salină și se lasă pentru 2 ore până la reperfuzie.

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

Colectarea datelor

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

Când fiecare grup a câte șase iepuri s-a completat, probele se topesc la temperatura camerei și 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) și gama-glutamyl transferaza (GGT). În a 7-a zi iepurii se sacrifică și se extrage rinichiul drept, ficatul, splina, inima și timusul și se cântăresc. Organele se fixează în formalină și se expediază pentru examen histologic. În plus, se extrage rinichiul stâng și se cântărește, fragmentele corticale se utilizează pentru studiul asimilării ionilor *in vitro* cum urmează.

Ocluzia completă și consecventă a arterelor renale în cadrul investigației animalelor se confirmă prin nivelurile crescute ale azotului ureei și creatininei în ser. La animalele expuse numai laparotomiei, nivelurile creatininei rămân relativ constante și constituie în toate cazurile cifre mai joase de 1,6 mg/dL, și 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 și nivelurile azotului ureei se majorează mai sus de 65 mg/dL (Nr.=48).

Prepararea țesutului cortical renal

Imediat după sacrificare, rinichiul stâng se decapsulează printr-o incizie de-a lungul axei orizontale cu adâncirea în țesut la 1 cm și se introduce în tampon salin fosfat (PBS) rece. Apoi cortexul renal se secționează pe perimetrul fiecărei secțiuni orizontale și țesutul fragmentat (secțiunile) se introduce în Stadie-Riggs™, unde se secționează (se taie) din fiecare rinichi optsprezece fragmente (secțiuni) de 0,3-0,4 mm cu greutatea 30-100 mg, fragmentele (secțiunile) din țesutul mai superficial se îndepărtează. Fragmentele se incubează individual la 25°C într-un mediu ce conține ¹⁴C-TEA și ³H-PAH cu o atmosferă de 100% O₂ și se agită continuu la 70 rot./min timp de 0; 15; 30; 45; 60 și 90 minute, îndepărtând în fiecare perioadă de timp trei fragmente (secțiuni). Mediul de incubare constă din 20 ml tampon Cross și PAH Taggart (72,8 μ g/l PAH, 10,78 g/l Na₂HPO₄ · 7H₂O; 1,33 g/l KH₂PO₄; 1,48 g/l MgSO₄ · 7H₂O; 35,07 g/l NaCl; 1,49 g/l KCl), cum este descris de Cross și Taggart în Amer. J. Physiol., 161: 181-190 (1950); 10 ml lactat (0,90 g/100 ml) și 55 ml apă deionizată, cu pH ajustat la 7,4, utilizând NaOH 1 M. Apoi se adaugă 2 ml CaCl₂ · 2H₂O (0,736 g/100 ml) și volumul final se aduce până la 100 ml cu apă deionizată. Mediul se aerează cu 100% oxigen timp de 30 minute și se adaugă țesutul renal. Imediat înainte de utilizare se mai adaugă ¹⁴C-PAH și ³H-TEA în concentrații de 0,334 μ Ci/3 ml de mediu.

În perioadele de timp specificate, fragmentele (secțiunile) se extrag din mediul de incubare, se usucă, se cântăresc, se dizolvă în 1,0 ml Protoso™ (New England Nuclear, Boston, MA) și se neutralizează cu acid clorhidric. Radioactivitatea fiecărui fragment (secțiune) din rinichi și 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 țesut incubat împărțit la dpm a 100 μ L mediu de incubare. Media și SEM pentru fiecare grup din trei fragmente (secțiuni), pentru perioada de timp, se calculează pentru fiecare iepure. Aceste valori, media fragmentului/mediul și SEM se calculează pentru grupurile IRA+IGF-1, IRA+des-IGF-1; IRA-control; normă și LAP+IGF-1.

Analiza statistică

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

Rezultatele din loturile cu iepuri se analizează individual și dacă nu se depistează o diferență în funcție de greutate, datele se exclud.

Eficiența ischemiei renale se verifică vizual în timpul intervenției chirurgicale, fiind depistată creșterea 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, în a 7-a zi. Deoarece clamparea arterei renale provoacă deteriorări măsurabile succesive IRA la toți iepurii, validitatea modelului experimental se acceptă.

Rezultatele: des-IGF-1

Controlul

Greutatea corporală a iepurelui:

În perioada postoperatorie, în ziua a 7-a, iepurile netratate au suferit o pierdere medie în greutate de circa 15% (vezi tabelul 7 și desenul 3). În lotul de animale ocluzionate, netratate, aceasta înseamnă o pierdere ce depășește 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 în greutate în lotul netratat, și ele constituie în medie 200 mg, deci o performanță de circa 40%.

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

În loturile cu iepuri, care au fost supuși laparotomiei, neocluzionați, după operație de asemenea sunt înregistrate modificări semnificative în greutate, care spre ziua a 6-a sunt egale cu cele înregistrate la iepurii ocluzionați netratați. 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 și IGF-1, spre ziua a 6-a, aceste cifre constituiau 143 mg. Nu au fost depistate diferențe semnificative între lotul tratat prin laparotomie și IGF-1 și cel netratat prin laparotomie, diferențe semnificative nu au fost între lotul tratat prin laparotomie cu IGF-1 și grupa ocluzionată netratată. Importanța acestei concluzii va fi discutată în continuare.

Tabelul 7

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

Ziua X-	des	SE M	Control	S EM	Nr.=(cl+des)	l ap	S EM
Ziua 0							
Ziua 1-0	-.07	.028	-.15		(4,4)	-.19	.03
Ziua 2-0	-.13	.02	-.23	-.015	(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 adiționali din același protocol, greutatea zilnică a cărora se măsoară, însă greutatea în ziua a 6-a se cunoaște.

** Un iepure din lotul de control a murit în 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 decât cea la animalele netratate (Nr.=7) ($14,87\pm 0,774$ g, comparativ cu $10,21\pm 0,61$ g respectiv, $p=0,0004$). Masa splinei, la animalele tratate a fost dublă, comparativ cu lotul de control ($2,43\pm 0,44$ g, comparativ cu $1,17\pm 0,21$ g respectiv, $p=0,028$).

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

Nivelurile creatininei serice

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

Nivelurile azotului ureei în ser

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

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

Nivelurile de glucoză în ser

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

Tabelul 8

Nivelurile de creatinină, de azot al ureei și glucoză la iepurii tratați cu des-IGF-1, comparativ cu iepurii ocluzionați-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 și ziua 1 - ziua 7, comparativ cu lotul relevă $p=0,29$								
Azotul ureei des-IGF-1 media	1 8	9 1	1 10	9 8	8 2	6 2	5 8	1 5
des-IGF-1 SEM	± .9	± 5.7	± 9.3	± 14.0	± 20.7	± 22.1	± 25.6	± 3.2
control media	1 7	1 02	1 25	1 26	1 11	9 3	7 4	1 9
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 și ziua 1 - ziua 7, comparativ cu lotul relevă $p=0,058$								
Glucoza des-IGF-1 media	1 77	1 01	1 43	1 37	1 31	1 31	1 39	1 27
des-IGF-1 SEM	± 20.1	± 8.5	± 8.0	± 4.2	± 6.4	± 7.5	± 15.8	± 3.7
control media	1 68	1 25	1 48	1 48	1 65	1 60	1 54	1 33
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 și ziua 1 - ziua 7, comparativ cu lotul relevă $p=0,09$								

* Iepure tratat # 4 morți

** Iepure control # 7 morți.

Rezultatele IGF-1 comparativ cu controlul

Greutatea corporală a iepurelui

Rezultatele de la iepurii - control, utilizați în experiențele cu IGF-1, nu au fost combinate cu rezultatele de la iepurii-control, utilizați în experiențele cu des-IGF-1, totuși protocoalele pentru ambele loturi au fost aceleași. Conform așteptărilor, IRA impune pierderi semnificative de greutate la toți iepurii. Controalele IRA indică un deficit de 376 ± 84 g în ziua a 6-a, o pierdere de 15% din greutatea corporală inițială. Spre deosebire de des-IGF-1, oricum IGF-1 în doza

administrată nu reduce semnificativ pierderile în greutate. Iepurii tratați cu IGF-1 au pierdut 250 ± 50 g spre ziua a 6-a, o pierdere în greutate de 9,5%, $p=0,34$. ANOVA relevă valori ne semnificative de p pentru toate zilele și 2-factori ANOVA, utilizând zi și tratament comparativ cu lotul, de 0,62 (vezi tabelul 9). Există o diferență ne semnificativă între loturile IRA+IGF-1 și LAP+IGF-1.

Tabelul 9

Pierdere zilnică în greutate (kg): iepuri tratați cu IGF-1, comparativ cu controlul

Ziua X - Ziua 0	IGF-1	SEM	control	SEM	N=(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 și 44-49

** iepurii de control # 40, 42 și 44 și tratați cu IGF-1 au murit în ziua a 3-a. În plus, iepurii 45-49 nu au fost cântăriți în ziua a 3-a.

*** Include numai greutatea corporală ale iepurilor 31-42. Iepurii precedenți au fost sacrificați în ziua a 6-a.

Masele organelor

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

Masa medie a timusului umed în lotul tratat cu IGF-1 era aproape dublă, comparativ cu cea înregistrată în lotul de control, $4,7 \pm 0,4$ g și $2,7 \pm 0,6$ 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 diferențe, crește ($p=0,01$). Totuși, o comparație a masei timusului normal al iepurelui cu masa timusului iepurelui tratat: IRA+IGF-1, indică că la iepurii tratați și la cei de control masele timusului sunt similare.

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

În ce privește lotul tratat cu des-IGF-1, inima a fost de mărime similară, indiferent de tratament, și ficatul animalelor tratate cu IGF-1 nu a indicat nici o diferență în mărime (vezi tabelul 10 și fig. 7). 6 animale nu au fost cântărite și alte 4 au decedat înainte de ziua a 7-a, de aceea datele includ 10 iepuri tratați și 6 de control.

Tabelul 10

Masele organelor iepurilor tratați cu IGF-1 și cu des-IGF-1 și ale iepurilor ocluzionați-controlul

Lotul	Rinichiul	Splina	Timusul	Inima	Ficatul	N=(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	-	
Norm al	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) și de control (Nr.=4), au fost cântărite toate organele. La iepurii 25-30, animale tratate cu IGF-1 (Nr.=4) și de control (Nr.=2), au fost cântărite toate organele, cu excepția timusului.

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

Nivelurile creatininei serice

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

Nivelurile azotului ureei în ser

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

Tabelul 11

Nivelurile creatininei, azotului ureei și glucozei în ser la iepurii tratați cu IGF-1, comparativ cu nivelurile la iepurii ocluzionați

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	0.6
2-factori ANOVA pentru tratament cu ziua a 4-a - ziua a 6-a, comparativ cu lotul, relevă $p=0,03$								
IGF-1 media	1.5.3	7.4.2	8.9.9	7.9.2	4.9.4	3.2.8	2.4.4	1.9.0
IGF-1 SEM	0.6	4.7	1.2.0	1.1.2	9.3	6.3	5.5	5.5
control media	1.5.9	8.7.3	1.22.4	1.19.7	9.4.6	8.0.3	7.2.8	1.4.5
control SEM	0.7	4.1	1.2.1	1.9.5	2.0.6	2.1.6	2.1.3	0.5
valoarea lui p	1.0	0.05	0.07	0.07	0.04	0.03	0.02	-
N=(cl, IGF)	1.1,13	1.1,13	1.1,13	1.0,13	9.12	9.12	9.12**	2.6***
2-factori ANOVA pentru tratament și ziua 1 - ziua a 6-a, comparativ cu lotul, relevă $p=0,0348$.								

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

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

*** Valorile indicilor menționați în ser în ziua a 7-a nu au fost calculate la iepurii 25-30 și 43-48 (tratați cu IGF-1 Nr.=3; control Nr.=3). În plus, datele de laborator ale iepurelui - control 32 atestă un nivel al azotului ureei din ser în ziua a 7-a de 14 mg/dL, în 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 neașteptat anormală.

³H-PAH

Absorbția anionului organic PAH de către secțiunile (fragmente) cortexului renal, măsurată prin rația anionilor marcați radioactiv în țesut la anionii mediului, se majorează de la 0 inițial la momentul zero la un nivel de $7,15 \pm 1,78$ în minutul 90 la iepurii normali (Nr.=4). După ocluzia renală, eficiența absorbției anionilor se reduce la animalele ocluzionate - control până la o rată a absorbției de 90 minute de $4,61 \pm 0,82$ ($p=0,16$). Ratele în minutele 45 și 60 s-au redus semnificativ ($p=0,052$ și $0,043$, respectiv) și 2 - factori ANOVA prezintă diferența semnificativă până la $p=0,077$. Rata de 90 minute la animalele ocluzionate cu IGF-1 crește până la o valoare de $5,09 \pm 0,56$, însă nu a fost substanțial 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 diferență semnificativă la nici o etapă (vezi tabelul 12 și fig. 10).

¹⁴C-TEA

În secțiunile (fragmente) cortexului renal de la iepurii normali absorbția cationului organic TEA a atins o valoare de $7,36 \pm 1,40$ în minutul 90. La animalele ocluzionate-control, această valoare scade considerabil până la $4,83 \pm 0,50$, ceea ce reprezintă o descreștere cu 35% a capacității de concentrare. La animalele tratate cu IGF-1, rata de 90 minute a fost de $7,21 \pm 0,80$ și valorile la toate etapele au fost mai ridicate, comparativ cu animalele ocluzionate-control, cu autenticitate în toate momentele temporale, 2-factori ANOVA: timp și grupă, comparativ cu rata atestă $p=0,0014$.

În plus, în orice moment temporal 2-factori ANOVA, utilizând aceiași parametri, indică valoarea de $p=0,71$.

Rata de 90 minute în lotul animalelor tratate cu des-IGF-1 a fost de $8,48 \pm 1,04$, rata, de asemenea ridicată, comparativ cu rata de absorbție a TEA la animalele ocluzionate-control.

Tabelul 12

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

Lotul	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	Nr .
³ H- PAH Normal	0	1.5 0	2.8 4	4.2 2	5.7 6	7.1 5	4
SEM	0	0.0 8	0.4 6	0.8 6	1.1 4	1.7 8	
IRA- ocl.	0	1.0 8	1.9 0	2.4 8*	3.2 2*	4.6 1	10
SEM	0	0.1 4	0.2 8	0.3 9	0.5 4	0.8 2	
des- IGF-1	0	1.5 7	2.8 4	4.0 8**	4.3 4	6.6 8	3
SEM	0	0.1 0	0.2 1	0.3 4	0.2 3	0.6 5	
IRA+I GF-1	0	1.3 1	2.1 8	3.4 2	3.5 7	5.0 9	10
SEM	0	0.1 2	0.1 8	0.3 3	0.3 0	0.5 6	
LAP+I GF-1	0	1.2 1	2.1 5	3.0 9	3.5 0	4.7 8	3
SEM	0	0.0 2	0.1 5	0.2 1	0.0 2	0.5 4	
* 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 decât în lotul de control.							
¹⁴ C- TEA Normal	0	2.1 3	4.0 4	4.9 7	6.5 8	7.3 6	4
SEM	0	0.3	0.7	0.9	0.9	1.4	

		1	6	2	5	0	
IRA	0	1.3	2.2	2.8	3.6	4.8	10
ocl.		1	3	6	0	3	
SEM	0	0.1	0.1	0.2	0.3	0.5	
		0	9	6	7	0	
IRA+d	0	2.4	3.9	6.1	6.4	8.4	3
es		9	5	1	7	8	
SEM	0	0.8	0.8	1.1	0.8	1.0	
		4	8	7	8	4	
IRA+I	0	2.0	3.2	4.8	5.1	7.2	10
GF-1		1	5	5	8	1	
SEM	0	0.1	0.2	0.5	0.3	0.8	
		5	5	4	2	0	
valoare a lui p***		0.0	0.0	-	0.0	0.0	
		012	049	.0036	045	192	
LAP+I	0	1.6	3.4	5.1	5.7	6.8	3
GF-1		0	1	8	2	0	
SEM	0	0.1	0.3	0.0	0.2	1.3	
		9	9	6	9	2	

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

*** Semnificațiile între grupul tratat cu IGF-1 și cel de control. 2-factori ANOVA indică $p=0,0014$. Nici o diferență între IGF-1 și 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	Mineralizare	Hipertrofie	Dilatare
IRA	+	0.2	0.	0.	1	1.7	2.6	1.9
	2.4		9	4	.8			
GF-1	±	±0.	±0	±	±	±0.4	±0.	±0.
	0.5	1	.3	0.2	0.1		2	4
IRA	1.	0.3	1.	0.	2	2.2	2.4	2.3
	5		1	8	.4			
ocl.	±	±0.	±0	±	±	±0.4	±0.	±0.
	0.3	2	.3	0.3	0.3		3	3

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

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

Loturile au fost examinate pentru depistarea prezenței următoarelor simptome: nefritei cronice multifocale interstițiale; edemului; inflamației capsulare subacute; hipertrofiei epiteliale medulare și mineralizării tubulare; dilatării; degenerării; congestiei și cilindrilor renali hialini. Secțiunile au fost marcate cu valori 0-4, bazate pe absența modificărilor ușoare, moderate, marcante sau severe. A fost calculată media acestor valori pentru fiecare categorie și 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 și dilatare, iepurii aceștia manifestă o tendință mai mult spre a avea hipertrofie.

Discuție

Aceste date sugerează că IGF-1 și 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 în greutate nu au fost așa impresionante și nici statistic semnificative. În cadrul multor măsurări ale efectului anabolic, des-IGF-1 manifestă o triplă creștere asupra succesiunii complete IGF-1. Totuși, chiar cu reducerea compensatorie de 2/3 a dozei utilizate în experiențele prezentei invenții, masele renale ale iepurilor tratați cu des-IGF-1 depășesc cu 50% cele ale iepurilor de control, după o perioadă de 7 zile ($p=0,0004$). Rinichii tratați cu IGF-1 nu au manifestat aceeași creștere a masei renale, însă ambii - și IGF-1 și 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 mărimei organului.

În ambele loturi există manifestări evidente de necroză, granulație și leziuni generale celulare. Unii rinichi prezintă porțiuni de calcificare, ca rezultat al morții celulelor și 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 și mai multe dovezi de regenerare renală.

Datele înregistrate indică nu numai o creștere a masei splinei, timusului și rinichilor, dar măsurările creatininei și azotului ureei în ser sugerează o ameliorare specifică a funcției renale în ambele loturi: tratați cu des-IGF-1 și tratați cu IGF-1. Lotul tratat cu IGF-1 prezintă niveluri semnificativ mai joase ale ambilor indici: de creatinină și azot al ureei în ser, nivelurile azotului ureei erau cu 50% mai joase, comparativ cu valorile de control, înregistrate din ziua a 2-a până în ziua a 6-a. Excesul azotului ureei este indezirabil și 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 și aceste două momente sugerează că tratamentul cu IGF-1 ameliorează filtrația și 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, totuși, au fost ne semnificativ mai joase ($p=0,058$). Astfel, datele sugerează că IGF-1 este mai eficient, comparativ cu proteina trunchiată, în ce privește creșterea masei renale funcționale, necesare pentru reducerea nivelurilor în ser. Se pare, că IGF-1 restabilește mai convingător funcțiile normale renale în IRA, mai repede și mai radical decât excipientul, cu schimbări precoce posibile până la 24 ore.

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

Totuși, 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 declanșarea ictusului acut produce restabilirea radicală a capacității de concentrare: absorbția TEA crește la 70% și absorbția PAH la 50%, comparativ cu IRA la controale. Cu alte cuvinte, la administrarea oricărui din IGF-1 sau des-IGF-1, compoziția celulară a fragmentelor corticale renale este afectată în așa mod încât să revină la normal eficiența transportorilor cationici pentru masa dată. Majorarea transportului de ioni *in vitro* la șobolanii tratați cu IGF-1 sugerează că cantitatea de țesut funcțional a crescut.

Concluzii

În modelul leziunii, descrise mai sus, la iepure s-a produs o leziune ischemică renală evidentă, ce poate fi măsurată, care se manifestă prin descreșterea capacității funcționale renale, verificată prin majorarea nivelului creatininei serice și azotului ureei în ser și reducerea transportului de ioni organici. În plus, pierderile postischemice în greutate par a fi o măsură utilă a funcției renale, deși pierderi "postoperatorii" în greutate s-ar putea dovedi a fi un termen mai reușit.

Tratamentul cu IGF-1, cu o consecutivitate absolută, în perioada ictusului renal este benefic pentru iepurii, incluși în acest studiu, prin asigurarea unor niveluri mai joase de creatinină serică și azot ureic în ser. La iepurii tratați cu IGF-1 se relevă, de asemenea, creșterea masei timusului și, posibil, deși ne semnificativă, reducerea pierderii în greutate. La animalele tratate cu des-IGF-1, de asemenea, se atestă reducerea nivelului azotului ureei în ser și capacitate normală de concentrare a ionilor. În plus, se înregistrează majorarea masei splinei și rinichilor și reducerea pierderii în greutate. De aceea, IGF-1 și des-IGF-1 sunt agenți potențiali utili în prevenirea sau ameliorarea ischemiei renale la iepure și pot fi folosiți și la alte genuri de animale.

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

Exemplul III

Tratamentul șobolanilor

Introducere

Acest studiu are ca scop determinarea capacităților des-IGF-1 și IGF-1 de a preveni sau cel puțin de a ameliora leziunile rinichilor la alte specii de animale, la șobolan, și posibilității acestor factori de creștere de a reduce catabolismul accelerat, care se presupune că se asociază insuficienței renale.

Protocolul

S-au efectuat trei testări, în care IRA a fost indusă operatoriu prin clamparea ambilor rinichi la șobolani Sprague-Dawley masculi anesteziati (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Anestezia (Ketamine/Xylazine intraperitoneal, i.p.) s-a monitorizat pe parcursul investigației și ulterior se suplimenta pentru a menține câmpul de operație. Preoperatoriu, proba de sânge bazală se colectează preorbital sub anestezie și apoi în părțile 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 și vena renală și se clamează pentru 30 sau 60 minute, utilizând o clemă pentru aneurism de 2,5 cm Schwartz™. La animalele la care a fost simulată operația, au fost realizate aceleași proceduri, cu excepția clampării rinichiului. Rinichii se declamează, inciziile se suturează și animalele se plasează pe perioada vindecării pe o pernă încălzită. Analiza biochimică a sângelui se efectuează utilizând Monarch 2000 Clinical Chemistrz Analyser.

Planul investigațiilor

Studiul 1: În primul studiu 16 șobolani au fost clampați 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 acționa imediat după amplasament. La toți șobolani li se injectează 50 mg des-IGF-1 sau de excipient al acestuia 90 minute după declampare. Șobolani se cântăresc zilnic și se colectează zilnic probe de sânge din vena codală și în ziua a 7-a se sacrifică.

Studiul 2: Această investigație 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 ușoare. 6 șobolani se clamează pentru 30 minute, 6 șobolani - pentru 60 minute și la 4 șobolani de control se simulează operația. Șobolani se cântăresc zilnic și zilnic se colectează probe de sânge din vena codală, și în ziua a 4-a se sacrifică.

Studiul 3: 18 șobolani se clamează pentru 60 minute fiecare și la 4 șobolani de control se simulează operația. La 6 șobolani 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 acționa imediat după amplasament. După declampare, la toți șobolani li se administrează subcutanat în injecții 100 mg des-IGF-1; IGF-1 sau de excipient al acestuia. Șobolani se cântăresc zilnic și zilnic se colectează probe de sânge din vena codală până în ziua a 4-a inclusiv și în ziua a 7-a se sacrifică.

Rezultate

În fig. 12, se compară eficiențele IGF-1 și des-IGF-1, ca stimulatori ai creșterii rinichilor la șobolani hipofizectomizați. Ca factor de creștere al rinichiului, eficiența IGF-1 trunchiat depășește de 9 ori eficiența IGF-1. Datorită acestor efecte puternice ale des-IGF-1, ambii IGF-1 și des-IGF-1 au fost testați în leziunile renale pe modelul cu animale.

Studiul 1. Evoluția insuficienței renale, ca urmare a ocluziei arterelor renale timp de 30 minute la șobolani de control și cei tratați cu des-IGF-1, este prezentată în fig. 13-15 prin așa indici, cum ar fi adaosul în greutate, BUN și creatinina. Se relevă un adaos în greutate mai semnificativ în lotul animalelor tratate, începând cu ziua a 5-a de la ocluzionare.

Nivelul BUN crește similar la ambele loturi cu leziuni, însă din acest moment, se menține la un nivel mai jos în lotul tratat. Acest efect al des-IGF-1 devine statistic semnificativ în zilele 6 și 7 și reflectă efectul anabolic al moleculei. Creatinina serică crește și se reduce în mod similar în ambele loturi. Acestea reflectă evoluția leziunilor ușoare, care se autolimitează. Creatinina s-a luat drept măsură a funcției renale, în genere drept măsură indirectă a ratei filtrației glomerulare. BUN servește drept măsură a ambelor funcții renale și a stării catabolice a șobolanilor.

Studiul 2. Evoluția insuficienței 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 influența operației în toate loturile, însă numai animalele clampate timp de 60 minute au manifestat un catabolism menținut.

BUN atestă o creștere radicală în lotul clamat 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 insuficiență 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 experiențele ulterioare.

Studiul 3. Evoluția insuficienței 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). Șobolani cu insuficiență renală netratată nu adaugă în greutate, în schimb, tratamentul timp de 3 zile cu des-IGF-1 relevă un adaos în greutate. Spre comparație, aceeași doză de IGF-1 exercită un efect mai redus. BUN crește până la o extindere similară în ambele loturi clampate. Totuși, 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.

