



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108794** (13) **C2**

(51) МПК (2015.01)

A61K 38/18 (2006.01)

G09B 23/28 (2006.01)

A61P 7/00

A61P 13/12 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 12932**

(22) Дата подання заявки: **07.11.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.06.2015**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **25.04.2014, Бюл.№ 8**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.06.2015, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Пирогов Віктор Олексійович (UA),
Кордюм Віталій Арнольдович (UA),
Зубко Володимир Іванович (UA),
Мигаль Людмила Якимівна (UA),
Нікуліна Галина Григорівна (UA),
Дубей Ігор Ярославович (UA),
Нікітаєв Сергій Вікторович (UA),
Сербіна Ірина Євгенівна (UA),
Похоленко Яніна Олександрівна (UA),
Негрей Лариса Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
УРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",
вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053
(UA),
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І
ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Ак. Заболотного, 150, м. Київ, 03680
(UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

UA 26456 U, 25.09.2007

UA 65480 U, 12.12.2011

UA 36540 U, 27.10.2008

SU 1686472 A1, 23.10.1991

Cuevas P, Martinez-Coso V, Fu X, Orte L,
Reimers D, Gimenez-Gallego G, Forssmann
WG, Saen Fibroblast growth factor protects
the kidney against ischemia-reperfusion injury.
Eur J Med Res. 1999 Oct 15;4(10):403-10.
Fu X, Cuevas P, Gimenez-Gallego G, Wang Y,
Sheng Z. The effects of fibroblast growth
factors on ischemic kidney, liver and gut
injuries. Chin Med J (Engl). 1998
May;111(5):398-403.

**(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ ПОРУШЕНЬ КРОВООБІГУ В НИРКАХ ІЗ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО
ЗМОДЕЛЬОВАНОЮ ІШЕМІЄЮ**

UA 108794 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до способу корекції порушень кровообігу в нирках із експериментально змодельованою ішемією, який включає застосування препарату основного фактора росту фібробластів (bFGF) в верхній полюс лівої дослідної нирки з використанням гепарину як носія bFGF, дослідження ниркового кровообігу методами ангіографії та доплерівської сонографії, а також морфологічному дослідженні обох (дослідної лівої та інтактної правої) нирок, причому основний фактор росту фібробластів - bFGF - вводять в терапевтичній дозі, виходячи з діапазону 0,2-20 мкг, як носій bFGF використовують полімер на основі зшитого модифікованого гепарину із загальним об'ємом суміші 200 мкл, ін'єкційно транскутанно в зону ішемії під контролем сонографії через 2-5 місяців після накладання лігатури терміном на 1-3 місяці, ефект корекції порушень кровообігу в нирках визначають при дослідженні активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази у корковому шарі паренхіми нирки та вважають досягнутим, якщо рівні активності ферменту реєструють вищими на 30 % та більше за середній їх рівень в групі контролю.

Спосіб належить до галузі медицини, зокрема до урології, нефрології та біохімії, і може бути використаним для корекції порушень кровообігу в нирках з експериментально змодельованою в них ішемією, а також може слугувати експериментальним обґрунтуванням досліджень корекції порушень внутрішньониркової гемодинаміки за деяких патологічних станів в умовах клініки.

Як відомо, виникнення та розвиток гіпоксичних (ішемічних) процесів в паренхімі нирки, як наслідок порушення внутрішньониркової гемодинаміки незмінно супроводжують хвороби нирок як вродженої (вроджені вади верхніх сечовивідних шляхів), так і набутої (сечокам'яна хвороба, пієлонефрит, гломерулонефрит тощо) етіології. Ось чому проблема ішемії паренхіми нирки, як обов'язкова складова патогенезу будь-якого захворювання нирок, на сьогодні займає важливе місце при вирішенні нагальних питань щодо подальшої тактики лікування хворих з патологією нирок, тобто корекції у цих пацієнтів ішемічних розладів. Дослідження в експериментальних умовах впливу нових лікувальних засобів, зокрема засобів корекції порушень внутрішньониркової гемодинаміки та відповідно корекції гіпоксично-ішемічних станів в паренхімі нирки, як відомо, передують їх клінічним випробуванням.

Відомий спосіб експериментальної корекції ангіогенезу та кардіальної функції у ішемізованому міокарді [1], який включає ін'єкційне введення основного фактору росту фібробластів безпосередньо у серцевий м'яз, що підвищує гемодинаміку в стінці серця, покращує функцію лівого шлуночка, збільшує кількість мікросудин у міокарді та запобігає його склерозуванню.

Недоліком способу є те, що він адаптований тільки для експериментального моделювання гострого інфаркту міокарда, тобто для виконання досліджень безпосередньо на серцевому м'язі.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб застосування основного фактора росту фібробластів (bFGF) для корекції порушень кровообігу в нирках [2], взятий нами за прототип, що полягає в моделюванні ішемії нирки шляхом накладання, під час операційного втручання, на межі верхнього та середнього сегмента лівої дослідної нирки кролів кетгutowої странгуляційної лігатури, ін'єкції препарату bFGF в дозах 10 або 64 мкг на 1 кг ваги тварин, в верхній полюс лівої дослідної нирки (або аплікації нирки целюлозою, просоченою препаратом під час цієї ж операції), з використанням гепарину (природного сульфатвмісного полімеру) як носія bFGF, дослідженні ниркового кровотоку через 4-6 місяців після операції методами ангіографії та доплерівської сонографії, а також морфологічному дослідженні обох (дослідної лівої та інтактної правої) нирок через 5-6 місяців після операції, контрольну групу складали тварини (кролі) тільки з ішемізованими нирками (без введення препарату bFGF).

Недоліками відомого способу було застосування препарату у досить широкому діапазоні доз (10 та більше мкг/кг маси тварин) не є виправданим, тому що тварини (кролі) в дослідженні були практично однакової маси (у середньому 2,5-3,0 кг), а застосування високих доз препарату може привести до погіршення балансу співвідношення процесів посилення ангіогенезу і розростання інтерстиціальної сполучної тканини у бік останньої, а, в той же час, застосування під час хірургічного втручання одночасно двох маніпуляцій на лівій нирці - моделювання ішемії нирки та паралельне введення препарату (ін'єкційно або у вигляді аплікації нирки целюлозою, просоченою препаратом) для корекції порушень кровообігу та корекції ішемічних розладів, не є виправданим, оскільки, з одного боку, підвищує операційну травму та навантаження на організм експериментальної тварини, а, з другого - не відповідає клінічним умовам, де, як відомо, патогенетично спочатку розвиваються гіпоксичні (ішемічні) процеси, а вже потім застосовують медикаментозні заходи, що їх корегують.

Слід зазначити, що безпосередній розрахунок дози має проводитися на ішемізований орган, оскільки у різних організмів ішемізована ділянка може бути різного розміру, тому локальна доза препарату також має варіювати.

В основу винаходу поставлена задача вдосконалити спосіб корекції порушень кровообігу в нирках з експериментально змодельованою ішемією шляхом застосування основного фактора росту фібробластів (bFGF) для корекції порушень кровообігу в ішемізованих нирках, який вводять в терапевтичній дозі, виходячи з діапазону 0,2-20 мкг, як носій bFGF використовують полімер на основі зшитого модифікованого гепарину із загальним об'ємом суміші 200 мкл, ін'єкційно транскутанно під контролем сонографії через 2-5 місяців після накладання лігатури терміном на 1-3 місяці, та для оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в нирках на тлі розвитку експериментально змодельованої в них ішемії застосування крім ангіографічних, доплерографічних та патоморфологічних методів, методу біохімічного (ензимологічного) дослідження коркового шару паренхіми нирки з визначенням активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази як біо- маркера ішемічного стану паренхіми нирки, та

вважають активність досягнутою, якщо рівні активності ферменту реєструють вищими на 30 % та більше за середній їх рівень в групі контролю.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб корекції порушень кровообігу в нирках із експериментально змодельованою ішемією, який включає застосування препарату основного фактора росту фібробластів (bFGF) в верхній полюс лівої дослідної нирки з використанням гепарину як носія bFGF, дослідження ниркового кровообігу методами ангіографії та доплерівської сонографії, а також морфологічному дослідженні обох (дослідної лівої та інтактної правої) нирок, згідно з винаходом, основний фактор росту фібробластів - bFGF - вводять в терапевтичній дозі, виходячи з діапазону 0,2-20 мкг, як носій bFGF використовують полімер на основі зшитого модифікованого гепарину із загальним об'ємом суміші 200 мкл, ін'єкційно транскутанно під контролем сонографії в зону ішемії через 2-5 місяців після накладання лігатури терміном на 1-3 місяці, ефект корекції порушень кровообігу в нирках визначають при дослідженні активності лізосомного канальцевого ферменту β -галактозидази у корковому шарі паренхіми нирки та вважають досягнутим, якщо рівні активності ферменту реєструють вищими на 30 % та більше за середній їх рівень в групі контролю.

Спосіб корекції порушень кровообігу в нирках з експериментально змодельованою ішемією виконують наступним чином: експериментальне моделювання ішемічного процесу в паренхімі нирки кролів проводять за описаним методом [3], через 2-5 місяців (саме в такий термін у паренхімі нирки дослідних тварин розвиваються виражені ознаки хронічної ішемії, але без тенденції до розвитку незворотних змін) після накладання лігатури здійснюють введення розчину основного фактора росту фібробластів - засобу для корекції порушень кровообігу в нирках - в терапевтичній дозі, виходячи з діапазону 0,2-20 мкг, як носій bFGF використовують полімер на основі зшитого модифікованого гепарину із загальним об'ємом суміші 200 мкл (важливо, що препарат гепарину в саме такий формі і в такому об'ємі, за даними комплексних досліджень, практично не проявляє свої антикоагуляційні властивості), в верхній ішемізований полюс лівої дослідної нирки кролів ін'єкційно транскутанно під контролем сонографії, для контролю за розвитком ішемії проводять доплерівську сонографію та ангіографію нирок кролів і через 1-3 місяці після введення препарату, терміну, цілком достатнього для розвитку чітких позитивних змін щодо корекції порушень кровообігу в паренхімі нирок, тварин виводять з експерименту та виконують патоморфологічне дослідження тканини нирок, крім цього, для оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в нирках за допомогою препарату bFGF, на тлі розвитку експериментально змодельованої в них ішемії, проводять біохімічне (ензимологічне) дослідження коркового шару паренхіми нирки з визначенням активності лізосомного канальцевого ферменту β -галактозидази за описаним раніше методом [4].

Апробацію способу, що заявляється, проведено в лабораторії нейроурології та в лабораторії біохімії ДУ "Інститут урології НАМН України", а також у відділі регуляторних механізмів клітини та відділі синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики НАН України на експериментальних тваринах - статевозрілих кролях вагою у середньому $3,2 \pm 0,05$ кг. Контрольну групу експериментальних тварин (група 1) складають 12 кролів з експериментально змодельованою ішемією лівою ниркою, яка розвинулася через 2-5 місяців після накладання лігатури на її верхній полюс, праву (контралатеральну) нирку залишають інтактною, в дослідну групу (група 2) входять 16 кролів, яким в середньому через 3 місяці після накладання лігатури, на тлі експериментально змодельованої ішемії лівої нирки, з метою здійснення корекції порушень кровообігу вводять розчин основного фактора росту фібробластів (bFGF) з використанням, як його носія, полімеру на основі зшитого модифікованого гепарину, групу 3 складають дослідження 6 нирок трьох здорових кролів. Розвиток ішемії та, навпаки, ефект корекції порушень кровообігу в паренхімі нирок тварин підтверджують результати сонодоплерографії, ангіографії та гістоморфологічно.

Отримані результати свідчать, що рівні активності β -галактозидази в корковому шарі паренхіми нирок здорових кролів, з урахуванням середньої величини та її похибки ($M \pm m$), становлять $18,43 \pm 1,17$ мкмоль/год. \cdot г сирої тканини, у кролів, у яких через 2-5 місяців розвинулася ішемія (контрольна група 1, $n=10$) в лівій дослідній нирці рівні активності β -галактозидази становлять $13,34 \pm 0,81$ мкмоль/год. \cdot г сирої тканини, що є статистично вірогідно зниженим у порівнянні з аналогічним показником як з групи здорових кролів, так і з інтактною (контралатеральною) ниркою ($18,44 \pm 1,67$ відповідно) цих тварин ($p < 0,01$ та $< 0,02$). Рівні активності β -галактозидази в корковому шарі паренхіми нирок кролів з дослідної групи 2 ($n=9$), яким на тлі експериментально змодельованої ішемії в середньому через 3 місяці після накладання лігатури терміном на 1-3 місяці вводять транскутанно в верхній ішемізований полюс лівої дослідної нирки, як засобу для корекції порушень кровообігу в нирках, розчин основного фактора росту фібробластів в терапевтичній дозі, виходячи з діапазону 0,2-20 мкг, з

використанням, як його носія, полімеру на основі зшитого модифікованого гепарину із загальним об'ємом суміші 200 мкл, в лівій дослідній нирці становлять $19,41 \pm 0,67$ мкмоль/год.·г сирої тканини, що є статистично вірогідно підвищеним порівняно з аналогічним показником із контрольної групи 1 ($p < 0,001$), та свідчить, по-перше, про позитивний ефект корекції порушень кровообігу в паренхімі нирок та про суттєве відновлення внутрішньониркової гемодинаміки, по-друге, про позитивний вплив препарату на функціональний стан паренхіми нирки, зокрема на функціональний стан канальцевого відділу нефрону. Про цей факт також свідчить відсутність різниці в активності β -галактозидази між корковим шаром лівої та правої нирок ($19,41 \pm 0,67$ та $20,11 \pm 1,17$ відповідно) в цій дослідній групі та рівнем активності ферменту у корковому шарі здорових кролів ($18,43 \pm 1,17$ відповідно) із групи 3 ($n=6$). Індивідуальний аналіз отриманих результатів дослідження активності β -галактозидази у корковому шару паренхіми нирки тварин з дослідної групи показав, що зростання рівнів активності ферменту у цій групі кролів порівняно з середніми даними контрольної групи ($13,34 \pm 0,81$ мкмоль/год.·г сирої тканини) коливається від 30 % до 70 %. Точність методу визначення активності (β -галактозидази у корковому шарі паренхіми нирки тварин, тобто помилка у двох паралельних визначеннях, не перевищує $\pm 5,7$ %.

Отже, отримані результати підтверджують правильність підходу до вибору засобу для корекції порушень кровообігу в експериментальних ішемізованих нирках та до умов його застосування (доза, молекулярний носій, місце введення тощо).

Наводимо приклади застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Кріль № 43 вагою 3200 г, самець, протокол від 08.12.2009 р. Тривалість досліду від накладання лігатури до виведення тварини з експерименту, тобто тривалість "чистої" ішемії або загальна тривалість досліду, 4 місяці. Активність β -галактозидази в корковому шарі паренхіми ішемізованої зони лівої (дослідної) нирки становить 9,52 мкмоль п-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 г сирої тканини коркового шару паренхіми нирки (мкмоль/год.·г сирої тканини), в корковому шарі паренхіми правої (інтактної) нирки становить 16,80 мкмоль/год.·г сирої тканини (в корковому шарі паренхіми нирок здорових кролів відповідно становлять $18,43 \pm 1,17$ мкмоль/год.·г сирої тканини).

Приклад 2. Кріль № 28 вагою 3000 г, самка, протокол від 02.04.2009 р. Тривалість досліду від накладання лігатури до транскутанного введення розчину основного фактора росту фібробластів (bFGF) становить 4 міс., при цьому активність β -галактозидази в корковому шарі паренхіми ішемізованої зони лівої (дослідної) нирки становить 20,16 мкмоль п-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 г сирої тканини коркового шару паренхіми нирки (мкмоль/год.·г сирої тканини), що практично дорівнює рівням активності цього ферменту в корковому шарі паренхіми нирок здорових кролів, в корковому шарі паренхіми правої (інтактної) нирки активність ферменту становить 24,52 мкмоль/год.·г сирої тканини відповідно. Відсоток збільшення рівня активності β -галактозидази лівої нирки порівняно із середнім значенням активності ферменту лівої нирки контрольної групи № 1 ($13,34 \pm 0,81$ мкмоль/год.·г сирої тканини) становить 51 %, відсоток збільшення рівня активності β -галактозидази лівої дослідної нирки кроля № 28 порівняно із рівнем активності β -галактозидази лівої дослідної нирки кроля № 43 із практично однаковою загальною тривалістю експерименту (4 та 4,5 місяця) становить 112 %, що свідчить, згідно з запропонованим способом, про позитивний ефект корекції порушення кровообігу та відповідно про достатню корекцію порушеної внутрішньониркової гемодинаміки у паренхімі лівої дослідної нирки цієї тварини.

З наведених прикладів видно, що застосування запропонованого способу свідчить про позитивний ефект корекції порушення кровообігу у паренхімі ішемізованої нирки та відповідно позитивно впливає на функціональний стан канальцевого нефротелію в умовах експерименту за даними визначення активності канальцевого ферменту лізосом β -галактозидази.

Суттєвими відмінностями способу, що заявляється, є:

застосування основного фактора росту фібробластів (bFGF) як засобу для корекції порушень кровообігу, який вводять ін'єкційно транскутанно під контролем сонографії в терапевтичній дозі, виходячи з діапазону 0,2-20 мкг;

застосування полімеру на основі зшитого модифікованого гепарину як молекулярного носія для bFGF із загальним об'ємом суміші 200 мкл;

використання визначення рівнів активності лізосомного ензиму канальцевого нефротелію β -галактозидази, по-перше, як біомаркера оцінки ішемічного стану нирки та, по-друге, як біомаркера оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в нирках з ішемією.

Застосування перелічених відмінностей дозволить мінімізувати наслідки ішемії органа в плані збалансованості процесів ангиогенезу і розростання інтерстиціальної сполучної тканини.

Отже, спосіб, що заявляється, може бути використаним в експериментальних умовах для корекції порушень кровообігу в нирках з ішемією, а також з метою своєчасного лікування деяких

патологічних станів нирки в умовах клініки, може слугувати експериментальним обґрунтуванням корекції порушень внутрішньониркової гемодинаміки.

Таким чином, застосування способу корекції порушень кровообігу в нирках із експериментально змодельованою ішемією сприяє відновленню внутрішньониркової гемодинаміки в ішемізованій нирці та відповідно спричиняє позитивний вплив на функціональний стан паренхіми нирок, зокрема на функціональний стан каналцевого нефротелію за результатами нормалізації активності каналцевого ферменту лізосом β -галактозидази, як біомаркера ішемічного стану паренхіми нирок, ефективність способу - 94 %.

Джерела інформації:

1. Liu Y., Sun L., Huan Y., Zhao H., Deng J. Effects of basic fibroblast growth factor microspheres on angiogenesis in ischemic myocardium and cardiac function: analysis with dobutamine cardiovascular magnetic resonance tagging // Eur J. Cardio-thorac Surg. - 2006, Jul - № 30 (1). - P. 103-107.

2. Пат. № 26456, UA, МПК(2006), А 61К38/18. Застосування основного фактора росту фібробластів (bFGF) для корекції порушень кровообігу в нирках / О.Ф. Возіанов, В.А. Кордюм, В.О. Пирогов, А.М. Романенко, В.І. Зубко; № u200704481, 23.04.2007. Опубл. 25.09. 2007, Бюл. № 15. - 7 с. (прототип).

3. Пат. № 65480, UA, МПК G09B23/28 (2006.01). Спосіб моделювання ішемії нирки /О.Ф. Возіанов, В.О. Пирогов, В.І. Зубко, С.В. Нікітаєв, А.М. Романенко та ін.; ДУ "ІУАМНУ"; № u201105548, 04.05.2011, Опубл. 12.12.2011, Бюл. № 23. - 2 с.

4. Заявка № a201307248, UA, МПК (2011.01), G01N33/48, A61P13/12, G09B23/28. Спосіб оцінки ефективності корекції порушень кровообігу в ішемізованій нирці /В.О. Пирогов, Л.Я. Мигаль, Г.Г. Нікуліна, С.В. Нікітаєв, Л.М. Негрей, І.Є. Сербіна; ДУ "ІУ АМН України"; № a201307248, 07.06.2013.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб корекції порушень кровообігу в нирках із експериментально змодельованою ішемією, який включає застосування препарату основного фактора росту фібробластів (bFGF) в верхній полюс лівої дослідної нирки з використанням гепарину як носія bFGF, дослідження ниркового кровообігу методами ангіографії та доплерівської сонографії, а також морфологічному дослідженні обох (дослідної лівої та інтактної правої) нирок, який **відрізняється** тим, що основний фактор росту фібробластів - bFGF - вводять в терапевтичній дозі, виходячи з діапазону 0,2-20 мкг, як носій bFGF використовують полімер на основі зшитого модифікованого гепарину із загальним об'ємом суміші 200 мкл, ін'єкційно транскутанно в зону ішемії під контролем сонографії через 2-5 місяців після накладання лігатури терміном на 1-3 місяці, ефект корекції порушень кровообігу в нирках визначають при дослідженні активності лізосомного каналцевого ферменту β -галактозидази у корковому шарі паренхіми нирки та вважають досягнутим, якщо рівні активності ферменту реєструють вищими на 30 % та більше за середній їх рівень в групі контролю.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601