



# Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

## Founders:

- State Institution «Institute of Nephrology NAMS of Ukraine»
- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;

eISSN 2616-7352

Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>

## Research article

S. Bazalytska<sup>1</sup>, G. Nikulina<sup>1</sup>, V. Kordium<sup>2</sup>, I. Dubey<sup>2</sup>, S. Vozianov<sup>1</sup>,  
A. Romanenko<sup>1</sup>, Ia. Pokholenko<sup>2</sup>, S. Nikitaev<sup>1</sup>, I. Serbina<sup>1</sup>,  
L. Mygal<sup>1</sup>, **O. Vozianov<sup>1</sup>**

doi: 10.31450/ukrjnd.3(75).2022.06

## Experimental therapy of chronic kidney ischemia using drug basic fibroblast growth factor

<sup>1</sup>SI «Academician O.F. Vozianov Institute of Urology» NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

## Citation:

Bazalytska S, Nikulina G, Kordium V, Dubey I, Vozianov S, Romanenko A, et al. Experimental therapy of chronic kidney ischemia using drug basic fibroblast growth factor. Ukr J Nephrol Dial. 2022;3(75):43-54. doi: 10.31450/ukrjnd.3(75).2022.06.

**Abstract.** The aim of the work was to experimentally study the effect of the created injectable drug basic fibroblast growth factor (bFGF) with the controlled release on morphological changes and indicators of renospecific enzymes in the ischemic kidney (experiment on rabbits).

**Methods.** Studies on the release dynamics of the created bFGF drug were performed in vitro and the study of the induction of bFGF angiogenesis in the model of the chick chorioallantoic membrane was performed. The experimental model was performed in 25 rabbits: in 10 rabbits we studied the effect of 1-8 months of “pure ischemia” of the kidney without injection of the drug (control); in 12 rabbits 1 month after the creation of the model of ischemia in the renal parenchyma was injected the prolonged-acting drug bFGF, deposited on our polymeric carrier at a dose of 5 µg (experiment). The reference group consisted of 3 intact rabbits. Histological examinations of renal tissue and morphometric examinations with the determination of vascular coefficient (VC) and interstitial coefficient (IC) were performed. Enzymological indicators of enzyme activity in the homogenate of the renal parenchyma were determined by biochemical methods; statistical analysis was performed.

**Results.** It was preliminarily demonstrated that the developed injectable prolonged-acting drug bFGF deposited on a polymeric carrier based on cross-linked modified heparin, effectively enhances neoangiogenesis in chick chorioallantoic membrane model.

The results of morphological and morphometric studies with the determination of vascular and interstitial coefficients showed, that the injection of the prolonged-acting drug bFGF in all cases was accompanied by an increased blood supply in the kidneys and neoangiogenesis, which reduced the effects of ischemia.

A single injection of the experimental drug bFGF at a dose of 5 µg in the model of chronic segmental renal ischemia for 3-4 months completely prevented the development of initial sclerotic and atrophic changes, that developed in the kidney during this period under the influence of chronic ischemia without bFGF. A single injection of prolonged-acting experimental drug bFGF at a dose of 5 µg in the model of chronic segmental renal ischemia for 5-8 months prevented expressed sclerotic and atrophic changes, that developed under the influence of chronic ischemia during this period without the use of bFGF.

As a result of biochemical studies, the activation and normalization of indicators of renospecific tubular enzymes in the ischemic kidney under the action of the created experimental drug bFGF were determined.

**Conclusions.** Therapy of ischemic changes in the kidney with the developed injectable long-acting drug bFGF at a dose of 5 µg in the experimental model of chronic ischemia protects the organ from hypoxic damage, has a positive effect on the structural and functional state and metabolism of the kidney, and prevents the development of nephrosclerosis.

**Keywords:** chronic kidney ischemia, basic fibroblast growth factor, vascular coefficient, interstitial coefficient, enzymes.

**Conflict of interest statement.** The authors declare no competing interest.

© S. Bazalytska, G. Nikulina, V. Kordium, I. Dubey, S. Vozianov, A. Romanenko, Ia. Pokholenko, S. Nikitaev, I. Serbina, L. Mygal, O. Vozianov, 2022.

Correspondence should be addressed to Svitlana Bazalytska: [bsvua@i.ua](mailto:bsvua@i.ua)

## Article history:

Received June 08, 2022

Received in revised form

July 07, 2022

Accepted July 11, 2022



© Базалицька С. В., Нікуліна Г. Г., Кордюм В. А., Дубей І. Я., Возіанов С. О., Романенко А. М., Похолєнко Я. О., Нікітаєв С. В., Сєрбіна І. Є., Мигаль Л. Я., Возіанов О. Ф., 2022

УДК 616.61-005.4-085-092.9

С.В. Базалицька<sup>1</sup>, Г.Г. Нікуліна<sup>1</sup>, В.А. Кордюм<sup>2</sup>, І.Я. Дубей<sup>2</sup>, С.О. Возіанов<sup>1</sup>, А.М. Романенко<sup>1</sup>, Я.О. Похолєнко<sup>2</sup>, С.В. Нікітаєв<sup>1</sup>, І.Є. Сєрбіна<sup>1</sup>, Л.Я. Мигаль<sup>1</sup>, **О.Ф. Возіанов<sup>1</sup>**

## Експериментальна терапія хронічної ішемії нирки з використанням препарату основного фактору росту фібробластів

<sup>1</sup>ДУ «Інститут урології імені академіка О.Ф.Возіанова» НАМН України, м. Київ, Україна

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ, Україна

**Резюме.** Метою роботи було вивчити в експерименті дію створеного ін'єкційного препарату основного фактору росту фібробластів (bFGF) із контрольованим вивільненням на морфологічні зміни та показники реноспецифічних ферментів в ішемізованій нирці (експеримент на кролях).

**Матеріал та методи.** Проводились дослідження динаміки вивільнення створеного ін'єкційного препарату bFGF *in vitro* та дослідження індукції ангиогенезу bFGF на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати. Експериментальна модель виконана на 25 кролях: у 10 кролів вивчали вплив на нирку 1-8 місяців «чистої ішемії» без введення препарату (контроль); у 12 кролів через 1 місяць після моделювання ішемії в паренхіму нирки ін'єкційним шляхом вводився препарат bFGF з пролонгованою дією, депонований на створеному нами полімерному носії в дозі 5 мкг (дослід). Референтна група складалась із 3-х інтактних кролів. Проводились гістологічні дослідження ниркової тканини та морфометричні дослідження з визначенням судинного коефіцієнту (СК) та інтерстиційного коефіцієнту (ІК). Біохімічними методами визначались ензимологічні показники активності ферментів у гомогенаті паренхіми нирок; проводився статистичний аналіз.

**Результати.** Попередньо на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати було продемонстровано, що розроблений препарат bFGF з пролонгованою дією, депонований на полімерному носії на основі зшитого модифікованого гепарину, ефективно посилює неоангіогенез.

**Результати морфологічних та морфометричних досліджень** із визначенням судинного та інтерстиціального коефіцієнтів показали, що ін'єкційне введення препарату bFGF з пролонгованою дією в усіх випадках супроводжувалося посиленням кровопостачання в нирках і явищами неоангіогенезу, що зменшували наслідки ішемії.

Одноразове введення препарату bFGF в дозі 5 мкг при моделюванні хронічної сегментарної ішемії нирки протягом 3-4 місяців повністю запобігло розвитку початкових склеротичних і атрофічних змін, які розвивались в нирці у ці строки під впливом хронічної ішемії без застосування препарату bFGF. Ін'єкційне одноразове введення експериментального препарату bFGF з пролонгованою дією в дозі 5 мкг при моделюванні хронічної ішемії нирки протягом 5-8 місяців запобігало виразним склеротичним та атрофічним змінам, які розвивались під впливом хронічної ішемії у ці строки без застосування препарату bFGF.

В результаті біохімічних досліджень визначено активізацію і нормалізацію показників реноспецифічних каналцевих ензимів в ішемізованій нирці під дією створеного експериментального препарату bFGF.

**Висновки.** Продемонстровано ефективність терапії ішемічних змін нирок з використанням розробленого ін'єкційного препарату пролонгованої дії bFGF у дозі 5 мкг в умовах експериментальної моделі хронічної ішемії, що захищає від гіпоксичного ураження орган, позитивно впливає на структурно-функціональний стан та метаболізм нирки та запобігає розвитку нефросклерозу.

**Ключові слова:** Хронічна ішемія нирки, основний фактор росту фібробластів, судинний коефіцієнт, інтерстиціальний коефіцієнт, ензими.

**Вступ.** Хронічна ішемія нирки є складовою патогенезу більшості захворювань нирок як вродженої (вади верхніх сечових шляхів), так і набутої (сечокам'яна хвороба, хронічна ренальна гіпер-

тензія, пієлонефрит, гломерулонефрит) етіології. Саме тому, корекція ішемічних розладів займає важливе місце у визначенні тактики лікування цих захворювань. Існуючі методи хірургічного лікування ішемічних станів, переважно, спрямовані на покращення кровообігу в нирковій артерії, але відновлення магістрального кровообігу далеко не завжди призводить до відновлення функціонального стану органу.

Одним із перспективних напрямків медикоментозної корекції ішемічних розладів, які розробляються, є метод індукції ангиогенезу шляхом

Базалицька Світлана Василівна

bsvua@i.ua

використання проангіогенних цитокінів [1]. Так, експериментальне використання основного фактору росту фібробластів (bFGF) при гострому інфаркті міокарда продемонструвало збільшення кількості мікросудин і покращення гемодинаміки в стінці серця, що запобігало склерозу міокарда [2, 3, 4]. Ці результати стали підґрунтям для вивчення впливу bFGF на ішемізовану нирку. В експериментальних роботах останніх років було продемонстровано, що при моделюванні гострої ішемії нирки введення bFGF в паренхіму нирки прискорює процеси регенерації ниркової тканини і зменшує її ушкодження [5, 6]. Проте, питання фармакологічної корекції хронічних ішемічних станів нирки досі залишаються недослідженими та відкритими для подальшого вивчення.

Однією з основних проблем, що виникають при застосуванні проангіогенних цитокінів для індукції неоангіогенезу в ушкодженій тканині, є нерівномірний розподіл терапевтичних доз білків по тканинах та органах при їх системному введенні. Для цих білків характерним є швидкий кліренс у поєднанні з вузькими концентраційними межами дії: висока концентрація є токсичною, а низька – не ефективною. Вирішення цієї проблеми може полягати у застосуванні носіїв, які відповідатимуть за локальну доставку терапевтичних макромолекул проангіогенних цитокінів безпосередньо в орган-мішень, що забезпечить високий терапевтичний ефект при одночасному зниженні кількості та інтенсивності побічних ефектів. Спрямована локальна доставка терапевтичних засобів може досягатися за рахунок їх ковалентного чи нековалентного приєднання до певних біосумісних полімерних носіїв [7, 8].

**Мета роботи:** вивчити в експерименті дію створеного ін'єкційного препарату основного фактору росту фібробластів bFGF із контрольованим вивільненням на морфологічні зміни та показники реноспецифічних ферментів в ішемізованій нирці (експеримент на кролях).

**Матеріал та методи.** У роботі використовували рекомбінантний bFGF людини виробництва Інтерфармбіотек (Україна), гепарин виробництва Applichem (Німеччина), 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімідгідрохлорид та дигідрозид адипінової кислоти виробництва Merck (США). Полімерний гідрогель отримували шляхом зшивання гепарину за допомогою дигідрозиду адипінової кислоти, як було описано нами раніше [9].

*Дослідження динаміки вивільнення ін'єкційного препарату bFGF.* У фосфатно-сольовому буфері розчиняли bFGF до кінцевої концентрації 0,2 мг/мл. Протягом 30 хв 15-30 мг полімеру інкубували у фізіологічному розчині та обробляли ультразвуком. Згодом полімер занурювали у 2 мл розчину bFGF та інкубували при повільному обертанні протягом 1 години при + 22° С. Полімер двічі промивали у фізіологічному розчині та занурювали у 2 мл фізіологічного розчину, в якості середовища

для вивільнення. Зразки інкубували при +37°С. Через певні інтервали часу розчин змінювали на свіжий. Вміст bFGF у розчині та його залишок, приєднаний до полімеру, аналізували за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію [10]. Кількість bFGF у досліджуваних зразках визначали за допомогою денситометрії електрофореграм. Для цього після проведення розділення електрофорезом гелі фарбували Page Blue Protein Staining Solution (Thermo Scientific, США) відповідно до інструкцій виробника та документували за допомогою Chemi Doc™ XRS + (Bio-Rad) з подальшим аналізом у «Image Lab Software™» (Bio-Rad).

*Дослідження індукції ангіогенезу bFGF на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати.* Здатність створеного засобу bFGF індукувати ангіогенез *in vivo* досліджували на моделі хоріон-алантоїсної мембрани (chorion-allantoic membrane – CAM) курчат згідно методики Wilting J. et al. [11].

У контрольній групі точково крапельно на судину наносили гідрогелевий носій, який не містив bFGF; у дослідних групах – аналогічно наносили препарат, яких складався із гідрогелевого носія та bFGF у дозі 1 мкг та 10 мкг, відповідно. Візуалізацію судинної сітки проводили на 4 добу після крапельного нанесення препарату у контрольній та дослідній групах.

*Експериментальна модель.* Протокол досліджень на лабораторних тваринах було затверджено комітетом з біомедичної етики ДУ «Інститут урології НАМН України» (протокол №8 від 08.11.2013). Експериментальні дослідження на кролях було виконано відповідно до закону України №3447 «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції щодо «Захисту та гуманного поводження з хребетними тваринами, яких використовують для експериментів у наукових цілях» (Страсбург, 20.09.1985 р.).

В основу роботи покладено модель хронічної сегментарної ішемії, яка полягає в накладанні під час операційного втручання странгуляційної лігатури на межі верхнього та середнього сегменту лівої дослідної нирки кролів. Модель дає можливість уникнути повної втрати життєздатності нирки в умовах хронічного експерименту протягом 7-8 місяців.

Дослідження проводились на 25 кролях породи шиншила віком 2 роки вагою 2.5-3 кг. Експериментальну сегментарну ішемію лівої нирки моделювали під час хірургічної операції шляхом накладання лігатури «Вікріл-1» на межі верхньої третини лівої нирки до утворення странгуляційної борозни, як описано у [12]. Права нирка залишалася інтактною. У післяопераційному періоді проводили антибактеріальну терапію: «Біцилін-3» (Arterium, Україна) внутрішньом'язово 50000 од. на 1 кг ваги. На 6-7 день видаляли лігатури, накладені на шкірні краї операційної рани кроля.

У 10 кролів вивчали вплив на нирку 1-8 місяців «чистої ішемії» без введення bFGF (контроль).

У 12 кролів, через 1 місяць після моделювання ішемії нирки в її паренхіму під УЗД-контролем ін'єкційним шляхом через шкіру вводився рекомбінантний bFGF людини в дозі 5 мкг, депонований на створеному нами полімерному носії, суспендованому у 0.2 мл фізіологічного розчину (дослід).

Референтна група складалась з 3-х здорових інтактних кролів.

Тварин виводили з експерименту через 1-8 місяців після моделювання ішемії у відповідні строки та видаляли нирки для подальших досліджень.

*Морфологічні та морфометричні дослідження.* Гістологічно досліджували обидві нирки кожної тварини експериментальної моделі із контрольної, дослідної та референтної груп. Для гістологічного дослідження матеріал фіксували у 10% забуференому формаліні і заливали у парафін. Парафінові зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином та за Ван-Гізеном і вивчали у світловому мікроскопі «Olympus BX-100».

Морфометричні дослідження проводили з використанням системи аналізу зображень та комп'ютерної програми «Quickphoto MICRO 2,2-R0008.jpg». Використовуючи об'єктив із збільшенням  $\times 20$ , підраховували середню кількість перитубулярних гемокапілярів в інтерстиції коркової речовини нирки в квадраті на площі  $100 \text{ мкм}^2$  і визначали судинний коефіцієнт (СК). У кожному випадку обраховували 120 таких квадратів і виводили середнє значення показника СК. Крім того, підраховували питому площу строми коркової речовини органу щодо паренхіми і виводили інтерстиціальний коефіцієнт (ІК) за формулою  $ІК = A/B$ , де А – площа, займана інтерстиціальною сполучною тканиною у полі зору мікроскопа при збільшенні  $\times 200$  ( $1414410 \text{ мкм}^2$ ); В – площа паренхіми нирки у цій же ділянці коркової речовини при загальному збільшенні  $\times 200$  ( $1414410 \text{ мкм}^2$ ). У кожному випадку проводили вимірювання на 5 таких ділянках коркової речовини нирки і виводили середнє значення показника ІК для кожної досліджуваної групи. Достовірними вважали показники і відмінності при  $p < 0,5$ .

*Біохімічні дослідження.* Ензимологічне дослідження проводили в гомогенаті тканини коркового шару верхнього полюсу нирки. Було сформовано три групи: група 1 – матеріал коркового шару нирки 3х інтактних кролів (6 нирок); група 2 – матеріал коркового шару верхнього полюсу лівої ішемізованої нирки кролів з експериментально змодельованою ішемією; група 3 – матеріал коркового шару верхнього полюсу лівої ішемізованої нирки кролів з аналогічним терміном хронічної ішемії нирки, в яку транскутанно вводили 5 мкг bFGF, адсорбованого на полімерному носії.

В гомогенаті тканини коркового шару нирок визначали активність ензимів, локалізованих в клітинах епітелію проксимальних каналців нефрону: лізосомних ферментів нефротелію  $\beta$ -галактозидази ( $\beta$ -ГАЛ, КФ 3.2.1.23) та N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази (НАГ, КФ 3.2.1.30); лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1.); гамма-глутамілтранспептидази (ГТП, КФ 2.3.2.2); нейтральної (НГ) та кислої (КГ) альфа-глюкозидаз (КФ 3.2.1.20). Активність НАГ та  $\beta$ -ГАЛ визначали за розробленим методом [13] і вимірювали в мкмоль пара-нітрофенолу, утвореному за годину інкубації при  $37^\circ\text{C}$  у перерахунку на 1 г сирової тканини мкмоль/(год  $\times$  г). Активність ЛФ та ГТП досліджували за допомогою наборів реактивів («Реагент» або «Філісіт-Діагностика») для визначення цих ензимів у крові відповідно до інструкції, попередньо розбавивши гомогенат у 20 разів для ЛФ, і 50 – для ГТТ. Активність НГ та КГ вивчали у розведеному в 50 разів гомогенаті за швидкістю приросту кількості глюкози в пробі при розщепленні мальтози (використовували відповідно нейтральний 0,2 М фосфатний буфер з рН 6,5 та кислий 0,2 М ацетатний буфер з рН 4,5), при цьому вміст глюкози визначали глюкозооксидазним методом за допомогою наборів реактивів. Активність ферментів ЛФ, ГТП, НГ та КГ вимірювали колориметрично і визначали в нмоль/(с  $\times$  г).

*Статистичний аналіз.* Розрахунки виконувались за допомогою програми MaxStatLite (Німеччина). Достовірність різниці (p) між показниками визначалась за допомогою критеріїв Манна-Уїтні (U) та Стьюдента (t).

**Результати.** *Дослідження динаміки вивільнення ін'єкційного препарату bFGF.* Проведені дослідження динаміки вивільнення створеного ін'єкційного препарату bFGF свідчать про те, що bFGF протягом 4 діб поступово десорбується з полімерного гідрогелю. При цьому, як і у випадку препарату bFGF, раніше створеного у формі колагенового скафолду для місцевого застосування [9], має місце двофазний характер вивільнення bFGF із полімерного носія. Протягом первинної фази у перші 6 годин інкубації (фаза швидкого вивільнення) десорбувалось майже  $60 \pm 3,5\%$  bFGF, на 90 годину (фаза поступового вивільнення) цей показник становив  $83 \pm 6,43\%$ .

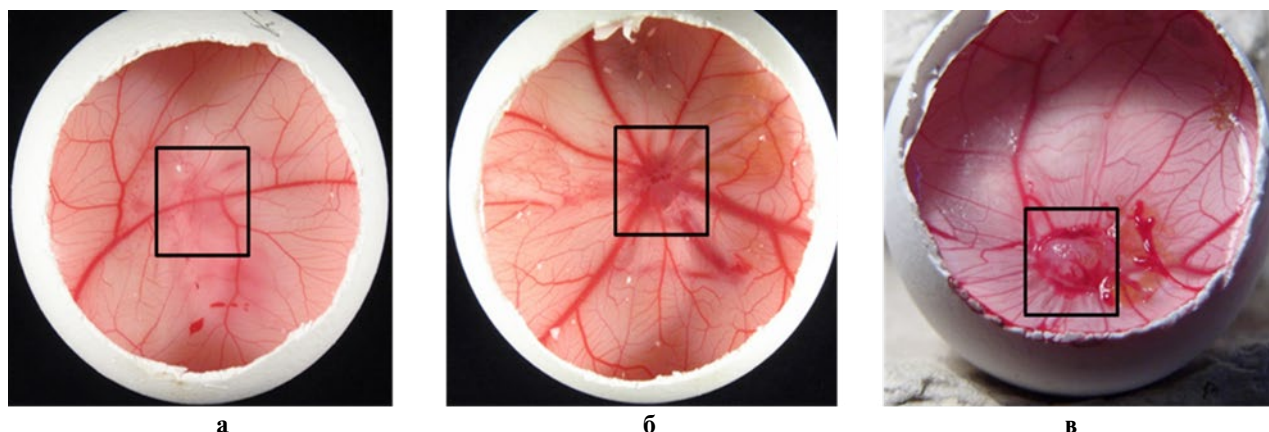
*Дослідження індукції ангиогенезу bFGF на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати.* Загальний вплив створеного bFGF на ангиогенез попередньо вивчали на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати.

На 4 добу після точкового крапельного нанесення гідрогелевого носія без bFGF у контрольній групі не відбувалося утворення відгалужень від кровоносної судини, на яку наносили препарат (Рис.1а).

У двох дослідних групах, в яких наносився препарат, що складався з гідрогелевого носія із адсорбованим bFGF у дозі 1 мкг та 10 мкг, на 4 добу

після нанесення спостерігалось, відповідно, слабке (Рис.1б) та виразне (Рис.1в). утворення гемокапі-

лярів, які відгалужувалися від основної кровоносної судини, на яку наносили препарат.



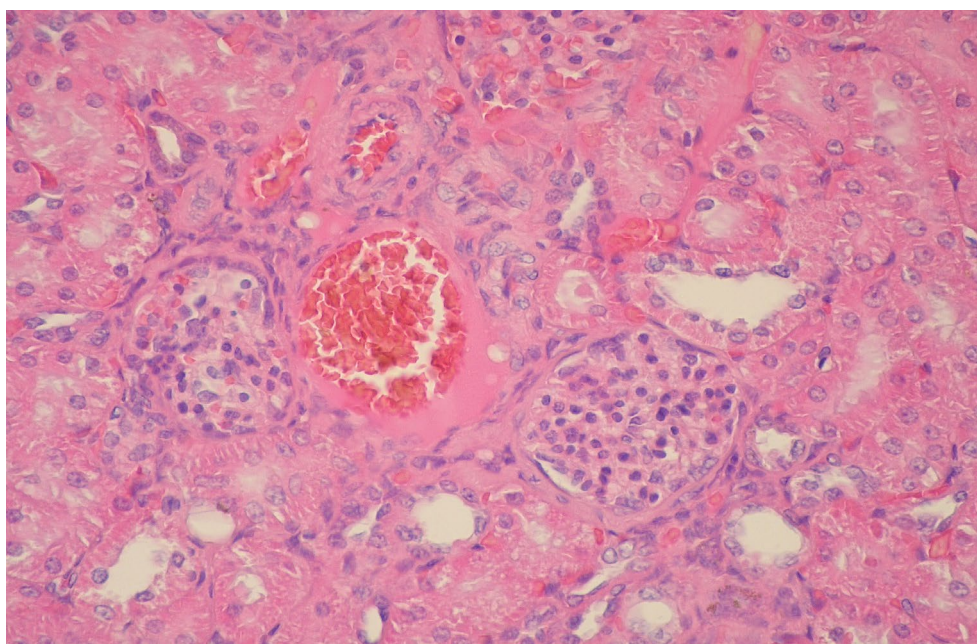
**Рис 1. Індукція ангиогенезу bFGF на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати на 4 добу після крапельного нанесення препарату (місця нанесення позначені квадратами):**

- а – контрольна група: відсутність судинних відгалужень при нанесенні гідрогелевого носія без bFGF;
- б – слабке утворення гемокапілярів при нанесенні препарату (гідрогелевий носій +1 мкг bFGF);
- в – виразне утворення гемокапілярів при нанесенні препарату (гідрогелевий носій+10 мкг bFGF)

Тобто, застосування препарату bFGF в діапазоні від 1 мкг та 10 мкг на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати призводило до індукції ангиогенезу від слабких проявів до виразних.

*Результати морфологічних та морфометричних досліджень.* Морфологічне дослідження нирок контрольної групи через 1-2 місяці після моделювання сегментарної ішемії продемонструвало наявність в ішемізованій нирці порушень кровообігу у вигляді дилатації судин – нерівномірного роз-

ширення їх просвітів, повнокров'я й численних дрібних еритростазів, іноді – тромбозів та крововиливів. Крім того, визначались дрібні осередки периваскулярної лімфоїдноклітинної інфільтрації строми та слабок виражені дистрофічні зміни епітеліальних клітин проксимальних каналців. При цьому, явища склерозування інтерстицію та атрофії елементів паренхіми нирки були відсутні (Рис. 2). Показники інтерстиціального коефіцієнту ІК становили  $0,1 \pm 0,02$  (Таблиця 1).



**Рис. 2. Ішемія нирки протягом 2 місяців.** Дилатація перитубулярних капілярів, еритростази, тромбози судин, дистрофічні зміни клітин проксимальних каналців. Зафарбування гематоксилін-еозином.  $\times 200$ .

Таблиця 1

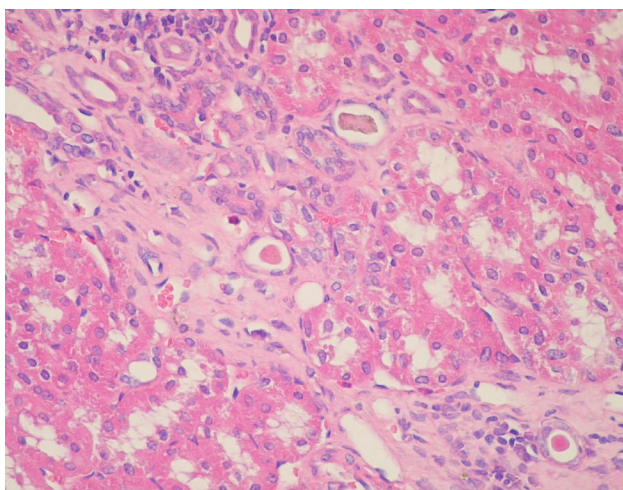
## Показники судинного та інтерстиціального коефіцієнтів нирок досліджуваних тварин

Морфометричні показники	Ішемія нирки (тривалість)						Інтактні кролі
	1-2 міс.	1-2 міс. + bFGF	3-4 міс.	3-4 міс. + bFGF	5-8 міс.	5-8 міс. + bFGF	
СК	1,2±0,1	1,3±0,2	1,1±0,3*	2,1±0,3*	0,8±0,1**	2,9±0,16** ***	1,3±0,2***
ІК	0,1±0,02	0,05±0,02	0,25±0,15*	0,07±0,02*	0,39±0,12**	0,08±0,03**	0,05±0,01

\*, \*\*, \*\*\* – достовірно між групами

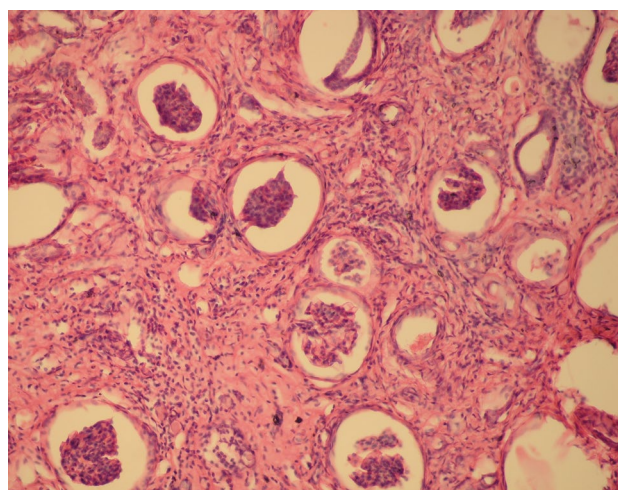
Скорочення: ІК – інтерстиціальний коефіцієнт, СК – судинний коефіцієнт.

При ішемії тривалістю 3-4 місяці в нирці контрольної групи виявлялись дрібні та помірного розміру осередки склерозу інтерстицію та численні вогнища помірно вираженої лімфоїдноклітинної інфільтрації строми, на фоні чого спостерігались невеликі ділянки з ознаками атрофії канальцевого епітелію. Визначались помірно виражені дистрофічні зміни епітелію, переважно, проксимальних і в меншій мірі – дистальних канальців (Рис. 3). Показники ІК становили  $0,25 \pm 0,15$  (див. таблицю 1).



**Рис. 3. Ішемія нирки протягом 4 місяців.** Розширення інтерстицію, дрібні осередки склерозу, вогнищева лімфоїдноклітинна інфільтрація, слабка атрофія канальців, дистрофічні зміни клітин канальцевого епітелію. Зафарбування гематоксилін-еозином.  $\times 200$ .

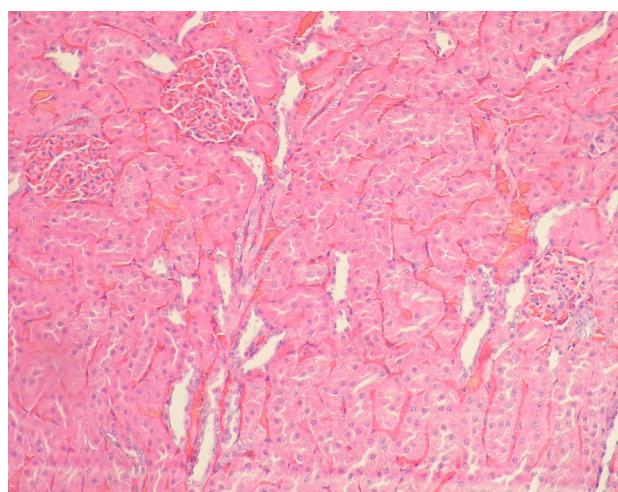
При ішемії тривалістю 5-8 місяців у контрольній групі в нирці спостерігались явища нефросклерозу: багаточисельні помірні та поширені ділянки склерозування інтерстицію з ознаками помірної дифузної лімфогістіоцитарної інфільтрації, на фоні яких мали місце виразні явища атрофії канальцевого епітелію, виразні дистрофічні зміни епітелію проксимальних і дистальних канальців та склеротичні зміни клубочків. У перитубулярних гемокапілярах визначались ознаки склерозування стінки судин (Рис. 4). Показники ІК становили  $0,39 \pm 0,12$  (див. таблицю 1).



**Рис. 4. Ішемія нирки протягом 7-8 місяців.**

Склерозування інтерстицію, дифузна лімфогістіоцитарна інфільтрація строми, атрофія канальців, склерозування стінки перитубулярних судин та клубочків. Зафарбування гематоксилін-еозином.  $\times 100$ .

При застосуванні експериментального препарату bFGF в дозі 5 мкг після 1-2 місяців ішемії нирки спостерігалось виразне повнокров'я перитубулярних та гломерулярних капілярів (Рис. 5). Показник судинного коефіцієнту становив  $1,2 \pm 0,1$ .



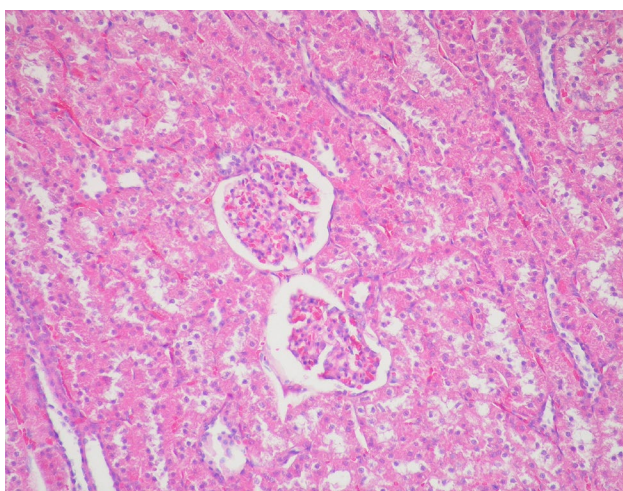
**Рис. 5. Ішемія нирки протягом 2 місяців + 5 мкг bFGF.**

Виразне повнокров'я гломерулярних та перитубулярних гемокапілярів. Зафарбування гематоксилін-еозином.  $\times 100$ .

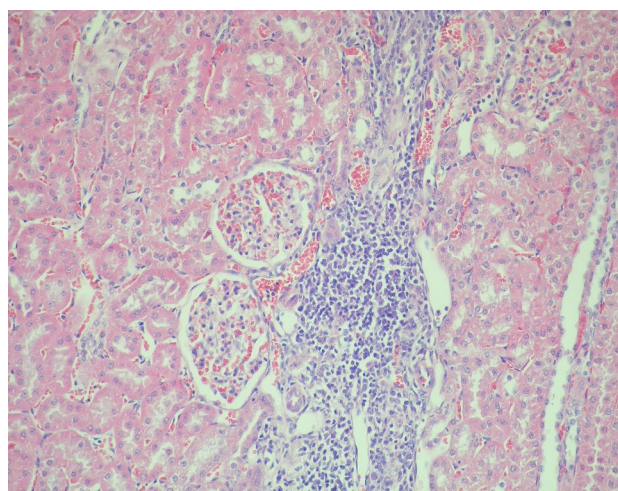
При ін'єкційному введенні експериментального препарату bFGF в дозі 5 мкг після 3-4 місяців ішемії нирки спостерігались досить виразне повнокров'я більшості перитубулярних та гломерулярних капілярів та явища неоангіогенезу, про що свідчить підвищений показник СК, який становив  $2,1 \pm 0,3$  (див. таблицю 1). Спостерігалась незначна дрібновогнищева периваскулярна лімфоїдно-клітинна інфільтрація стромы. Ознаки фіброзу та склеротичні зміни інтерстицію нирки були повністю відсутні і в цілому паренхіма нирки виглядала збереженою (Рис. 6). Показник інтерстиціального коефіцієнту (ІК) становив  $0,07 \pm 0,02$ .

При ін'єкційному введенні експериментального препарату bFGF з пролонгованою дією в дозі 5 мкг через 5-8 місяців після моделювання хро-

нічної сегментарної ішемії в нирці спостерігались осередки незначного розширення інтерстицію та рідко – дрібні осередки фіброзу, а також помірно- і дрібновогнищева лімфогістіоцитарна інфільтрація стромы, на фоні яких, хоча й виявлялись невеликі осередки атрофії каналцевого епітелію, більшість ниркових каналців були повністю збережені, або з незначними дистрофічними змінами епітеліальних клітин. Спостерігалось також посилення кровопостачання органу: досить виразне повнокров'я більшості перитубулярних та гломерулярних капілярів та явища неоангіогенезу, показники СК досягли  $2,9 \pm 0,16$ . В цілому паренхіма нирки виглядала досить збереженою без виразних склеротичних та атрофічних змін (Рис. 7), показники ІК становили  $0,08 \pm 0,03$  (див. таблицю 1).



**Рис. 6. Ішемія нирки протягом 4 місяців + 5 мкг bFGF.**  
Повнокров'я гломерулярних та чисельних перитубулярних гемокапілярів, дистрофічні зміни клітин каналцевого епітелію. Зафарбування гематоксилін-еозином.  $\times 100$ .



**Рис. 7. Ішемія нирки протягом 8 місяців + 5 мкг bFGF.**  
Повнокров'я гломерулярних та перитубулярних гемокапілярів, помірно вогнищева лімфогістіоцитарна інфільтрація, незначне розширення інтерстицію, слабка атрофія каналців. Зафарбування гематоксилін-еозином.  $\times 100$

*Результати біохімічних досліджень.* Ензимологічні показники активності ферментів у гомогенаті

паренхіми нирок кролів в залежності від умов експерименту представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

**Ензимологічні показники в гомогенаті паренхіми нирок кролів (M ± m)**

Групи	Активність ферментів в гомогенаті паренхіми нирок кролів					
	β-ГАЛ	НАГ	ЛФ	ГГТП	НГ	КГ
	мкмоль/(год × г)		нмоль/(с × г)			
Група 1 (інтактні кролі)	18,4±1,1	118,5±3,2	442,9±24,3	750,7±47,6	266,3±16,9	148,0±10,7
Група 2 (ішемія 5-8 міс.)	13,3±0,8	64,9 ± 2,2	259,2±47,7	533,1±104,2	101,1±21,6	52,6±10,5
Група 3 (ішемія 5-8 міс. + 5 мкг bFGF)	19,41±0,7	83,8 ± 3,4	326,2±34,3	610,1±67,1	137,1±19,1	97,9±12,4

Скорочення: β-ГАЛ – β-галактозидаза, НАГ – N-ацетил-β-D-глюкозамінідаза, ЛФ – лужна фосфатаза, ГГТП – γ-глутамілтранспептидаза, НГ – нейтральна α-глюкозидаза, КГ – кисла α-глюкозидаза

Встановлено, що активність  $\beta$ -ГАЛ в паренхімі нирки кролів при хронічній ішемії протягом 5-8 місяців достовірно знизилась на 27,7% від цього показника у здорових інтактних тварин з  $18,4 \pm 1,1$  до  $13,3 \pm 0,8$  ( $p < 0,001$ ). Застосування препарату bFGF призвело до відновлення активності даного ферменту до  $19,41 \pm 0,7$  ( $p < 0,001$ ).

Активність НАГ в умовах хронічної ішемії достовірно зменшилась на 45,2% з  $118,5 \pm 3,2$  до  $64,9 \pm 2,2$  ( $p < 0,001$ ), а під дією препарату bFGF цей показник достовірно підвищився на 22,5% до  $83,8 \pm 3,4$  ( $p < 0,01$ ).

Визначено, що активність ЛФ, ГТП, НГ та КГ при хронічній ішемії нирки впродовж 5-8 місяців достовірно знизилась порівняно із показниками у здорових інтактних кролів, відповідно: ЛФ на 41,5% – з  $442,9 \pm 24,3$  до  $259,2 \pm 47,7$ ; ГТП на 29% – з  $750,7 \pm 47,6$  до  $533,1 \pm 104,2$ ; НГ на 62,3% – з  $266,3 \pm 16,9$  до  $101,1 \pm 21,6$ ; КГ на 86,1% – з  $148,0 \pm 10,7$  до  $52,6 \pm 10,5$  ( $p < 0,01-0,001$ ).

У групі 3 після введення 5 мкг експериментального препарату bFGF в дослідних нирках спостерігалось статистично вірогідне зростання рівня активності КГ на 64,5% з  $52,6 \pm 10,5$  до  $97,9 \pm 12,4$  в порівнянні з чистою ішемією ( $p < 0,01$ ). Також виявлена виразна тенденція в напрямку відновлення активності ГТП, ЛФ та НГ – зареєстровано зростання активності цих ферментів відносно показників групи 2 відповідно: ГТП до  $610,1 \pm 67,1$  на 14,4%; ЛФ до  $326,2 \pm 34,3$  на 25,9% та НГ до  $137,1 \pm 19,1$  на 35,6% (див. таблицю 2).

**Обговорення.** Для ефективної фармакологічної корекції наслідків хронічної ішемії та індукції неангіогенезу в паренхімі ішемізованого органу необхідно забезпечити надходження препарату bFGF протягом тривалого часу безпосередньо у зону ішемії. Згідно даних літератури, при експериментальному інфаркті міокарда парентеральне введення bFGF не здатне забезпечити відновлення кровотоку в паренхімі серця [14], у той час, як введення фактору росту FGF-1, інкорпорованого у фібриновий гель, безпосередньо в ішемізовану тканину, призводить до індукції неангіогенезу [15].

Для доставки bFGF в ішемізовану ділянку ми використали полімерний носій, створений на основі зшитого модифікованого гепарину, який завдяки поліаніонному характеру молекули, здатен нековалентно зв'язувати bFGF. У попередній роботі нами було розроблено зручний протокол для одержання такого полімерного носія, який базується на реакції гепарину з відомим біфункціональним реагентом – дигідрозидом адипінової кислоти, у присутності водорозчинного карбодіміду у водному середовищі при слабо кислому рН [9].

Раніше також були проведені дослідження адсорбції та динаміки вивільнення препарату bFGF, створеного у формі колагенового скафолду для місцевого застосування, який складався із bFGF, гідрогелю на основі зшитого модифікованого гепари-

ну, в якості носія, та колагенового матриксу. Було встановлено, що за цих умов гідрогель на основі зшитого модифікованого гепарину здатен адсорбувати рекомбінантний bFGF людини, середня ємність носія при цьому становила  $10,4 \pm 2,047$  мкг/мг гідрогелю [9].

Але, інкорпорація носія у пористу матрицю з колагену може змінювати властивості кінцевого препарату bFGF. Це підтвердили проведені в даній роботі дослідження динаміки вивільнення створеного ін'єкційного препарату bFGF, які продемонстрували, що вивільнення bFGF із полімеру має такий самий двофазний характер, як і у формі колагенового скафолду, але, із чистого полімеру десорбція проходить швидше: з чистого полімеру за перші шість годин інкубації (фаза швидкого вивільнення) вивільняється  $60 \pm 3,5\%$  bFGF, у той час, як із носія, інкорпорованого у колагенову матрицю – менше 40% [9].

Отримані дані про динаміку вивільнення ін'єкційного препарату bFGF є важливими, як для аналізу результатів експериментального дослідження, так і для подальшого вивчення фармакодинаміки отриманого експериментального препарату. Відповідно до зміни характеристик носія bFGF, необхідно було підтвердити, що створений ін'єкційний комплекс має проангіогенну активність.

Попередньо проведені в даній роботі дослідження створеного препарату bFGF на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати, згідно методики Wilting J. et al. [11], продемонстрували, що bFGF, який було адсорбовано на полімерному носії, здатен індукувати ангіогенез.

Крім того, використання препарату bFGF в діапазоні від 1 мкг до 10 мкг на хоріон-алантоїсній моделі було нами застосовано як необхідний інструмент стандартизації, який дозволив визначити умовні дози препарату bFGF, що призводять до реакції у вигляді індукції ангіогенезу – від початкових проявів до надмірних, оскільки, як показали попередні дослідження, надмірно висока концентрація препарату bFGF може бути токсичною [16], а занадто низька – не ефективною.

В подальшому створену композицію ін'єкційного препарату bFGF ми застосовували на експериментальній моделі хронічної ішемії нирки кроля в досліді *in vivo* для терапії наслідків хронічної ішемії, обравши середній показник, що лежить в межах діапазону між 1 мкг та 10 мкг – дозу 5 мкг bFGF.

Морфологічні дослідження та аналіз стану нирок спочатку були проведені у групі експериментальних тварин при різних термінах ішемії без застосування терапії, які вивчались для розуміння наслідків хронічної ішемії.

В результаті аналізу визначено такі послідовні етапи розвитку патогістологічних змін нирки в залежності від строку ішемії:

I етап – дистрофічних змін клітин, які відбуваються в нирці під впливом ішемії протягом 1-2 місяців. Характеризується порушенням кровообігу у вигляді дилатації судин, повнокров'я, еритростазів та слабкою лімфоїдноклітинною інфільтрацією строми, на фоні яких виявляються дистрофічні зміни клітин паренхіми нирки;

II етап – початкових склеротичних і атрофічних змін, які відбуваються в нирці під впливом ішемії протягом 3-4 місяців. Характеризується появою осередків фіброзу і склерозу інтерстицію, потовщенням стінок частини судин, на фоні чого виникають початкові явища атрофії епітелію ниркових каналців;

III етап – виразних склеротичних і атрофічних змін, які відбуваються в нирці під впливом 5-8 місяців ішемії. Характеризується явищами нефросклерозу – поширеними склеротичними змінами інтерстицію та судин, на фоні яких розвиваються виразні деструктивні зміни та атрофія клітинних елементів ниркової паренхіми.

Отримані нами результати в цілому відповідають і даним літератури, згідно яких короткотривала ішемія призводить до помірного ушкодження ниркових каналців, яке може регресувати після завершення гострої фази [17], а довготривала ішемія може спричиняти значне ушкодження ниркових каналців, що в подальшому призводить до фіброзу ниркової паренхіми. Але, основною експериментальною моделлю, яка використовувалась в інших дослідженнях, була модель гострої ішемії нирки, тому, послідовність і поетапність цих процесів при хронічній ішемії була не відома.

Ми зосередили свою увагу на можливості корекції саме на етапах розвитку склеротичних змін – початкових і виразних (II та III етапи), які розвиваються в нирці під впливом хронічної ішемії впродовж 3-8 місяців та призводять до нефросклерозу.

Було продемонстровано, що введення експериментального препарату bFGF в дозі 5 мкг при моделюванні хронічної сегментарної ішемії нирки протягом 3-4 місяців повністю запобігло розвитку склеротичних змін строми і судин та атрофії клітинних елементів ниркової паренхіми, які розвивались в нирці під впливом хронічної ішемії без застосування препарату bFGF – про це свідчать показники ІК у цих групах, які достовірно відрізнялись між собою:  $0,25 \pm 0,15$  – без застосування bFGF, та  $0,07 \pm 0,02$  – при застосуванні препарату.

Застосування експериментального препарату bFGF у дозі 5 мкг при моделюванні хронічної сегментарної ішемії нирки протягом 5-8 місяців в результаті посилення неоангіогенезу та кровопостачання органу, значно зменшувало виразні склеротичні зміни строми і судин та запобігало виразній атрофії елементів ниркової паренхіми, які розвивались під впливом хронічної довготривалої ішемії без застосування препарату bFGF. Ці процеси яскраво демонструють розроблені морфоме-

тричні показники – судинний коефіцієнт (СК) та інтерстиціальний коефіцієнт (ІК). Так, СК, який відображає кількість судин на одиницю площі, в цій групі збільшився у 3,6 рази – з  $0,8 \pm 0,1$  при «чистій» ішемії до  $2,9 \pm 0,16$  при застосуванні bFGF. А ІК, що демонструє питому площу, яку займає інтерстицій, зменшився у даній групі майже у 4,9 рази – з  $0,39 \pm 0,12$  при «чистій» ішемії до  $0,08 \pm 0,03$  при застосуванні bFGF.

Демонстративним є порівняння морфометричних показників СК та ІК між групами здорових інтактних тварин та при хронічній ішемії протягом 5-8 місяців при застосуванні препарату bFGF. Значення ІК між цими групами достовірно не відрізнялися і становили  $0,05 \pm 0,01$  та  $0,08 \pm 0,03$  відповідно; при цьому, показник СК при застосуванні терапії препаратом bFGF при хронічній ішемії протягом 5-8 місяців, порівняно із СК інтактних тварин був збільшений у 2,2 рази та становив  $2,9 \pm 0,16$  проти  $1,3 \pm 0,2$ , що свідчить про посилений ангіогенез (див. таблицю 1).

Таким чином, встановлено позитивний ефект впливу експериментального препарату bFGF на ішемізовану тканину нирки у вигляді посилення ангіогенезу і, відповідно – зменшення наслідків ішемії. Отримані результати дозволяють припустити наявність у розробленого препарату bFGF «пускового» механізму, коли дія одноразового введення тривалий час зберігається та впливає на віддалені результати ішемії органу через 5-8 місяців. Крім того, сімейство FGF – це ростові гепаринзв'язуючі молекули, які виходять із клітини тільки при наявності так званого чинника «потреби» – при травмі або при ішемії [16].

Необхідно підкреслити, що стимуляція новоутворення судин препаратом bFGF не викликала неопластичних змін клітин в жодному спостереженні.

В результаті проведених досліджень, можна зазначити, що застосування bFGF захищає гістологічну структуру нирок експериментальних тварин від наслідків хронічної ішемії, а саме – запобігає розвитку нефросклерозу та атрофії ниркової паренхіми.

Відомо, що усі ферменти нирок є чутливими до гіпоксії, але реакція каналцевого апарату нефрону є найбільш ранньою і тому найбільш інформативною. Отже, функціонально-метаболічні порушення в нирці, що спровоковані гіпоксією, можна виявити при дослідженні у тканині нирки активності ферментів каналцевого епітелію. Діагностично значущим є дослідження в нирці активності лізосомних гідролаз  $\beta$ -ГАЛ та НАГ, що розташовані переважно в епітелії проксимальних каналців. Ці ферменти є близькими між собою у функціональному відношенні, але різними за ступенем зв'язку з мембраною цієї клітинної органели:  $\beta$ -ГАЛ розчинена в матриксі лізосом, а НАГ частково пов'язана з мембраною цієї органели [18].

Було визначено, що активність  $\beta$ -ГАЛ та НАГ в паренхімі нирки кролів при ішемії 5-8 місяців достовірно знизилась на 27,7% та 45,2 % від цього показника у здорових тварин ( $p < 0,001$ ). Застосування препарату bFGF призвело до відновлення активності цих ферментів ( $p < 0,001$ ).

Продемонстровано, що активність ЛФ, ГТП, НГ та КГ при порушенні гемодинаміки в паренхімі нирки впродовж 5-8 місяців достовірно знизилась відповідно на 41,5%, 29%, 62,3% та 86,1% від показників у здорових кролів ( $p < 0,01-0,001$ ). Тобто, найбільших змін при хронічній гіпоксії зазнає ланка обміну вуглеводів (НГ та КГ). Менше за цих умов страждає ланка обміну білків (ГТП), яка пов'язана з транспортом амінокислот через клітинну мембрану, що може свідчити про довготривале збереження функції реабсорбції амінокислот із сечі, що запобігає надмірній втраті білку при даній патології. При введенні 5 мкг bFGF в дослідних нирках спостерігались статистично вірогідне зростання рівня активності КГ на 64,5% в порівнянні з чистою ішемією ( $p < 0,01$ ), а також виразна тенденція відновлення активності ГТП, ЛФ та НГ – зростання активності цих ферментів відповідно на 14,4%, 25,9% та 35,6% (див. таблицю 2).

Представлені результати біохімічних досліджень вказують на суттєві зміни активності ензимів при хронічній ішемії нирки, які свідчать про гіпоксичне ураження паренхіми нирки та демонструють позитивний вплив експериментального препарату bFGF в дозі 5 мкг на метаболізм і функціональний стан нирки в умовах хронічної ішемії.

Таким чином, отримані результати морфологічних та біохімічних досліджень продемонстрували, що застосування препарату bFGF, адсорбованого на створеному полімерному носії, в нирках із експериментально змодельованою хронічною ішемією, забезпечує активізацію та відновлення внутрішньониркової гемодинаміки, сприяє захисту гістологічної структури та метаболізму нирки від наслідків гіпоксії та має позитивний вплив на функціональний стан органу в цілому. Відповідно отриманим експериментальним даним, ангіогенний стимулятор bFGF з пролонгованою дією є перспективним препаратом для розробки ефективної терапії ішемічних змін у нирках.

Дослідження можливостей застосування ангіогенного стимулятора bFGF при різних захворюваннях нами продовжуються. Зокрема, в останні роки на експериментальній моделі розсіяного склерозу (купризон-індукована модель демієлінізації) було продемонстровано, що введення bFGF у комплексі із стовбуровими мезенхімальними клітинами може покращувати показники поведінкової активності та знижувати рівень маркерів оксидативного стресу у тканині мозку [19, 20].

## Висновки:

1. На моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати продемонстровано, що розроблений експериментальний препарат bFGF з пролонгованою дією, депонований на полімерному носії на основі зшитого модифікованого гепарину, ефективно посилює неоангіогенез.
2. Результати морфологічних та морфометричних досліджень із визначенням судинного та інтерстиціального коефіцієнтів показали, що введення експериментального препарату bFGF з пролонгованою дією в усіх випадках супроводжувалося посиленням кровопостачання в нирках і явищами неоангіогенезу, що зменшували наслідки ішемії.
3. Одноразове введення препарату bFGF в дозі 5 мкг при моделюванні хронічної сегментарної ішемії нирки протягом 3-4 місяців повністю запобігло розвитку початкових склеротичних і атрофічних змін, які розвивались в нирці у ці строки під впливом хронічної ішемії без застосування препарату bFGF.
4. Ін'єкційне одноразове введення експериментального препарату bFGF з пролонгованою дією в дозі 5 мкг при моделюванні хронічної ішемії нирки протягом 5-8 місяців запобігало виразним склеротичним та атрофічним змінам, які розвивались під впливом хронічної ішемії у ці строки без застосування препарату bFGF.
5. В результаті біохімічних досліджень визначено активізацію і нормалізацію показників реноспецифічних каналцевих ензимів в ішемізованій нирці під дією створеного експериментального препарату bFGF.
6. Продемонстровано ефективність терапії ішемічних змін нирок з використанням розробленого ін'єкційного препарату bFGF пролонгованої дії у дозі 5 мкг в умовах експериментальної моделі хронічної ішемії, що захищає від гіпоксичного ураження орган, позитивно впливає на структурно-функціональний стан та метаболізм нирки та запобігає розвитку нефросклерозу.

**Конфлікт інтересів:** автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Джерело фінансування.** Дослідження виконано за підтримки НАН України (№ 2.2.4.23) та НАМН України (№0108U000435, №0111U002098).

## Інформація про внесок кожного учасника:

**С.В. Базалицька:** морфологічні та морфометричні дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення тексту статті;

**Г.Г. Нікуліна:** біохімічні дослідження, аналіз отриманих даних, написання біохімічного фрагменту;

**В.А. Кордюм:** концепція та дизайн дослідження, аналіз отриманих даних;

**І.Я. Дубей:** синтез полімерного носія на основі зшитого модифікованого гепарину;

**С.О. Возіанов:** розробка експериментальної моделі, аналіз отриманих даних;

**А.М. Романенко:** морфологічні дослідження, аналіз отриманих даних;

**Я.О. Похолодко:** розробка композицій на основі bFGF та полімерного носія на основі зшитого модифікованого гепарину, дослідження дина-

міки вивільнення bFGF та індукції ангиогенезу на моделі хоріон-алантоїсної мембрани курчати;

**С.В. Нікітасв:** експериментальна модель;

**І.Є. Сербіна:** біохімічні дослідження, аналіз отриманих даних, оформлення результатів;

**Л.Я. Мигаль:** біохімічні дослідження;

**О.Ф. Возіанов:** ідея, концепція та загальний план дослідження.

### Література (References):

1. Chade AR, Stewart N. Angiogenic cytokines in revascular disease: do they have potential for therapeutic use? *J. Am. Soc. Hypertens.* 2013;7(2):180–90. doi: 10.1016/j.jash.2013.01.004.
2. Iwakura A, Fujita M, Kataoka K, Tambara K, Sakakibara Y, Komeda M, et al. Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart Vessels.* 2003;18(2): 93–9. doi: 10.1007/s10380-002-0686-5.
3. Kawasuji M, Naqamine H, Ikeda M, Sakakibara N, Takemura H, Fujis S, et al. Therapeutic angiogenesis with intramyocardial administration of basic fibroblast growth factor. *Ann. Thorac. Surg.* 2000;69(4):1155–61. doi: 10.1016/S0003-4975(99)01557-X.
4. Kumagai M, Minakata K, Masumoto H, Yamamoto M, Yonezawa A, Ikeda T, et al. A therapeutic angiogenesis of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel sheets in a canine chronic myocardial infarction model. *Heart Vessels.* 2018;33(10):1251–7. doi: 10.1007/s00380-018-1185-6.
5. Villanueva S, Cespedes C, Gonzalez AA, Vio CP. bFGF induces an earlier expression of nephrogenic proteins after ischemic acute renal failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006;291:1677–87. doi: 10.1152/ajpregu.00023.2006.
6. Villanueva S, Cespedes C, Gonzalez AA, Roessler E, Vio CP. Inhibition of bFGF-receptor type 2 increases kidney damage and suppresses nephrogenic protein expression after ischemic acute renal failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008; 294(3):819–28. doi: 10.1152/ajpregu.00273.2007.
7. Vargason, AM, Anselmo AC, Mitragotri S. The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nat. Biomed. Eng.* 2021;5:951–67. doi: 10.1038/s41551-021-00698-w.
8. Jin H, Quesada C, Aliabouzar M, Kripfgans OD, Franceschi RT, Liu J, et al. Release of basic fibroblast growth factor from acoustically-responsive scaffolds promotes therapeutic angiogenesis in the hind limb ischemia model. *J Control Release.* 2021 Oct 10;338:773–83. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.09.013.
9. Pokholenko IaO, Chetyrkina MD, Dubey, LV, Dubey IYa, Moshynets OV, Sheludko EV, et al. Development and characterization of porous functionalized collagen scaffolds for delivery of FGF-2. *Biopolym. Cell.* 2014; 30:216–22. doi: 10.7124/bc.000899.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2 ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989, 1659 p.
11. Wilting J, Christ B, Bokeloh M. A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. *Anat. Embryol. (Berl).* 1991;183(3):259–71. doi: 10.1007/BF00192214.
12. Vozianov OF, Pyrohov VO, Zubko VI, Nikitaiev SV, Romanenko AM, Bazalytska SV, et al. In-t urolohii NAMN Ukrainy, patentovlasnyk. Sposib modeliuвання ishemii nyrky. Patent Ukrainy na korysnu model. № 65480. 2011 Hrud. 12. [In Ukrainian].
13. Pyrohov VO, Myhal LYa, Nikulina HH, Nikitaiev SV, Serbina IYe, vynakhidnyky; DU «In-t urolohii NAMN Ukrainy», patentovlasnyk. Sposib vyznachennia aktyvnosti N-atsetyl-β-D-hliukozaminidazy v parenkhimi nyrky. Patent Ukrainy na korysnu model № 83116, 2014 Serp. 27. [In Ukrainian].
14. Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Dadhanian DM, Thirumurti V, et al. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc. Res.* 1997;36(1):78–85. doi: 10.1016/S0008-6363(97)00142-9.
15. Schumacher B, Stegmann T, Pecher P. The stimulation of neoangiogenesis in the ischemic human heart by the growth factor FGF: first clinical results. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)* 1998; 39 (6): 783–9. PMID: 9972900.
16. Vozianov OF, Kordium VA, Pyrohov VO, Romanenko AM, Zubko VI, vynakhidnyky; DU «In-t urolohii NAMN Ukrainy», In-t molekuliarnoi biolohii i henetyky NAN Ukrainy, patentovlasnyky. Zastosuvannia osnovnoho faktora rostu fibroblastiv (bFGF) yak zasobu dlia korektsii porushen krovoobihu v nyrkakh. Patent Ukrainy na korysnu model. №26456, 2007 Veres.25. [In Ukrainian].

17. Dong Y, Zhang Q, Wen J, Chen T, He L, Wang Yi, et al. Ischemic duration and frequency determines AKI-to CKD progression monitored by dynamic changes of tubular biomarkers in IRI mice. *Front. Physiol.* 2019;10:153. doi: 10.3389/fphys.2019.00153.
18. Pyrohov VO, Kordium VA, Zubko VI, Myhal LIa, Nikulina HH, Dubei Ila, vynakhidnyky; DU «In-t urolohii NAMN Ukrainy», In-t molekuliarnoi biolohii i henetyky NAN Ukrainy, patentovlasnyky. Sposib korektsii porushen krovoobihu v nyrkakh iz eksperymentalno zmodelovanoiu ishemiiieu. Patent Ukrainy na korysnu model №88695. 2014 Berez. 25. [In Ukrainian].
19. Labunets IF, Utko NA, Toporova OK, Savosko SI, Pokholenko IaO, Panteleymonova TN, Butenko GM. Melatonin and fibroblast growth factor-2 potentiate the effects of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in mice with cuprizone-induced demyelination. *Biopolym. Cell.* 2021; 5(37): 369-78. doi: 10.7124/bc.000A62.
20. Labunets I, Utko N, Toporova O, Pokholenko Ia, Panteleymonova T, Litoshenko Z, Butenko G. The effects of combined administration of human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells and melatonin or fibroblast growth factor-2 to aged mice with a toxic cuprizone model of demyelination *Cell and Organ Transplantation.* 2021; 9(1):4-10. doi: 10.22494/cot.v9i1.116.