



УКРАЇНА

(19) UA (11) 83465 (13) C2
(51) МПК
A61K 33/08 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ГЕПАТИТІВ МОНООКСИДОМ ВУГЛЕЦЮ

1

(21) 20041210382
(22) 16.05.2003
(86) PCT/US03/15263, 16.05.2003
(31) 60/381,527
(32) 17.05.2002
(33) US
(46) 25.07.2008, Бюл.№ 14, 2008 р.
(72) ОТТЕРБАЙН ЛЕО Е., ЧОІ ОГАСТІН М.К., ЦУ-
ККЕРБРАУН БРАЙАН
(73) ЙЄЙЛ ЮНІВЕРСИТЕТІ, ЮНІВЕРСИТЕТІ ОФ ПІТТС-
БУРГ ОФ ДЗЕ КОММОНВЕЛТ СІСТЕМ ОФ ХАЙЄР
ЕДЬЮКЕЙШН
(56) Matsumoto A. et al.: "A high expression of heme
oxygenase-1 in the liver of LEC rats at the stage of
hepatoma: the possible implication of induction in
uninvolved tissue", Free Radic Res., 1998, 28(4):383-
9
WO 98/13058 A, 02.04.1998
(57) 1. Спосіб лікування гепатиту у пацієнта, що
включає: виявлення хворого з діагностованим
гепатитом, і введення даному пацієнту
фармацевтичної композиції, що містить кількість
монооксиду вуглецю, ефективну для лікування
гепатиту у даного пацієнта.
2. Спосіб за п. 1, де фармацевтична композиція
знаходиться в газоподібному вигляді і вводиться
пацієнту шляхом інгаляції.
3. Спосіб за п. 1, де фармацевтична композиція
знаходиться в рідкому вигляді і вводиться пацієнту
перорально.
4. Спосіб за п. 1, де фармацевтичну композицію
вводять безпосередньо в черевну порожнину пацієн-
та.
5. Спосіб за п. 1, де пацієнт інфікований вірусом,
вибраним з групи, що включає: вірус гепатиту А,
вірус гепатиту В, вірус гепатиту С, вірус гепатиту
D, вірус гепатиту Е і вірус гепатиту G.
6. Спосіб за п. 1, де пацієнт є алкоголіком.
7. Спосіб за п. 1, що включає також лікування па-
цієнта способом, вибраним з групи, що включає:
відмову від введення або знижене введення гепа-
титіндукуючих лікарських засобів і введення пацієн-
ту кортикостероїдів або протівірусних агентів.
8. Спосіб за п. 1, де фармацевтичну композицію
вводять пацієнту за допомогою штучної легені.

2

9. Спосіб за п. 1, де фармацевтичну композицію
вводять за допомогою приладу для екстракорпо-
рального мембранного газового обміну.
10. Спосіб за п. 1, де гепатит викликаний впливом
гепатотоксичного агента.
11. Спосіб лікування гепатиту у пацієнта, що вклю-
чає:
(а) ідентифікацію пацієнта, який хворіє або схиль-
ний до ризику захворювання гепатитом;
(б) забезпечення посудини, яка містить стиснений
газ, що включає газоподібний монооксид вуглецю;
(с) вивільнення стисненого газу з посудини з утво-
ренням атмосфери, що містить газоподібний мо-
нооксид вуглецю;
(д) вплив даної атмосфери на пацієнта, причому
кількість монооксиду вуглецю в даній атмосфері є
достатньою для лікування гепатиту у пацієнта.
12. Спосіб введення пацієнту гепатотоксичного
лікарського засобу, що включає:
(а) введення пацієнту гепатотоксичного лікарсько-
го засобу, і
(б) до, під час або після стадії (а) введення пацієн-
ту фармацевтичної композиції, що містить моноок-
сид вуглецю, в кількості, достатній для лікування
гепатиту у даного пацієнта.
13. Спосіб за п. 12, де монооксид вуглецю вводять
до стадії (а).
14. Спосіб за п. 12, де монооксид вуглецю вводять
під час стадії (а).
15. Спосіб за п. 12, де монооксид вуглецю вводять
після стадії (а).
16. Спосіб за п. 12, де гепатотоксичний лікарський
засіб вибраний з групи, що включає: ізоніазид,
метилдопа, ацетамінофен, аміодарон і нітрофура-
нтон.
17. Спосіб лікування гепатиту у пацієнта, причому
вказаний спосіб передбачає:
ідентифікацію пацієнта, що хворіє або схильний до
ризiku захворювання гепатитом, не викликаним
оперативним втручанням або ендотоксинами; і
введення даному пацієнту фармацевтичної компо-
зиції, що містить кількість монооксиду вуглецю,
ефективну для лікування гепатиту у пацієнта.

(13) C2

(11) 83465

(19) UA

Відповідно до даної заявки запитується пріоритет за [попередньою заявкою США №60/381527, поданою 17 травня 2002р., яка включена тут у всій своїй повноті у вигляді посилання].

Даний винахід виконаний при урядовій підтримці за грантами №№R01-GM-44100, HL 58688, HL55330, HL60234 і A142365 Національного інституту здоров'я (National Institutes of Health). Уряд володіє певними правами на даний винахід.

Даний винахід стосується лікування гепатиту.

Газоподібний монооксид вуглецю отруйний при високих концентраціях. Однак в наш час визнано, що він є важливою сигнальною молекулою [Verma та інш., Science 259:381-384, 1993]. Передбачають також, що монооксид вуглецю діє як молекула-нейронний месенджер в головному мозку (там же) і як нейроендокринний модулятор в гіпоталамусі [Pozzoli та інш., Endocrinology 735:2314-2317, 1994]. Подібно оксиду азоту (NO) монооксид вуглецю є релаксантом гладких м'язів [Utz та інш., Biochem. Pharmacol. 47: 195-201, 1991; Christodoulides та інш., Circulation 97:2306-9, 1995] та інгібує агрегацію тромбоцитів [Mansouri та інш., Thromb. Haemost. 48: 286-8, 1982]. Показано, що інгаляція монооксиду вуглецю (CO) при низьких концентраціях надає протизапальну дію на деяких моделях.

Гепатит являє собою захворювання, що характеризується запаленням печінки. Запалення може характеризуватись дифузним або осередковим некрозом, що зачіпає часточку печінки. Етіологічні фактори гепатиту включають, наприклад, віруси, такі як специфічні віруси гепатиту, наприклад, віруси гепатиту A, B, C, D, E і G; алкоголь та інші лікарські препарати (наприклад, ізоніазид, метилдопа, ацетамінофен, аміодарон і нітрофурантоїн) [дивись The Merck Manual of Diagnosis і Therapy, 17th Edition, Section 4, Chapter 42].

Даний винахід частково оснований на відкритті, що введення CO може захищати від розвитку гепатиту.

Таким чином, даний винахід відноситься до способу лікування, профілактики або зниження ризику розвитку гепатиту у пацієнта. Даний спосіб передбачає виявлення пацієнта, страждаючого або схильного до ризику захворювання гепатитом, і введення даному пацієнту фармацевтичної композиції, що містить деяку кількість монооксиду вуглецю, ефективну для лікування гепатиту у пацієнта.

Фармацевтичну композицію можна вводити пацієнту будь-яким способом, відомим в даній галузі для введення пацієнтам газів і/або рідин, наприклад, за допомогою інгаляції, інсуфляції, впливання, ін'єкції і/або ковтання. В одному варіанті даного винаходу фармацевтичну композицію вводять пацієнту шляхом інгаляції. В іншому варіанті фармацевтичну композицію вводять пацієнту перорально. Ще в одному варіанті фармацевтичну композицію вводять безпосередньо в черевну порожнину пацієнта. Ще в одному варіанті фармацевтичну композицію вводять за допомогою приладу для екстракорпорального мембранного газового

обміну або штучної легені. В іншому варіанті пацієнт є алкоголіком.

Пацієнт може бути твариною, людиною або тим, що відрізняється від людини. Наприклад, пацієнт може бути будь-яким ссавцем, наприклад, людиною, іншим приматом, свинею, гризуном, таким як миші і щури, кролики, морські свинки, хом'яки, коровою, конем, кішкою, собакою, вівцею і козою. Гепатит може бути результатом, або суб'єкт може вважатись схильним до ризику захворювання гепатитом через будь-який з ряду факторів, наприклад, інфекцій, таких як вірусні інфекції, наприклад, інфікування вірусом гепатиту A, B, C, D, E і/або G; прийому алкоголю (наприклад, алкоголізм); прийому лікарських препаратів (наприклад, одного або більше з описаних вище ліків, таких як ацетамінофен, анестетики, протитуберкульозні ліки, протигрибкові агенти, антидіабетичні ліки, нейролептичні агенти і ліки, що застосовуються для лікування ВІЛ-інфекції і СНІДу); аутоімунних станів (наприклад, аутоімунний гепатит) і/або хірургічних операцій. Фармацевтична композиція може бути в будь-якому вигляді, наприклад, газоподібному або рідкому.

В іншому варіанті спосіб передбачає також призначення пацієнту, щонайменше, одного з наступних способів лікування: індукція HO-1 або феритину у пацієнта; експресія рекомбінантної HO-1 або феритину у пацієнта; і введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить HO-1, білірубін, білівердин, феритин або апоферитин, залізо, десфероксамін або залізо-декстран. Пропонується також застосовувати CO і будь-який з перерахованих вище агентів в одержанні лікарського засобу для лікування або профілактики гепатиту.

В іншому варіанті гепатит (або ризик захворювання гепатитом) не є наслідком хірургічної операції (наприклад, абдомінальної або трансплантаційної), дії бактеріального ендотоксину, септичного шоку і/або загального запалення.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до способу лікування або профілактики гепатиту у пацієнта, який включає ідентифікацію пацієнта, страждаючого або схильного до ризику захворювання гепатитом (наприклад, пацієнта, діагностованого як страждаючий або схильний до ризику захворювання гепатитом); забезпечення посудини, яка містить стиснений газ, що включає газоподібний монооксид вуглецю; вивільнення стисненого газу з посудини з утворенням атмосфери, що містить газоподібний монооксид вуглецю; і вплив даної атмосфери на пацієнта, причому кількість монооксиду вуглецю в даній атмосфері є достатньою для лікування гепатиту у пацієнта.

Ще в одному аспекті даний винахід відноситься до способу проведення на пацієнті абдомінальної хірургічної операції, наприклад, трансплантації печінки, яка включає ідентифікацію пацієнта, потребуючого абдомінальної хірургічної операції, коли гепатит представляє ризик для абдомінальної хірургічної операції; проведення абдомінальної хірургічної операції на пацієнті, і забезпечення вдихання пацієнтом деякої кількості газоподібного монооксиду вуглецю, достатнього для зниження

ризик заворування гепатитом, до, під час або після стадії проведення операції. Передбачають також застосування СО при одержанні лікарського засобу, наприклад, газоподібного або рідкого лікарського засобу для застосування при лікуванні або профілактиці гепатиту.

Даний винахід відноситься також до способу лікування гепатиту у пацієнта, страждаючого або схильного до ризику заворування гепатитом, що не є наслідком хірургічної операції і/або дії ендотоксину, наприклад, гепатитом, викликаним будь-яким описаним тут фактором, що відрізняється від хірургічної операції і/або ендотоксину. Даний спосіб передбачає ідентифікацію пацієнта, страждаючого або схильного до ризику заворування гепатитом, що не є наслідком хірургічної операції і/або дії ендотоксину, і введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить деяку кількість монооксиду вуглецю, ефективну для лікування гепатиту у пацієнта.

Даний винахід передбачає також спосіб введення пацієнту гепатит-індукуючих ліків (тобто гепатотоксичних ліків, наприклад, ізоніазиду, метилдопа, ацетамінофену, амідарону або нітрофурантоїну). Даний спосіб передбачає введення пацієнту ліків і до, під час і/або після застосування ліків, введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить монооксид вуглецю, в кількості, ефективній для лікування гепатиту у пацієнта.

В іншому аспекті даний винахід стосується посудини, що містить стиснений газ СО медичної міри чистоти. Посудина може мати етикетку, на якій указано, що даний газ можна застосовувати для лікування гепатиту у пацієнта. По-іншому або в доповнення до цього, посудина може мати етикетку, на якій указано, що даний газ можна вводити пацієнту в поєднанні з введенням гепатит-індукуючих ліків (тобто гепатотоксичних ліків), наприклад, ацетамінофену. Газоподібний СО може знаходитись в суміші з газоподібним азотом, газоподібним оксидом азоту або кисень-вмісним газом. Газоподібний СО може бути присутнім в суміші при концентрації, щонайменше, приблизно 0,025%, наприклад, щонайменше, приблизно 0,05%, 0,10%, 0,50%, 1,0%, 2,0%, 10%, 50% або 90%.

Також даний винахід включає застосування СО при виробництві лікарського засобу для лікування або профілактики гепатиту. Даний лікарський засіб можна застосовувати у способі лікування гепатиту у пацієнта, страждаючого або схильного до ризику заворування гепатитом, згідно з описаними тут способами. Даний лікарський засіб може знаходитись в будь-якому описаному тут вигляді, наприклад, у вигляді рідкої або газоподібної СО-композиції.

Якщо не визначено по-іншому, всі технічні і наукові терміни, що використовуються тут, мають ті ж значення, які звичайно прийняті фахівцями в тій галузі, до якої належить даний винахід. Відповідні способи і матеріали описані нижче, хоча на практиці або при тестуванні даного винаходу можна застосовувати способи і матеріали, аналогічні або еквівалентні описаним тут. Всі згадані тут публікації, патентні заявки, патенти та інші посилання включені тут у свій повноті у вигляді поси-

лень. У разі конфлікту даний опис, включаючи визначення, буде відрегульований. Матеріали, способи і приклади є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження.

Подробиці одного або декількох варіантів даного винаходу вказані нижче в описі. Інші відмітні ознаки, цілі і переваги даного винаходу будуть ясні з опису і формули винаходу.

На Фіг.1 представлена діаграма, яка ілюструє, що індукція HO-1 захищає гепатоцити мишей від TNF- α /D-gal-індукованої загибелі клітин. CoPR α бальт-протопорфірин ; ALT=сироваткова аланінамінотрансфераза; TNF=фактор некрозу пухлини альфа. Результати представляють середні значення \pm стандартні відхилення (SD) для 6-8 мишей/групи * $p < 0,005$.

На Фіг.2 представлена діаграма, що показує, що екзогенний СО захищає гепатоцити від TNF- α -індукованої загибелі клітин способом, незалежним від cCMP/p38-шляху і залежним від активації NF- κ B. СО=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря; TNF=фактор некрозу пухлини альфа; BAY=BAY 11-7082 (інгібує активацію NF- κ B); I κ B=I κ Bo (перешкоджає NF- κ B-активації); ODQ=1H-[1,2,4]оксадіазоло[4,3-а]хіноксалін-1-он (селективний інгібітор гуанілциклази); Lac-Z=prEP-Lac-Z (аденовірусний контроль). Показані результати являють собою середні значення \pm SD з чотирьох незалежних експериментів (три комірки в кожному) (* $p < 0,01$).

На Фіг.3 представлена діаграма, яка показує, що екзогенний СО захищає гепатоцити людини від TNF- α /актиноміцин-B (ActD)-індукованої загибелі клітин. СО=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /ActD. Результати являють собою середні значення \pm SD з 3 незалежних експериментів (три комірки в кожному), * $p < 0,05$.

На Фіг.4 представлена діаграма, яка показує, що екзогенний СО є причиною збільшення активації NF- κ B в гепатоцитах. СО=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря, BAY=BAY 11-7082; CM=суміш цитокінів (TNF- α (500Од/мл), IL-1 β (100Од/мл), і IFN- δ (100Од/мл)). Показані результати являють собою середні значення \pm стандартна погрешність (SE) з трьох незалежних експериментів (три комірки в кожному), * $p < 0,001$, відносно повітря.

На Фіг.5 наведена фотографія поліакриламідного гелю, яка показує, що екзогенний СО спричиняє підвищення ядерної транслокації NF- κ B і ДНК-зв'язування, яке вимірюють в дослідженні зсуву електрофоретичної рухливості (EMSA). FP = вільна проба (без ядерного білка, тобто без ДНК-зв'язування); Всього=NF κ B-смуги без суперзсуву антитіл.

На Фіг.6A-6C наведені мікрофотографії первинних гепатоцитів, імунозафарбованих для детектування ядерної локалізації p65, які показують, що екзогенний СО є причиною підвищення NF- κ B-активації в гепатоцитах. Фіг.6A: гепатоцити, що піддаються дії повітря. Фіг.6B: гепатоцити суміші цитокінів, що піддаються дії (TNF- α (500Од/мл), IL-1 β) (100Од/мл), і IFN- δ (100Од/мл)). Фіг.6C: гепатоцити, що піддаються дії СО. Зображення є

типовими прикладами з 6 різних ділянок. Смуги становлять 10мкм.

На Фіг.7 представлена діаграма, яка показує, що індукований екзогенним CO захист гепатоцитів включає NF- κ B-залежну експресію iNOS. CO=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря; BAY=BAY 11-7082; CM=суміш цитокінів. Показані результати являють собою середні значення \pm SE з чотирьох незалежних експериментів (три комірки в кожному), * $p < 0,001$, відносно повітря і повітря/BAY-оброблених клітин.

На Фіг.8 наведена картина вестерн-блотингу, яка показує, що експресія білка iNOS в гепатоцитах помітно збільшується при впливі TNF- α при наявності CO у порівнянні з впливом тільки TNF- α . iNOS=NO-синтаза, що індукується; CO=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /ActD; p-Actin=контрольний білок. Імуноблот є типовим прикладом з 3 незалежних експериментів.

На Фіг.9 представлена діаграма, яка показує, що CO не захищає гепатоцити мишей з дефіцитом iNOS-активності (inos^{-/-}) від TNF- α -індукованої загибелі клітин. CO=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /ActD; inos^{-/-}=миші зі зменшеною iNOS-активністю; L-N10=L-N5-(1-іміноетил)орнітин-2HCl. Показані результати являють собою середні значення \pm SE з чотирьох незалежних експериментів (три комірки в кожному), * $p < 0,01$ відносно не оброблених TNF/ActD і CO/TNF/ActD-оброблених клітин.

На Фіг.10 представлена діаграма, яка показує, що CO, який екзогенно вводиться, перешкоджає TNF- α /D-Gal-індукованому ураженню печінки у мишей. ALT=сироваткова аланінамінотрансфераза; CO=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря. Результати являють собою середні значення \pm SD для 18-20 мишей, * $p < 0,001$ відносно оброблених повітрям.

На Фіг.11A-11H представлені мікрофотографії зразків печінки, які показують, що CO, який екзогенно вводиться, перешкоджає TNF- α /D-Gal-індукованому ураженню печінки у мишей. Фіг.11A і 11B: зразки печінки мишей, що піддаються дії кімнатного повітря і CO, відповідно, забарвлені гематоксином та еозином (H & E). Фіг.11C і 11D: зразки печінки TNF- α /D-Gal-оброблених мишей, що піддаються дії кімнатного повітря і CO, відповідно, забарвлені H & E. Фіг.11E і 11F: зразки печінки TNF- α /D-Gal-оброблених мишей, що піддаються дії кімнатного повітря і CO, відповідно, забарвлені для детектування активованої каспази-3. Фіг.11G і 11H: зразки печінки TNF- α /D-Gal-оброблених мишей, що піддаються дії кімнатного повітря і CO, відповідно, і забарвлені із застосуванням термінальної дезоксиінуклеотидилтрансфераза-опосередкованої dUTP кінцевої «нік»-маркіровки (TUNEL). Зображення є типовими середовищами з 15-20 середовищ/печінку для 3-4 індивідуальних мишей/групу. Смуга становить 20мкм.

На Фіг.12 наведена фотографія вестерн-блотингу, яка показує, що печінки мишей, які піддаються дії TNF- α /D-Gal і оброблені шляхом інгаляції CO, демонструють підвищені рівні білка 1NOS. Дикий тип=дикий тип мишей; iNOS^{-/-}=iNOS-дефіцитні миші; CO=монооксид вуглецю; повіт-

ря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /D-Gal; p-Actin=контрольний білок.

На Фіг.13A-13D представлені мікрофотографії зразків печінки, яка показує, що печінки мишей, яка піддається дії TNF- α /D-Gal і оброблені за допомогою інгаляції CO, демонструють підвищені рівні білка 1NOS. Фіг.13A: зразок печінки миші, що піддається дії кімнатного повітря. Фіг.13B: зразок печінки миші, що піддається дії CO. Фіг.13C: зразок печінки миші, що піддається дії TNF- α /D-Gal і кімнатного повітря. Фіг.13D: зразок печінки миші що піддається дії TNF- α /D-Gal і CO. Зображення є типовими прикладами для 6 окремих тварин і 6-10 різних середовищ/зразок печінки. Смуга становить 20мкм.

На Фіг.14 представлена діаграма, яка показує, що CO не захищає від ураження печінки за відсутності iNOS-функції/експресії. L-NIL=дигідрохлорид L-N6-(1-іміноетил)лізину-10 (селективний інгібітор iNOS); CO=моно оксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /D-Gal. Результати являють собою середні значення \pm SD для 6-8 тварин/групу, * $p < 0,01$ відносно CO/TNF- α /D-gal і повітря і CO-контролів.

На Фіг.15 представлена картина вестерн-блотингу, яка показує, що печінки CO-оброблених мишей демонструють підвищену експресію HO-1 при наявності і за відсутності TNF-15 α /D-Gal. CO=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /D-Gal; p-Actin=контрольний білок. Блот є типовим для двох незалежних експериментів.

На Фіг.16 представлена картина вестерн-блотингу, яка показує, що печінки CO-оброблених мишей не демонструють підвищену експресію HO-1 при наявності або за відсутності TNF-20 α /D-Gal, якщо iNOS інгібують, застосовуючи L-NIL. CO=монооксид вуглецю; повітря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /D-Gal; p-Actin=контрольний білок; L-NIL=дигідрохлорид L-N6-(1-іміноетил)лізину (селективний інгібітор iNOS). Блот є типовим для 2 незалежних експериментів.

На Фіг.17 представлена діаграма, яка показує, що CO-індукована HO-1 є захисною проти TNF- α -індукованого ураження печінки у мишей. ALT=сироваткова аланінамінотрансфераза; повітря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /D-Gal; Sn=олово-протопорфрин (інгібітор HO-1); VP=V-PYRRO (донор оксиду азоту). Результати являють собою середні значення \pm SD для 8-10 мишей/групи, * $p < 0,05$ відносно CO/TNF/D-gal-оброблених мишей.

На Фіг.18 представлена діаграма, яка показує, що індукція HO-1 є захисною від TNF- α -індукованого ураження печінки, незалежно від iNOS-активності. ALT=сироваткова аланінамінотрансфераза; повітря=кімнатне повітря; TNF=TNF- α /D-Gal; L-NIL=дигідрохлорид L-N6-(1-іміноетил)лізину (селективний інгібітор iNOS); CoP=кобальт-протопорфрин (індуктор HO-1); iNOS^{-/-}=iNOS-дефіцитні миші. Результати являють собою середні значення \pm SD для 6-8 мишей/групу, * $p < 0,001$ відносно повітря/TNF і L-NH/TNF.

На Фіг.19 представлена діаграма, яка показує, що для CO-індукованого захисту гепатоцитів мишей від TNF- α /ActD-індукованої загибелі клітин необхідна експресія HO-1. Дикий тип (чорні сму-

ги)=гепатоцити, виділені з мишей дикого типу C57BL/6J; hmoх-1^{-/-} (білі смуги)=гепатоцити, виділені з мишей, що не мають HO-1; CO=монооксид вуглецю; повітря+імнатне повітря; TNF- α =TNF- α /ActD, *p<0,01 відносно клітин, не оброблених TNF- α /ActD, і відносно TNF- α /ActD-оброблених клітин, які також оброблені CO.

На Фіг.20 представлена діаграма, яка показує, що для NO-індукованого захисту гепатоцитів мишей від TNF- α /ActD-індукованої загибелі клітин потрібна експресія HO-1. Дикий тип (чорні смуги)=гепатоцити, виділені з мишей дикого типу C57BL/6J; hmoх-1^{-/-} (білі смуги)=гепатоцити, виділені з мишей, що не мають HO-1; SNAP=s-нітрозо-N-ацетилпеніциламін (донор NO); повітря+імнатне повітря; TNF- α =TNF- α /ActD, *p<0,01 відносно клітин, не оброблених TNF- α /ActD, і відносно TNF- α /ActD-оброблених клітин, які також оброблені NO.

На Фіг.21 представлена діаграма, що показує, що миші, що піддаються дії CO, захищені від ацетамінофен-індукованої ураження печінки. ALT=сировоточная аланінамінотрансфераза; повітря+імнатне повітря; APAP ацетамінофен. Результати являють собою середні значення \pm SD для 4-8 мишей/групи.

Термін "монооксид вуглецю" (або "CO"), що використовується тут, описує молекулярний монооксид вуглецю в газоподібному стані, стиснений в рідкому вигляді або розчинений у водному розчині. Вираз "композиція монооксиду вуглецю" і "фармацевтична композиція, що містить монооксид вуглецю" використані в описі для позначення газоподібної або рідкої композиції, що містить монооксид вуглецю, яку можна вводити пацієнту і/або до органу, наприклад, печінки. Практикуючий фахівець визначає, яка форма фармацевтичної композиції, наприклад, газоподібна, рідка або обидві, газоподібна і рідка, є переважною для даного застосування.

Вирази, що використовуються тут, "ефективна кількість" і "ефективно для лікування" стосуються кількості або концентрації монооксиду вуглецю, що застосовується протягом деякого періоду часу (включаючи екстрене або тривале введення і періодичне або безперервне введення), яке є ефективним в контексті його застосування для ефекту або фізіологічного результату, що мається на увазі. Ефективні кількості монооксиду вуглецю для застосування в даному винаході включають, наприклад, кількості, які запобігають гепатиту, знижують ризик захворювання гепатитом, ослабляють симптоми гепатиту або поліпшують результат інших способів лікування гепатиту.

Для газів ефективні кількості монооксиду вуглецю звичайно складають величини в діапазоні приблизно від 0,0000001% до 0,3%мас., наприклад, від 0,0001% приблизно до 0,25%мас., переважно, щонайменше, приблизно 0,001%, наприклад, щонайменше, 0,005%, 0,010%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,22%, або 0,24%мас. монооксиду вуглецю. Переважні діапазони включають, наприклад, від 0,001% приблизно до 0,24%, приблизно від 0,005% до 0,22%, приблизно 0,005% до 0,05%, приблизно від 0,010% до 0,20%, приблизно

від 0,02% до 0,15%, приблизно від 0,025% до 0,10%, або приблизно від 0,03% до 0,08%, або приблизно від 0,04% до 0,06%. Для рідких розчинів CO ефективні кількості звичайно складають величини в діапазоні приблизно від 0,0001 до 0,0044г CO/100г рідини, наприклад, щонайменше, 0,0001, 0,0002, 0,0004, 0,0006, 0,0008, 0,0010, 0,0013, 0,0014, 0,0015, 0,0016, 0,0018, 0,0020, 0,0021, 0,0022, 0,0024, 0,0026, 0,0028, 0,0030, 0,0032, 0,0035, 0,0037, 0,0040 або 0,0042г CO/100г водного розчину. Переважні діапазони включають, наприклад, приблизно від 0,0010 до 0,0030г CO/100г рідини, приблизно від 0,0015 до 0,0026г CO/100г рідини або приблизно від 0,0018 до 0,0024г CO/100г рідини. Практикуючим фахівцем зрозуміло, що в залежності від застосування можна використати кількості, що виходять за межі вказаних діапазонів.

Термін "пацієнт" використовують в описі для позначення тварини, людини або відмінної від людини, до якої застосовують лікування відповідно до способів даного винаходу. У даному винаході розглянуті ветеринарні застосування. Даний термін включає (але не обмежений) ссавців, наприклад, людей, інших приматів, свиней, гризунів, таких як миші і щури, кролики, морські свинки, хом'яки, корів, коней, кішок, собак, овець і кіз. Термін "лікування" застосовують тут для опису затримання захворювання у пацієнта, інгібування або посилення ефектів стану, наприклад, гепатиту.

Термін "гепатит" визнаний в даній галузі і використаний тут для позначення захворювання пацієнтів, що частково характеризується запаленням печінки. Етіологічні фактори гепатиту включають, наприклад, інфекції, такі як інфікування специфічним вірусом гепатиту, наприклад, вірусами гепатиту A, B, C, D, E і G; або гепатотоксичні агенти, такі як гепатотоксичні ліки (наприклад, ізоніазид, метилдопа, ацетамінофен, аміодарон і нітрофурантоїн) і токсини (наприклад, ендотоксин або токсини наволишнього середовища). Гепатит може з'явитись після операції у пацієнтів з трансплантованою печінкою. Крім того, приклади ліків і токсинів, які можуть викликати гепатит (тобто, гепатотоксичні агенти), описані в [роботі Feldman: Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 7th ed., Chapter 17 (Liver Disease Caused by Drugs, Anesthetics, and Toxins), зміст якої спеціально включений тут у вигляді посилання у всій своїй повноті]. Такі приклади включають (але не обмежені) метилдопа і фенітоїн, барбітурати, наприклад, фенобарбітал; сульфонаміди (наприклад, в комбінованих ліках, таких як співтримоксазол (сульфатметоксазол і триметоприм); сульфасалазин; саліцилати; дисульфірам; β -адренергічні блокуючі агенти, наприклад, ацебутолол, лабеталол і метопролол); блокатори кальцієвих каналів, наприклад, ніфедипін, верапаміл і дилтіазем; синтетичні ретиноїди, наприклад, етретинат; ліки, що придушують шлункову кислотність, наприклад, оксметидин, ебротидин, симетидин, ранітидин, омепразол і фамотидин; антагоністи лейкотриєнових рецепторів, наприклад, зафірлукаст; протитуберкульозні ліки, наприклад, рифампіцин і піразинамід; протигрибкові агенти, наприклад, кетоконазол, тербінафін, флюконазол і

ітраконазол; антидіабетичні ліки, наприклад, тіазолідиніони, наприклад, троглітазон і розиглітазон; ліки, що застосовуються при неврологічних порушеннях, наприклад, нейролептичні агенти, антидепресанти (наприклад, флюоксетин, пароксетин, венлафаксин, тразодон, толкапон і нефазодон), снотворні засоби (наприклад, алпідем, золпідем і бентазипам) та інші ліки, наприклад, такрин, дантролен, рилузол, тизанідин і алверин; нестероїдні протизапальні ліки, наприклад, бромфенак; інгібітори COX-2; ципротеронацетат; лефлуномід; антивірусні агенти, наприклад, фіалуридин, диданозид, залцитабін, ставу дин, ламівудин, зидовудин, абакавір; протиракові ліки, наприклад, тамоксифен і метотрексат; рекреаційні ліки, наприклад, кокаїн, фенциклідин і 5-метокси-3,4-іметилендіоксиметамфетамін; L-аспарагіназу; амідіаквуїн; пікантон; знеболюючі агенти; наприклад, галотан, енфлуран та ізофлуран; вітаміни, наприклад, вітамін А; і дієтичні і/або оточуючі токсини, наприклад, піролізидинові алкалоїди, токсин з *Amanita phalloides* або інших токсичних грибів, афлатоксин, миш'як, Бордоська суміш (солі міді і вапно), вінілхлоридний мономер, чотирьоххлористий вуглець, берилій, диметилформамід, диметилнітрозамін, метилендіанілін, фосфор, хлордекон (Kerone), 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-пара-діоксин (TCDD), тетрахлоретан, тетрахлоретилен, 2,4,5-тринітротолуол, 1,1,1-трихлоретан, толуол і ксилол і відомі "трав'яні ліки", наприклад, ефедрин і еуенол.

Симптоми гепатиту можуть включати стомлення, втрату апетиту, дискомфорт шлунка і/або жовтуху (пожовтіння шкіри і/або очей). Більш докладний опис гепатиту наведений, наприклад, в [роботі The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th Edition, Section 4, Chapter 42, Section 4, Chapter 44, і Section 4, 5 Chapter 40, зміст якої у всій своїй повноті спеціально включений тут у вигляді посилання].

Практикуючим фахівцям зрозуміло, що лікуючий лікар може поставити діагноз пацієнту як страждаючому від гепатиту будь-яким способом, відомим в даній галузі, наприклад, перевіряючи функцію печінки, наприклад, використовуючи аналізи крові на вміст сироваткової аланінамінотрансферази (ALT), лужної фосфатази (AP) або білірубіну.

Пацієнти, які, як вважають, схильні до ризику розвитку гепатиту, можуть отримати особливу користь від даного винаходу, насамперед, тому, що профілактичне лікування можна починати до яких-небудь симптомів гепатиту. Пацієнти, "схильні до ризику", включають, наприклад, пацієнтів, інфікованих вірусами гепатиту, або пацієнтів, які страждають від яких-небудь станів або мають описані тут фактори ризику (наприклад, пацієнти, схильні до дії гепатотоксичних агентів). Практикуючим фахівцям зрозуміло, що відповідно до діагнозу лікуючого лікаря можна визначити, чи схильний пацієнт до ризику захворювання гепатитом.

Кількості СО, ефективні для лікування гепатиту, можна вводити пацієнту в день постановки діагнозу пацієнту як страждаючому від гепатиту або деякого стану, пов'язаного з гепатитом, або як такому, що має фактор ризику, пов'язаний з підви-

щеною імовірністю розвитку гепатиту у пацієнта (наприклад, якщо пацієнт нещодавно зазнавав, зазнає або буде зазнавати дії гепатотоксичного агенту, наприклад, гепатотоксичних ліків, таких як ацетамінофен). Пацієнти можуть вдихати СО при концентраціях в діапазоні від 10 до 1000млн.ч., наприклад, приблизно від 100 до 800млн.ч., приблизно від 150 до 600млн.ч., або приблизно від 200 до 500млн.ч. Переважні концентрації включають, наприклад, приблизно 30млн.ч., 50млн.ч., 75млн.ч., 100млн.ч., 125млн.ч., 200млн.ч., 250млн.ч., 500млн.ч., 750млн.ч. або приблизно 1000млн.ч. СО можна вводити пацієнту імпульсно або безперервно. СО можна вводити приблизно протягом 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 або 20 днів або більше 20 днів, наприклад, 1, 2, 3, 5 або 6 місяців, або доти, доки пацієнт не буде більше демонструвати симптоми гепатиту, або доти, доки пацієнту не буде поставлений діагноз, що він більше не схильний до ризику захворювання гепатитом. В даний день СО можна вводити безперервно протягом всього дня або імпульсно, наприклад, одне затягування СО на день (якщо застосовують високу концентрацію) або протягом періоду до 23 год. на день, наприклад, до 20, 15, 12, 10, 6,3 або 2 год. на день, або до 1год. на день.

Якщо пацієнт потребує лікування гепатотоксичними лікарськими засобами (наприклад, якщо вони прописані лікуючим лікарем), він може одержувати лікування із застосуванням СО (наприклад, газоподібної композиції СО) до, під час і/або після прийому ліків. Наприклад, СО можна вводити пацієнту імпульсно або безперервно, починаючи за 0-20 днів до введення ліків (і перед кожною індивідуальною дозою, якщо пацієнту дають багаторазові дози), наприклад, починаючи, щонайменше, приблизно за 30хв. до прийому, наприклад, приблизно за 1, 2, 3, 5, 7 або 10год., або приблизно за 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 або 20 днів, або більш ніж за 20 днів до прийому. По-іншому або в доповнення до цього, СО можна вводити пацієнту одночасно з прийомом лікарського засобу. По-іншому або в доповнення до цього, СО можна вводити пацієнту після прийому ліків, наприклад, починаючи безпосередньо після прийому і продовжуючи імпульсно або безперервно протягом приблизно 1, 2, 3, 5, 7 або 10 год. або протягом приблизно 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 або 60 днів, необмежено або доти, доки лікуючий лікар не визначить, що введення СО більше не потрібне (наприклад, після того як гепатотоксичний лікарський засіб виведено з організму або не може більше спричиняти ураження печінки).

Одержання газоподібних композицій

Композиція монооксиду вуглецю може бути газоподібною композицією монооксиду вуглецю. Стиснений або газ, що знаходиться під тиском, застосовний у способах даного винаходу, можна одержати з комерційних джерел і в посудинах будь-якого типу, відповідних для зберігання стисненого газу. Наприклад, стиснені або гази, що знаходяться під тиском, можна одержати з будь-яких джерел, які забезпечують стисненими газами, такими як кисень, для медичного застосування. Вираз, що використовується тут, газ "медичної міри чистоти" означає газ, придатний для введення

пацієнтам, як визначено вище. Газ, що знаходиться під тиском, включаючи CO, що застосовується в способах даного винаходу, можна забезпечити таким чином, щоб всі гази необхідної кінцевої композиції (наприклад, CO, He, NO, CO₂, O₂, N₂) знаходилися в одній посудині, виключення складають NO і O₂, які не можна зберігати разом. Необов'язково способи даного винаходу можна здійснювати, застосовуючи багато посудин, що містять індивідуальні гази. Наприклад, можна забезпечити окрему посудину, яка містить монооксид вуглецю, з іншими газами або без них, вміст якої можна необов'язково змішувати з кімнатним повітрям або з вмістом інших посудин, наприклад, посудин, що містять кисень, азот, діоксид вуглецю, стиснене повітря або який-небудь інший відповідний газ або суміш газів.

Газоподібні композиції, що вводяться пацієнту згідно з даним винаходом, звичайно містять від 0 приблизно до 79%мас. азоту, приблизно від 21 до 100%мас. кисню і приблизно від 0,0000001 до 0,3%мас. (що відповідає приблизно 1млн.ч. або приблизно від 0,001 до 3000млн.ч.) монооксиду вуглецю. Переважно, щоб кількість азоту в газоподібній композиції становила приблизно 79%мас., кількість кисню приблизно 21% мас. і кількість монооксиду вуглецю приблизно від 0,0001 до 0,25%мас., переважно, щонайменше, приблизно 0,001%, наприклад, щонайменше, приблизно 0,005%, 0,010%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,22% або 0,24%мас. Переважні діапазони концентрацій монооксиду вуглецю включають приблизно від 0,005 до 0,24%, приблизно від 0,01 до 0,22%, приблизно від 0,015 до 0,20%, приблизно від 0,08 до 0,20% і приблизно від 0,025 до 0,1%мас. Зазначається, що композиції газоподібного монооксиду вуглецю з концентраціями монооксиду вуглецю вище 0,3% (такими як 1% або більше) можна застосовувати протягом коротких періодів (наприклад, один або декілька вдихів) в залежності від застосування.

Композиції газоподібного монооксиду вуглецю можна застосовувати для створення атмосфери, яка містить газоподібний монооксид вуглецю. Атмосферу, яка включає відповідні рівні газоподібного монооксиду вуглецю, можна створити, наприклад, забезпечивши посудину зі стисненим газом, що містить газоподібний монооксид вуглецю, і вивільняючи стиснений газ з посудини в камеру або простір, одержуючи атмосферу, яка містить газоподібний монооксид вуглецю всередині даної камери або простору. По-іншому, гази можна вивільняти в апарат, який завершується дихальною маскою або дихальною трубкою, що створює при цьому в дихальній масці або дихальній трубці атмосферу, що містить газоподібний монооксид вуглецю, при гарантії, що пацієнт є єдиною людиною в кімнаті, що відчуває вплив значних рівнів монооксиду вуглецю.

Рівні монооксиду вуглецю в атмосфері можна вимірювати або контролювати будь-яким відомим в даній галузі способом. Такі способи включають електрохімічне детектування, газову хроматографію, радіоізотопне визначення, інфрачервону абсорбцію, колориметрію та електрохімічні способи,

основані на застосуванні селективних мембран [дивись, наприклад, Sundeman та інш., Clin. Chem. 28: 2026-2032, 1982; Ingi та інш., Neuron 16: 835-842, 1996]. Рівні монооксиду вуглецю менше мільйонних часток можна детектувати, наприклад, способами газової хроматографії і радіоізотопного визначення. Крім того, в даній галузі відомо, що в біологічній тканині можна вимірювати рівні монооксиду вуглецю порядку менше млн.ч. за допомогою газового сенсора, працюючого в середній інфрачервоній ділянці [дивись, наприклад, Morimotoetal, Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol 280: H482-H488, 2001].

Сенсори монооксиду вуглецю і прилади детектування газу широко доступні від багатьох комерційних джерел.

Одержання рідких композицій

Композиції монооксиду вуглецю можуть також являти собою рідкі композиції монооксиду вуглецю. Рідину можна одержати у вигляді композиції монооксиду вуглецю будь-яким відомим в даній галузі способом, що забезпечує розчинення газів в рідинах. Наприклад, рідину можна вмістити в так званий "CO₂-інкубатор" і впливати безперервним струмом монооксиду вуглецю, переважно в рівновазі з діоксидом вуглецю до досягнення необхідної концентрації монооксиду вуглецю в рідині. Інший приклад: газоподібний монооксид вуглецю можна "барботувати" безпосередньо в рідину до досягнення необхідної концентрації монооксиду вуглецю в рідині. Кількість монооксиду вуглецю, яка може бути розчинена в даному водному розчині, підвищується з пониженням температури. Ще один приклад: відповідну рідину можна пропускати по трубопроводу, який допускає дифузію газу, причому трубопровід проходить через атмосферу, що містить монооксид вуглецю (наприклад, застосовуючи такий пристрій як екстракорпоральний мембранний оксигенатор). Монооксид вуглецю дифундує в рідину, створюючи рідку композицію монооксиду вуглецю.

Ймовірно, що така рідка композиція, призначена для введення живій тварині, буде мати температуру 37°C або близько того під час введення тварині.

Дана рідина може бути будь-якою рідиною, яка, як відомо фахівцеві в даній галузі, підходить для введення пацієнтам [дивись, наприклад, Oxford Textbook of Surgery, Morris і Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Як правило, рідина являє собою водний розчин. Приклади розчинів включають фізіологічний розчин з фосфатним буфером (PBS), Celsior™, Perfadex™, розчин Коллінса (Collins), розчин цитрату і розчин з University of Wisconsin (UW) [Oxford Textbook of Surgery, Morris і Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. В одному варіанті даного винаходу, рідина являє собою розчин Рінгера, наприклад, лактований розчин Рінгера, або будь-яку іншу рідину, яку можна застосовувати для впливу пацієнту. В іншому варіанті, рідина включає кров, наприклад, цілісну кров.

Будь-яку відповідну рідину можна наситити монооксидом вуглецю до встановленої концентрації за допомогою газових дифузерів. По-іншому, можна застосовувати заздалегідь приготовані розчини, якість яких контролюють на вміст встановле-

них рівнів монооксиду вуглецю. Точний контроль дози можна забезпечити за допомогою вимірювань із застосуванням газопроникної і непроникної для рідини мембрани, з'єднаної з аналізатором монооксиду вуглецю. Розчини можна наситити до необхідних ефективних концентрацій і зберігати при даних концентраціях.

Лікування пацієнтів композиціями монооксиду вуглецю

Пацієнт може одержувати лікування із застосуванням композиції монооксиду вуглецю будь-яким відомим в даній галузі способом введення газів і/або рідин пацієнтам. Композиції монооксиду вуглецю можна вводити пацієнту з поставленим діагнозом або схильному до ризику захворювання гепатитом. У даному винаході розглянуте системне введення рідких або газоподібних композицій монооксиду вуглецю пацієнтам (наприклад, шляхом інгаляції і/або ковтання) і локальне введення композицій в печінку пацієнта (наприклад, за допомогою введення в черевну порожнину).

Системна доставка монооксиду вуглецю

Газоподібні композиції монооксиду вуглецю можна доставляти пацієнту системно, наприклад, пацієнту з поставленим діагнозом або схильному до ризику захворювання гепатитом.

Газоподібні композиції монооксиду вуглецю звичайно вводять за допомогою інгаляції через рот або носові проходи в легені, де монооксид вуглецю легко вбирається в кровотік пацієнта. Концентрації активної сполуки (CO), що застосовуються в терапевтичних газоподібних композиціях, залежать від швидкостей абсорбції, розподілу, дезактивації і виведення (звичайно за допомогою дихання) монооксиду вуглецю, а також від інших факторів, відомих фахівцям в даній галузі. Зрозуміло також, що для конкретного суб'єкта потрібно встановити спеціальну схему дозування у часі відповідно до індивідуальної потреби і професійного висновку особи, що прописує або контролює введення композицій, і що вказані тут діапазони концентрацій наведені тільки для прикладу і не мають на увазі обмеження галузі або практичного застосування заявленої композиції. Для гарантії оптимального лікування пацієнта можна контролювати лікування і регулювати дозування CO. У даному винаході розглянуте екстремне, субекстремне і тривале введення монооксиду вуглецю в залежності, наприклад, від тяжкості або стійкості гепатиту у пацієнта. Монооксид вуглецю можна доставляти пацієнту протягом часу (включаючи невизначеність), достатнього для лікування стану і забезпечення фармакологічного або біологічного ефекту, що мається на увазі.

Далі наведені приклади деяких способів і пристроїв, які можна застосовувати для введення пацієнтам газоподібних композицій монооксиду вуглецю.

Вентилятори

Можна придбати монооксид вуглецю медичної міри чистоти (концентрації можна варіювати) в суміші з повітрям або іншим кисеньвмісним газом в стандартному резервуарі для стисненого газу (наприклад, 21% O₂, 79% N₂). Ця суміш не є реактивною, і концентрації, які потрібні для способів даного винаходу, значно менше діапазону зайнят-

тя (10% в повітрі). При встановленні в лікарні газ приблизно доставляють до постелі хворого, де його змішують в змішувачі до необхідної концентрації (в млн.ч.=мільйонні частки) з киснем або повітрям приміщення. Пацієнт вдихає газову суміш, використовуючи вентилятор, на якому швидкість потоку встановлюють, основувшись на комфорті і потребах пацієнта. Це визначають за легеневиими графіками (тобто, швидкістю дихання, приливовідливними об'ємами та інш.). У системі доставки можна передбачити надійний механізм(и) для запобігання не потрібному пацієнту одержанню великих кількостей монооксиду вуглецю, ніж треба. Рівень монооксиду вуглецю в організмі пацієнта можна контролювати, аналізуючи (1) карбоксигемоглобін (COHb), який можна визначати у венозній крові, і (2) монооксид вуглецю, який виділяється, що збирається з бічного отвору вентилятора. Вплив монооксиду вуглецю можна регулювати, основувшись на стані здоров'я пацієнта і на основі маркерів. Якщо необхідно, монооксид вуглецю можна вимивати з організму пацієнта, перемикаючи інгаляцію на 100% O₂. Монооксид вуглецю не трансформується в ході обміну речовин; отже, все, що вдихають, те, зрештою, і видихають, за винятком дуже малого процента, який перетворюється в CO₂. Для забезпечення терапевтичної доставки монооксиду вуглецю його можна також змішувати з будь-якою концентрацією O₂ без подальшого стану гіпоксії.

Маска для обличчя і палатка

Газову суміш, що містить монооксид вуглецю, одержують, як описано вище, для забезпечення пасивної інгаляції пацієнта з використанням маски для обличчя або палатки. Концентрацію, що вдихується, можна змінювати і можна вимивати, просто перемикаючи інгаляцію на 100% O₂. Контроль рівнів монооксиду вуглецю виготовляють в масці або палатці або поряд за допомогою надійного механізму, який запобігає вдиханню дуже високої концентрації монооксиду вуглецю.

Портативний інгалятор

Стиснений монооксид вуглецю може знаходитись в портативному інгаляційному пристрої і подаватись для інгаляції відміряними дозами, наприклад, допускаючи імпульсне лікування реципієнта поза лікарняною обстановкою. Контейнери можна заповнити монооксидом вуглецю при різних концентраціях. Даний пристрій може бути простим у вигляді невеликого резервуара (наприклад, до 5кг), що містить розбавлений відповідним чином CO, з випускним клапаном і трубкою, з якої пацієнт здійснює затикування CO згідно зі стандартною схемою або потребами.

Внутрішньовенна штучна легеня

Для доставки монооксиду вуглецю можна застосовувати штучну легеню (пристрій з катетером для газового обміну в крові), призначену для доставки O₂ і видалення CO₂. Катетер (якщо імплантований) знаходиться в одній з великих вен і здатний доставляти монооксид вуглецю при даній концентрації або системно, або локально. Доставка може бути локальною доставкою високої концентрації монооксиду вуглецю протягом короткого періоду часу за місцем процедури, наприклад, безпосередньо в печінку (в потоку крові відбува-

ється швидке розбавлення даної високої концентрації) або відносно тривалим впливом меншої концентрації монооксиду вуглецю [дивись, наприклад, роботи Hattler та інш., *Artif. Organs* 18(11): 806-812 (1994); і Golob та інш., *ASAIO J.*, 47 (5): 432-437 (2001)].

Барокамера з нормальним тиском

У деяких випадках бажано піддавати впливу монооксиду вуглецю пацієнта цілком. Даний пацієнт знаходиться всередині повітронепроникної камери, яку заповнюють монооксидом вуглецю (при концентрації, яка не піддає пацієнта небезпеці, або при концентрації, яка дає прийнятний ризик без ризику впливу на свідків). По завершенні впливу, камеру продувають повітрям (наприклад, 21% O₂, 79% N₂) і можна провести аналіз зразків на аналізаторі монооксиду вуглецю, щоб перед виходом пацієнта з системи, де проводився вплив, пересвідчитися, що там не залишилось монооксиду вуглецю.

Системна доставка рідких композицій СО

Даний винахід також передбачає, що для системної доставки пацієнту можна готувати водні розчини, що містять монооксид вуглецю, наприклад, для пероральної доставки і/або вливання пацієнту, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревинно і/або підшкірно. Наприклад, пацієнту, страждаючому або схильному до ризику захворювання гепатитом, можна вводити рідкі композиції СО, такі як так званий розчин Рінгера. По-іншому або в доповнення до цього, пацієнту можна вливати цілісну (або часткову) кров, частково або повністю насичену СО.

В даному винаході передбачається також, що можна застосовувати агенти, здатні доставляти дози газоподібних композицій СО або рідких композицій СО (наприклад, вивільняючі СО смоли, креми, мазі, таблетки або пов'язки).

Локальна обробка органів монооксидом вуглецю

По-іншому або в доповнення до цього, можна застосовувати композиції монооксиду вуглецю безпосередньо на печінці, наприклад, на печінці загалом або на її частині. Газоподібні композиції можна застосовувати безпосередньо на печінці пацієнта будь-яким способом, відомим в даній галузі для інсуфляції газів пацієнту. Наприклад, такі гази як діоксид вуглецю часто вдують в черевну порожнину пацієнтів з метою сприяння дослідженню під час лапароскопічних процедур [дивись, наприклад, *Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Практикуючим фахівцям зрозуміло, що аналогічні процедури можна застосовувати для введення композицій монооксиду вуглецю безпосередньо в печінку пацієнта.

Водні композиції монооксиду вуглецю також можна вводити локально в печінку пацієнта. Водні форми композицій можна вводити будь-яким способом, відомим в даній галузі для введення пацієнтам рідин. Як і газоподібні композиції, водні композиції можна застосовувати безпосередньо на печінці. Наприклад, такі рідини як фізіологічні розчини, що містять розчинений СО, можна вводити за допомогою ін'єкції в черевну порожнину пацієнтів під час лапароскопічних процедур. Практикую-

чим фахівцям зрозуміло, що аналогічні процедури можна застосовувати для введення рідких композицій монооксиду вуглецю безпосередньо в печінку пацієнта. Крім того, можна провести вплив на місці, промиваючи печінку або її частину струменем рідкої композиції монооксиду вуглецю [дивись *Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)].

Застосування гемоксигенази-1, інших сполук та інших способів лікування гепатиту

Даний винахід також передбачає індукцію або експресію гемоксигенази-1 (НО-1) в поєднанні з введенням СО. Наприклад, можна індукувати НО-1 у пацієнта, страждаючого або схильного до ризику захворювання гепатитом. Вираз "індукувати (індукований)", що використовується тут, означає - викликати збільшене виробництво білка, наприклад, НО-1, у виділених клітинах або клітинах тканини, органу або тварини, використовуючи власний клітинний ендогенний (наприклад, нерекомбінантний) ген, який кодує білок.

НО-1 можна індукувати у пацієнта будь-яким способом, відомим в даній галузі. Наприклад, виробництво НО-1 можна індукувати за допомогою геміну, залізо-протопорфірину або кобальт-протопорфірину. Різноманітні агенти, що не містять гем, включаючи важкі метали, цитокіни, гормони, NO, COCl₂, ендотоксин і тепловий шок, також є сильними індукторами експресії НО-1 [Choi та інш., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517-554, 1997; і Tenhunen та інш., *J. Lab. Clin. Med.* 75: 410-421, 1970]. НО-1 також індукуються у високій мірі різноманітними агентами, що викликають окислювальний стрес, включаючи пероксид водню, агенти зниження глутатіону, УФ-опромінення, ендотоксин і гіпероксію [Choi та інш., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:517-554, 1997; і Keyse та інш., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 99-103, 1989]. Вираз "фармацевтична композиція, що містить індуктор НО-1" означає фармацевтичну композицію, яка містить будь-який агент, здатний індукувати НО-1 у пацієнта, наприклад, будь-який з описаних вище агентів, наприклад, NO, гемін, залізо-протопорфірин і/або кобальт-протопорфірин.

Експресію НО-1 в клітині можна підвищити за допомогою генного перенесення. Вираз "експресувати (експресований)", що використовується тут, означає - викликати підвищене виробництво білка, наприклад, НО-1 або феритину, у виділених клітинах або клітинах тканини, органі або тварині, використовуючи ген, що вводиться екзогенно (наприклад, рекомбінантний ген). Переважно, щоб НО-1 або феритин відповідали тому ж виду (наприклад, людина, миша, щур та інш.), що і реципієнт, щоб знизити до мінімуму імунну реакцію. Експресію можна управляти за допомогою існуючих промоторів (наприклад, цитомегаловірусних промоторів) або тканеспецифічного промотору (наприклад, молочнокисло-сироваткового промотору для клітин молочної залози або альбумінового промотору для клітин печінки). Відповідний вектор для генної терапії (наприклад, ретровірус, аденовірус, аденопов'язаний вірус (AAV), вірус віспи (наприклад, вакцині), вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), мінут-

вірус мишей, вірус Гепатиту В, вірус грипу, вірус герпесу-1 і лентівірус), що кодує HO-1 або феритин, вводять пацієнту, страждаючому або схильному до ризику захворювання гепатитом, через рот, за допомогою інгаляції або ін'єкції в печінку. Аналогічно плазмідні вектори, що кодують HO-1 або апоферитин, можна вводити, наприклад, як «оголену» ДНК в ліпосоми або мікрочастинки.

Крім того, екзогенний білок HO-1 можна вводити безпосередньо пацієнту будь-яким відомим в даній галузі способом. Екзогенну HO-1 можна безпосередньо вводити в доповнення або по чергою з індукцією або експресією HO-1 у пацієнта, як описано вище. Білок HO-1 можна доставляти пацієнту, наприклад, в ліпосомах і/або у вигляді злитого білка, наприклад, ТАТ-злитого білка [дивись, наприклад, Becker-Hapak та інш., *Methods* 24: 247-256, 2001].

По-іншому або в доповнення до цього, можна вводити пацієнту будь-який з продуктів метаболізму за допомогою HO-1, наприклад, білірубін, білівердин, залізо і/або феритин в поєднанні з СО для профілактики або лікування гепатиту. Крім того, в даному винаході передбачається, що можна вводити пацієнту молекули, які зв'язують залізо, відмінні від феритину, наприклад, десфероксамін (ДФО), залізо-декстран і/або апоферитин. Ще в даному винаході передбачається, що можна інгібувати ферменти (наприклад, білівердинредуктазу), які каталізують руйнування будь-яких цих продуктів, щоб створювати/підвищувати бажаний ефект. Будь-яку з вказаних вище речовин можна вводити, наприклад, перорально, внутрішньовенно, внутрішньочеревинно або прямим введенням в печінку.

В даному винаході розглядається також, що сполуки, які вивільняють СО в організм після введення даної сполуки (наприклад, СО-вивільняючі сполуки, такі як фотоактивовані СО-вивільняючі сполуки), наприклад, димарганецьдекарбоніл, димер трикарбонілдихлорутенію (II) і метиленхлорид (наприклад, при дозі від 400 до 600 мг/кг, наприклад, приблизно 500 мг/кг) можна також застосовувати в способах даному винаходу як заміники карбоксигемоглобіну і СО-донорного гемоглобіну.

Вказані вище сполуки можна вводити пацієнту будь-яким способом, наприклад, перорально, внутрішньочеревинно, внутрішньовенно або внутрішньоартеріально. Будь-яку з вказаних вище сполук можна вводити пацієнту локально і/або системно і в будь-якій комбінації.

В даному винаході розглянуте також лікування/профілактика гепатиту за допомогою введення СО пацієнту в комбінації з будь-якими іншими відомими способами або сполуками для лікування гепатиту, такими як припинення або зниження введення причинних ліків; введення пацієнту кортикостероїдів і/або α-інтерферону або інших протівірусних агентів; і/або проведення хірургічної операції на пацієнтові, наприклад, трансплантації печінки.

Даний винахід частково ілюструють наведені далі приклади, які жодним чином не є обмежувальними.

Приклад 1.

Монооксид вуглецю ослабляє ураження печінки

Тварини

Для *in vivo* експериментів використали 8-12-тижневих самців C57BL/6J (Charles Rivers Laboratories, Bar Harbor, ME) з потомства *inos^{-/-}*-мишей і мишей дикого типу (виведені/утримувалися в університеті Пітсбурга).

Моделі гострого ураження печінки

Групам мишей вводили TNF-α/D-gal (0,3мкг/8мг/миша, внутрішньочеревинно, відповідно). В залежності від експериментальних умов деякі миші приймали СО (250млн.ч.), селективний NO-донор O₂-вініл-1-(піролідін-1-іл)діазен-1-іум-1,2-діолат (V-PYRRO; 10мг/кг підшкірно (s.c), Alexis Biochem., San Diego, CA) або кобальт-протопорфірин (CoPP, 5мг/кг, внутрішньочеревинно (i.p.), Frontier Scientific, Logan, UT). Крім того, якщо указано, то вводили селективний інгібітор iNOS L-N6-(l-іміноетил)лізидингідрохлорид (L-NIL; 5мг/кг, внутрішньочеревинно, Alexis BiochemicaJs) або інгібітор HO-1 олово-протопорфірин (SnPP; 50мкмоль/кг, внутрішньочеревинно, Frontier Scientific). Якщо указано, вводили ацетамінофен (Sigma Chem. Co.; St Louis, MO) (500мг/кг, внутрішньочеревинно).

Клітинна культура гепатоцитів

Первинні гепатоцити миші виділяли з C57BL/6J, *mkk3^{-/-}*, *inos^{-/-}* (колонії, виведені в лабораторних умовах) або *hmx-1^{-/-}* мишей, як описано в [роботі Кіш та інш. (*J. Biol. Chem.* 272:1402-1411 (1997))]. Гепатоцити застосовували на 1-3 день після збирання.

Індукція загибелі/апоптозу гепатоцитів

Клітини обробляли TNF-α (10нг/мл) і актиноміцином-D (Act-D; 200нг/мл, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), індукуючи загибель клітин. Показано, що TNF-α/ActD обробка індукує загибель клітин, зокрема апоптоз, в первинних гепатоцитах [дивись, наприклад, Kim та інш., *J. Biol. Chem.* 272: 1402-1411 (1997)]. Гепатоцити обробляли СО, NO-донором s-нітрозо-N-ацетилпеніциламіном (SNAP; 250-750мкМ) і/або додатковими фармакологічними агентами, де указано. Через дванадцять годин після TNF-α/ActD-обробки клітини промивали і забарвлювали за допомогою барвника кристалічного фіолетового для визначення життєздатності, як описано раніше (там же). Де указано, вводили *in vitro* селективний iNOS-інгібітор L-N5-(l-іміноетил)орнітин-2HCl (LNIO; 1-2мМ; Calbiochem, San Diego, CA).

Генне перенесення/плазмід

У деяких експериментах за 12год. до обробки TNF-α/ActD проводили генне перенесення супресору IκBα [Hellerbrand та інш., *Hepatology* 27:1285-1295 (1998)] або β-галактозидази, застосовуючи аденовірусні вектори (10б.у.о./клітину). Активність NF-κB оцінювали, застосовуючи люциферазний репортерний аналіз, який описаний в [роботі Chow та інш. (*J. Biol. Chem.* 274:10689-10692 (1999))]. Викладаючи стисло, гепатоцити котрансфікували із застосуванням NF-κB-репортерних конструкцій (pGL3-караф люцифераза, 100нг/комірку; і pREP-Lac-z 0,5мкг/комірку), використовуючи Lipofectin™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) як указано виробником.

Оцінку експресії iNOS проводили, застосовуючи люциферазний репортерний аналіз, який описаний в [роботі Lowenstein та інш. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 9730-9734 (1993))]. Викладаючи стисло, гепатоцити котрансфікували із застосуванням iNOS-промоторних репортерних конструкцій (pXP2; 1 мкг/комірку) і pIER-LacZ (0,5 мкг/комірку), як описано вище.

Люциферазний репортерний аналіз

Гепатоцити трансфікували за допомогою плазмід, як описано вище, і через 24 год. після трансфекції обробляли різними стимулами. Через 6 год. після початку обробки аналізували люциферазну активність (наведену в умовних одиницях У.О.), застосовуючи набір для аналізу люциферази (Promega, Madison, WI) і люмінометр Бертольда (Berthold). Результати коректували відповідно до ефективності трансфекції і концентрації білка.

Дослідження зсуву електрофоретичної активності

Після обробки ядра екстрагували з гепатоцитів. У консенсусну послідовність дволактової ДНК NF- κ B (GGGGACTTCC (SEQ ID NO:1); Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) вводили мітку [γ - 32 P]-ATP та інкубували з 5 мг загального ядерного білка. Деякі інкубування проводили в присутності антитілу проти p65/RelA або p50 (Santa Cruz Biotech) для оцінки суперзсуву. Дослідження зсуву електрофоретичної мобільності (EMSA) проводили, як описано в [роботі Taylor та інш. (J. Biol. Chem. 273:15148-15156 (1998))].

Імуноблот-аналіз

Вестернблот-аналіз проводили на первинних гепатоцитах в культурі або з гомогенатів печінки, застосовуючи антитіла до iNOS (Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, 1:1000), HO-1 (Calbiochem; 1:2000) або β -актин (Sigma Chemical; 1:5000). Завантажували по тридцять мкг білка в експериментах з клітинною культурою або 100 нг білка з гомогенатів печінки на комірку для електрофорезу в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE).

Гістологія/імуногістохімія

Для гістології та імуногістохімії, печінку фіксували в 2% параформальдегіді і потім швидко заморожували в рідкому азоті. Готували зрізи печінки (товщиною 7 мікрон) і забарвлювали гематоксиліном та еозином (H&E). Зрізи печінки забарвлювали також для детектування TUNEL і активованої каспази-3, застосовуючи набори згідно з інструкціями виробників (Promega). Зрізи на iNOS імуногістохімію блокували 5% козячою сироваткою, що містить 0,2% бичачий сироватковий альбумін. Після чого зрізи інкубували протягом 1 год. при кімнатній температурі з анти-iNOS антитілами (Transduction Laboratories; 1:300), потім промивали і досліджували, застосовуючи вторинні антитіла в поєднанні з Aieha-488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Ядра забарвлювали барвником «Hoechst dye». Зображення одержували, використовуючи мікроскоп Olympus Provis. Гепатоцити в культурі висівали на желатиноване покривне скло, стимулювали, як указано, і потім фіксували в 2% параформальдегіді, що містить 0,1% Triton X-100. Застосовували однакове блокування і забарвлен-

ня для зрізів печінки за винятком анти-p65/RelA антитілу (Santa Cruz Biotechnology; 1:350).

Вплив СО

Тварин піддавали дії СО при концентрації 250 млн.ч. Викладаючи стисло, 1% СО в повітрі змішували з повітрям (21% кисню) в змішувальному циліндрі з неіржавіючої сталі і потім направляли в скляну камеру для впливу з об'ємом 0,1 м³ (3,70 фут³) з швидкістю потоку 12 л/хв. Для постійного вимірювання рівнів СО в камері застосовували аналізатор СО (InterScan, Chatsworth, CA). Концентрацію СО підтримували при 250 млн.ч. протягом всього часу. Якщо було потрібно, мишей вміщували в дану камеру для впливу.

HO-1 захищає від ураження печінки.

Заявники досліджували, чи є HO-1 захистом від гострого порушення печінки. Результати представлені на Фіг.1. Самцям мишей C57BL/6J вводили кобальт-протопорфірин (5 мг/кг, внутрішньочеревинно). Через двадцять чотири години мишам вводили TNF- α /D-gal (0,3 мкг/8 мг/миша, внутрішньочеревинно, відповідно). Через 8 год. після введення TNF- α /D-gal вимірювали рівні сироваткової аланінамінотрансферази (ALT). Індукція HO-1 запобігає ураженню печінки, що визначали за рівнями сироваткової ALT.

Екзогенний СО захищає гепатоцити

Заявники досліджували, чи є екзогенний СО захистом від загибелі клітин гепатоцитів *in vitro*. Результати представлені на Фіг.2 і 3. Для одержання даних, представлених на Фіг.2, гепатоцити мишей заздалегідь інкубували з СО (250 млн.ч.) протягом 1 год. (стандартний час попередньої обробки для всіх експериментів) до додавання TNF- α /Act-D (10 нг/200 нг/мл, відповідно). Клітини витримували в СО протягом експерименту. Через дванадцять годин після цього визначали життєздатність клітин, як описано в [роботі Kim та інш. (J. Biol. Chem. 272:1402-1411 (1997))]. Аденовірусні експерименти включали інкубування гепатоцитів протягом ночі з 106 у.о./клітину аденовірусу до додавання TNF- α /ActD і потім дослідження життєздатності із застосуванням барвника кристалічного фіолетового. На даній моделі досліджували також ролі сигнальних молекул гуанілілциклази і р38 MAPK. Для оцінки ролі cGMP і підтвердження ролі NF- κ B гепатоцити обробляли окремо інгібітором розчинної гуанілатциклази (sGC) 1H-[1,2,4]оксадіазоло[4,3-а]хіноксалін-1-оніом (ODQ; Calbiochem; 2-10 мкМ) або NF- κ B-інгібітором BAY 11 7082, (10 мкМ). Клітини обробляли інгібіторами протягом 1 год. до 1-годинної попередньої обробки СО. Потім додавали TNF- α /ActD і досліджували клітини на життєздатність через 12 год. NF- κ B-активація є критичною для захисту, викликаного СО, тоді як cGMP в це не включений. Вплив СО веде до істотно меншої загибелі клітин (* p <0,01), ніж за відсутності СО.

Для одержання даних, представлених на Фіг.3 первинні гепатоцити людини, одержані при резекції печінки донора, обробляли СО і TNF- α /ActD, як описано вище.

Вплив СО на первинні гепатоцити миші, щура і людини інгібують TNF- α -індукований апоптоз. Інгібування апоптозу гепатоцитів не залежить від ге-

нерації cGMP, оскільки селективний інгібітор гуанілілциклази ODQ не анулює захист, забезпечений CO (Фіг.2). Крім того, CO-обробка інгібує загибель клітин у присутності SB203580 (3-30мкМ, Calbiochem), селективного інгібітора активації p38 MAPK, і в гепатоцитах $mkk3^{-/-}$ мишей домінантною оберненою кіназою для p38 (дані не показані). Таким чином, ефекти CO не залежать від cGMP/p38 MAPK-шляху. В даних експериментів, гепатоцити заздалегідь обробляли CO протягом однієї години до додавання до середовища TNF- α /ActD. Якщо CO-обробку починали після додавання TNF- α , спостерігали менший захист (дані не показані).

Роль NF- κ B в CO-захисті

Заявники досліджували, чи залежить CO-індукований захист гепатоцитів від NF- κ B. На Фіг.4, 5 і 6A-6C наведені дані, які показують, що CO індукує підвищення ядерної транслокації NF- κ B і ДНК-зв'язування в гепатоцитах мишей, що визначали за активністю NF- κ B в люциферазному репортерному аналізі, EMSA і за імунозбарвленням для детектування ядерної транслокації RelA/p65, відповідно.

Для одержання даних, представлених на Фіг.4, проводили оцінку активації NF- κ B, застосовуючи люциферазний репортерний аналіз, як описано в [роботі Chow та інш. (J. Biol. Chem. 274: 10689-10692 (1999))]. Викладаючи стисло, гепатоцити котрансфікували із застосуванням NF- κ B-репортерних конструкцій і pIEP-Lac-z за 24 год. до додавання BAY 11-7082 (10мкМ) або носія. Клітини інкубували протягом 1 год. до CO (250млн.ч.). Люциферазну активність (наведена в умовних одиницях; У.О.) оцінювали через 6 год. після впливу CO або суміші цитокінів (СМ), складеної з TNF- α (500Од/мл), IL-1 β (100Од/мл) і IFN- δ (100Од/мл), яку застосовували як позитивний контроль для активації NF- κ B. Результати коректували відповідно до ефективності трансфекції і концентрації білка.

Для одержання даних, представлених на Фіг.5, оцінювали зв'язування ДНК NF- κ B, застосовуючи EMSA в гепатоцитах, оброблених CO (250млн.ч.). Відмічали підвищення NF- κ B-зв'язування (всього), що залежить від часу, з піком експресії через 1 годину (смуги 1, 4, 7). Потім здійснювали суперзсув екстрактів з метою ідентифікації різних димерів NF- κ B, застосовуючи антитіла проти p50 (лінії 2, 5, 8) і p65 (лінії 3, 6, 9). Для одержання даних, представлених на Фіг.6A-6C, виконували імунозбарвлення первинних гепатоцитів для визначення ядерної локалізації p65 після впливу CO (250млн.ч.) протягом 1 год. Зображення представляють ядерну транслокацію NF- κ B (стрілки, які вказують на зелені ядра, що показує транслокацію NF- κ B) в СМ (як позитивний контроль) і CO-оброблених клітинах відносно відсутності локалізації в клітинах, оброблених повітрям (стрілки, які вказують на сині ядра).

Активність NF- κ B в люциферазному репортерному аналізі досягає піка через годину після вміщення клітин в атмосферу CO. У групи обробки включали суміш цитокінів (СМ) як позитивний сигнал, а також стандарт для оцінки максимальної репортерної активності, за якою оцінювали ефекти

CO. Ефективність трансфекції в первинних гепатоцитах ускладнена, але репортерна активність дуже суттєва (* $p < 0,001$ відносно контролю). Ці дані, об'єднані з позитивним імунозбарвленням і EMSA дають підтвердження зауваженню, що CO індукує помірне підвищення NF- κ B, що саме по собі може частково давати селективну генну експресію. Для оцінки, чи необхідна активність NF- κ B для захисту, опосередкованого CO, застосовували аденовірусне генне перенесення I κ B α з метою запобігання транслокації NF- κ B і використали BAY 11-7082 (1-10мЛМ, Calbiochem) для інгібування активації NF- κ B. Інгібуючи активацію NF- κ B, анулювали захисні ефекти CO.

Роль NF- κ B-залежної експресії iNOS в CO-захисті

Заявники досліджували, чи необхідна експресія iNOS і генерація NO для CO-опосередкованого захисту гепатоцитів. Результати представлені на Фіг.7, 8 і 9. Для одержання даних, представлених на Фіг.7, проводили оцінку експресії iNOS, застосовуючи люциферазний репортерний аналіз, як описано в [роботі Lowenstein та інш. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90: 9730-9734 (1993))]. Викладаючи стисло, гепатоцити котрансфікували із застосуванням iNOS-промоторної репортерної конструкції і pIEP-LacZ за 24 год. до впливу BAY 11-7082 (10мкМ) або носія. Клітини інкубували з BAY за 1 годину до впливу CO (250млн.ч.). Досліджували люциферазну активність (наведену в умовних одиницях; У.О.), як описано вище. Суміш цитокінів (СМ; дивись вище) застосовували як позитивний контроль для індукції iNOS-експресії і результати коректували відповідно до ефективності трансфекції і концентрації білка.

Для одержання даних, представлених на Фіг.8, експресію білка iNOS оцінювали, застосовуючи методику імуноблотингу. Викладаючи стисло, клітинні екстракти з гепатоцитів обробляли TNF- α /ActD протягом 6-8 год. у присутності і за відсутності CO (250млн.ч.). Контрольні клітини приймали повітря або тільки CO. На Фіг.8 зазначено, що TNF- α мінімально індукує iNOS-експресію, тоді як клітини, оброблені TNF- α у присутності CO, показують суттєво більшу індукцію в білку iNOS.

Для одержання даних, представлених на Фіг.9, виділяли гепатоцити мишей з $inos^{-/-}$ або мишей дикого типу C57BL/6J, які потім заздалегідь обробляли протягом 1 год. L-NIO (1тМ) для інгібування iNOS до введення CO. Ці групи, що піддаються дії CO, приймали одногодинну обробку до додавання TNF- α /ActD і потім знов оброблялись CO. Як оцінювали через 12 год. за допомогою виключення кристалічного фіолетового, в клітинах, де відсутня або інгібована iNOS-експресія, CO не забезпечує захисту від загибелі клітин.

Вплив CO на гепатоцити продукує суттєве підвищення активності в iNOS люциферазному репортерному аналізі (Фіг.7). Суміш цитокінів знову використали як позитивний контроль в цих низько-ефективних трансфекціях і як стандарт, за яким оцінювали ефекти CO. Разом з NF- κ B-залежністю iNOS-експресії, спостерігали знижену репортерну активність в гепатоцитах, оброблених BAY 11-7082 (Фіг.7). Крім того, помітно збільшений білок iNOS у

відповідь на TNF- α в присутності CO в порівнянні з TNF- α самим по собі (Фіг.8). Застосовуючи гепатоцити від мишей зі зменшеною iNOS-активністю (inos^{-/-}) і гепатоцити дикого типу, оброблені селективним iNOS-інгібітором L-NIO (1мМ, Calbiochem), заявники досліджували питання, чи може CO захистити від TNF- α -індукованої загибелі за відсутності iNOS-активності. Гепатоцити з нестачею iNOS активності не захищені CO від TNF- α -індукованої загибелі клітин, тоді як гепатоцити дикого типу захищені (Фіг.9). Ці дані, взяті разом, показують, що для захисту гепатоцитів від клітинної загибелі in vitro при використанні CO потрібна NF- κ B-активація і iNOS-експресія.

CO, що вводиться за допомогою інгаляції, захищає від ураження печінки

На моделі TNF- α /D-gal заявники досліджували, чи захищає CO, що вводиться за допомогою інгаляції, мишей від ураження печінки, що швидко розвивається. Результати представлені на Фіг.10 і 11A-11H.

Для одержання даних, представлених на Фіг.10, мишей заздалегідь обробляли CO (250млн.ч.) протягом години до прийому TNF- α /D-gal (0,3мкг/8мг/миша; внутрішньочеревинно, відповідно). Після прийому TNF- α /D-gal на мишей знов повертали в камеру для впливу CO і через 6-8год. аналізували їх сироватку на вміст ALT. Без впливу CO ураження печінки відбувалось за 6-8год., головним чином, в результаті апоптозу гепатоцитів, як на in vitro моделі, описаній вище. Сироваткова ALT у мишей, оброблених CO, складає на 74% менше, ніж у мишей, що піддаються дії повітря.

Для одержання даних, представлених на Фіг.11A-11H, готували зрізи зразків печінки мишей, оброблених TNF- α /D-gal у присутності і за відсутності CO (250млн.ч.) протягом 8год., і забарвлювали для детектування гематоксиліну і еозину (H&E), активованої каспази-3 (що показує збільшення червоної інтенсивності) і TUNEL-позитивних клітин (обмежених збільшеним зеленим клітинним забарвленням; маркер загибелі клітин). Ядра забарвлені в синій колір.

Вплив CO помітно знижує TNF- α /D-gal-індуковане ураження печінки, яке оцінювали за H&E забарвленням. Печінки мишей, що піддаються дії CO, також демонструють менше TUNEL-позитивних клітин, демонструють менше забарвлення активованої каспази-3 і мають нормальну форму. Контрольні миші, що піддаються дії повітря, які приймають TNF- α /D-gal, демонструють помітне запалення печінки, набряк, кровотечу і втрату форми.

Результати, що обговорюються вище, підтверджували, застосовуючи ліпополісахарид (LPS, що також позначається як ендотоксин) замість TNF. У даних підтверджуючих дослідженнях введення LPS/D-Gal дає в результаті підвищення рівнів сироваткової ALT від контрольного рівня на 20+/-5Міжн.од./мл до >1000Міжн.од./мл, що вимірювали через 8год. після введення LPS/D-Gal.

У мишей, заздалегідь оброблених 250млн.ч. CO, збільшення ALT знижене на >75%, до 250+/-75Міжн.од./мл. Для додаткової характеристики ефектів, що спостерігаються при використанні CO

на даній моделі, визначали сироватковий інтерлейкін-6 і виявили, що він знижений до 65% у тварин, що вдихають CO, відносно контрольних тварин, що вдихають повітря (дані не показані). Гістопатологія тканини печінки цих мишей аналогічна гістопатології, що демонструється із застосуванням TNF/D-Gal. Не оброблені і CO-оброблені миші (без LPS/D-Gal) не мають ознак ураження, тоді як миші, оброблені повітрям і LPS/D-Gal, показують помітне ураження, включаючи набряк, кровотечу, інфільтрацію нейрофілів і загальну деструкцію нормальної морфології і форми. У протилежність цьому, печінки мишей, оброблених CO і LPS/D-Gal, захищені в деякій мірі, як і у мишей, оброблених CO і TNF/D-Gal. Спостерігали деякі зміни в маркерах запалення (набряку, кровотечі, інфільтрації нейрофілів). Форма зберігається і грубо здається аналогічною для не оброблених і CO-оброблених (за відсутності LPS/D-Gal) мишей. Скрізь паралельно застосовували LPS/D-Gal для індукування гострого гепатиту, і це підтверджує дані, одержані із застосуванням TNF/D-Gal-обробки.

Роль iNOS в CO-захисті від ураження печінки

Застосовуючи методики імуноблотингу та імуногістохімію, заявники досліджували, чи збільшуються рівні iNOS-білка в печінці мишей, які піддаються CO-впливу після обробки TNF- α /D-gal. Крім того, заявники досліджували, чи захищає CO inos^{-/-}-мишей або мишей дикого типу, оброблених селективним iNOS-інгібітором L-NIL (10мг/кг, внутрішньочеревинно; дозовано, кожні 2год.), для визначення, чи грає iNOS-експресія функціональну роль. Результати представлені на Фіг.12, 13A-13D і 14.

Для одержання даних, представлених на Фіг.12, самців мишей C57BL/6J обробляли повітрям або CO (250млн.ч.) за 1 годину до введення TNF- α /D-gal (0,3мкг/8 мг/миша, внутрішньочеревинно, відповідно). Через шість год. печінки витягували для оцінки iNOS-експресії за допомогою імуноблотингу. Результати показують, що iNOS-експресія помірно збільшується у повітря/TKG- α /D-gal-оброблених мишей, але помітно збільшується у мишей, оброблених TNF- α /D-gal і CO. Як очікувалося, inos^{-/-}-миші не показують експресії iNOS-білка.

Для одержання даних, представлених на Фіг.13A-13D, виконували імунозабарвлення зрізів печінки мишей для детектування iNOS-експресії. Зрізи печінки одержували від мишей, оброблених TNF- α /D-gal у присутності або за відсутності CO, і від повітря- і CO-контрольних мишей, які не приймали TNF- α /D-gal. Печінки мишей, що піддаються дії CO і не приймають TNF- α /D-gal, демонструють помірне збільшення iNOS-експресії. Однак суттєво більше підвищення експресії (указано збільшенням забарвлених в зелений колір клітин) спостерігали в печінці мишей, які піддавались дії CO і приймали TNF- α /D-gal. Зрозуміло, що підвищена експресія локалізована навколо кровоносних судин. Для одержання даних, представлених на Фіг.14, досліджували ефективність CO-індукованого захисту за відсутності iNOS-активності, застосовуючи мишей inos^{-/-} і дикий тип,

яких обробляли L-NIL, селективним інгібітором iNOS (L-NIL; 5мг/кг, внутрішньочеревинно, дозовано, кожні дві години). L-NIL вводили за 2год. до СО. СО-оброблених тварин потім заздалегідь обробляли (250млн.ч.) протягом 1год. до TNF- α /D-gal. За відсутності iNOS-функції/експресії, СО не здатний захистити від ураження печінки, що оцінювали за рівнями сироваткової ALT і за допомогою гістопатології (дані не показані).

Таким чином, ясно, що захисний ефект СО, який вдихується, при TNF- α -індукованому ураженні печінки залежить від iNOS-активності.

Роль HO-1 в СО-захисті від гострого ураження печінки

Заявники досліджували, чи здійснюють СО і NO захист проти гострого ураження печінки за HO-1-залежним механізмом. Дані представлені на Фіг.15, 16, 17 і 18.

Для одержання даних, представлених на Фіг.15, проводили імуноблотинг з метою спостереження експресії HO-1 в печінці мишей, які приймали TNF- α /D-gal, у присутності і за відсутності СО (250млн.ч.). СО-оброблені миші показують суттєве збільшення експресії HO-1 у присутності і за відсутності TNF- α /D-gal.

Для оцінки ролі iNOS в TNF- α /D-gal-індукованій експресії HO-1 в печінці (дані представлені на Фіг.16) мишам вводили L-NIL (5мг/кг, внутрішньочеревинно) за 2год. до попередньої обробки СО (250млн.ч.) і кожні 2год. після цього. Контрольні миші приймали L-NIL і залишалися в кімнатному повітрі. На Фіг.16 зазначено, що СО збільшує експресію HO-1 у мишей, оброблених носієм, але не здатний індукувати експресію при інгібуванні iNOS. Обробка тільки L-NIL надає мінімальний ефект на експресію HO-1.

Для перевірки захисної ролі СО-індукованої HO-1 (дані представлені на Фіг.17), мишам давали SnPP (50мкмоль/кг, підшкірно), селективний інгібітор HO-1, за 5год. до СО. По іншому, мишам давали VPYRRO (VP), донор NO (10мг/кг, підшкірно). VP селективно призначений для доставки NO безпосередньо в печінку. Через годину після початкової дози VP тварин піддавали дії СО протягом 1год. до введення TNF- α /D-gal (дивись вище). Через 6-8год. визначали рівні сироваткової ALT. Зазначимо, що СО не здатний забезпечити захист у тварин, де активність HO-1 блокована. VP, якщо вводиться за 2год. до і потім кожні 2год. після цього, забезпечує захист від ураження, що визначали через 8год. за допомогою визначень сироваткової ALT.

Для одержання даних, представлених на Фіг.18, мишей дикого типу C57BL/6J заздалегідь обробляли протягом 24год. L-NIL в питній воді (4,5мМ), як описано в [роботі Stenger та інш. (J. Exp. Med. 183: 1501-1514 (1996))]. Потім цим мишам і iNOS^{-/-}-мишам вводили CoPP. Протягом експерименту у воді підтримували L-NIL. Контрольні і iNOS^{-/-}-миші приймали звичайну питну воду. Через двадцять чотири години після введення CoPP вводили TNF- α /D-gal і через 6-8год. визначали сироваткову ALT. На Фіг.18 зазначено, що індукція HO-1 забезпечує захист не залежно від присутності iNOS.

Імуноблотинг екстрактів печінки мишей, оброблених СО у присутності або за відсутності TNF- α /D-gal, показує позитивну регуляцію HO-1 (Фіг.15). Додавання iNOS-інгібітора L-NIL до даних вказаних вище груп, які анулюють захист (Фіг.17), також запобігає позитивній регуляції HO-1 (Фіг.16). Для визначення, чи є HO-1 центральною відносно викликаного СО захисту печінки, застосовували олово-протопорфірин-IX (SnPP, 50мкмоль/кг, підшкірно, Frontier Scientific) як селективний інгібітор активності HO-1. SnPP істотно зменшує захисні ефекти СО на даній моделі (Фіг.17). Введення SnPP за відсутності TNF- α /D-gal не надає шкідливих або захисних ефектів (дані не показані). Ці результати передбачають, що позитивна регуляція HO-1 є важливою для захисних ефектів СО.

Для визначення, чи необхідна також позитивна регуляція HO-1, якщо захист ініційований NO, мишей обробляли фармакологічним NO-донором V-PYRRO/NO. Даний агент перетравлюється печінкою, даючи в результаті вивільнення NO гепатоцитами. V-PYRRO/NO також забезпечує захист після введення LPS/D-gal або TNF- α /D-gal. Для оцінки ролі HO-1 мишей вибирали випадковим чином і обробляли TNF- α /D-gal, з SnPP або без нього. V-PYRRO/NO надає захисну дію, що визначали за сироватковою ALT. Однак SnPP анулює здатність даного NO-донора захищати від ураження печінки (Фіг.17). Таким чином, зрозуміло, що СО- або NO-ініційований захист печінки, щонайменше, частково залежить від HO-1.

Оскільки ці дані передбачають, що СО і NO мають потребу в HO-1-активності для захисту проти TNF- α -індукованої загибелі гепатоцитів, заявники досліджували, чи потрібна iNOS-активність для захисту, опосередкованого HO-1. Використовуючи iNOS^{-/-}-мишей, індукували HO-1 за допомогою введення CoPP. Через 24год. після цього вводили шляхом ін'єкції TNF- α /D-gal на піку HO-1-експресії і через 6-8год. оцінювали ураження печінки. Результати показують, що індукція HO-1 здатна істотно запобігати ураженню печінки незалежно від iNOS-активності при >50% зменшенні сироваткової ALT (Фіг.18). Ці результати підтверджували, застосовуючи L-NIL. Мишей заздалегідь обробляли питною водою, що містить L-NIL (4,5мМ), протягом 24год. Даний спосіб ефективно інгібує NOS-активність. Контрольні миші приймали звичайну воду. Потім вводили CoPP з метою індукування експресії HO-1 і через 24год. після цього мишам вводили TNF- α /D-gal. Обробка тільки L-NIL не змінює тяжкості ураження, індукованої на даній моделі. Всі тварини, що приймають CoPP (з L-NIL або без нього), одержують захист від ураження печінки (Фіг.18).

Заявники досліджували, чи є експресія HO-1 необхідною для СО- або NO-індукованого захисту від TNF- α /ActD-індукованої клітинної загибелі гепатоцитів. Дані представлені на Фіг.19 і 20.

Для одержання даних, представлених на Фіг.19, гепатоцити мишей виділяли з потомства мишей, які не мають HO-1 (hmx-1^{-/-}), і мишей дикого типу (C57BL/6J), заздалегідь оброблених протягом 1год. СО (250млн.ч.) і оброблених TNF- α /ActD. Життєздатність досліджували, як описано

вище. СО суттєво захищає гепатоцити дикого типу, але не здатний захистити гепатоцити, виділені з $hmoх^{-/-}$ -мишей.

Для одержання даних, представлених на Фіг.20, гепатоцити мишей виділяли з потомства мишей, що не мають HO-1 ($hmoх^{-/-}$), і мишей дикого типу (C57BL/6J), заздалегідь оброблених NO-донором SNAP (500мкМ) і потім через годину оброблених TNF- α /ActD. Показано, що на даній моделі SNAP захищає гепатоцити. SNAP суттєво захищає від клітинної загибелі гепатоцити дикого типу, але не забезпечує суттєвого захисту від клітинної загибелі гепатоцитів, виділених з $hmoх^{-/-}$ -мишей.

Як обговорюється вище, оброблені повітрям клітини дикого типу і $hmoх^{-/-}$, що піддаються дії TNF- α /ActD, як очікувалося, відчують клітинну загибель, тоді як СО- або NO-оброблені клітини дикого типу захищені у присутності TNF- α /ActD (Фіг.19 і 20). Захист, одержаний при обробці СО і NO, ослабляється в клітинах з нестачею функціональної HO-1 ($hmoх^{-/-}$). Таким чином, HO-1, мабуть, може забезпечити захист на даній моделі без залучення iNOS, передбачаючи, що HO-1 або один або більше її каталітичних продуктів можуть частково здійснювати цитозахисні ефекти на даній моделі.

СО, що вводиться за допомогою інгаляції, є захистом проти ацетамінофен-індукованого гепатиту

Заявники досліджували, чи є СО, що вводиться за допомогою інгаляції, захистом проти ацетамінофен (APAP)-індукованого гепатиту. Дані представлені на Фіг.21.

Для одержання даних, представлених на Фіг.21, самців мишей C57BL/6J піддавали дії СО (250млн.ч.) або за 1год. до, або через 4год. після введення APAP (500мг/кг, внутрішньочеревинно). Потім мишей витримували в СО протягом експерименту. Через 20год. після введення APAP визначали рівні сироваткової ALT. Контрольним мишам вводили APAP і витримували на повітрі. Даний протокол передбачає можливість розвитку гепатиту протягом чотирьох годин до введення СО. СО суттєво знижує ураження печінки, яку оцінювали за сироватковою ALT (622 ± 44 відносно 175 ± 137 , $p < 0,01$ в порівнянні з контролем).

Даний захист аналогічний захисту, що спостерігається в окремій групі тварин, яких заздалегідь обробляли СО до APAP. Ці дані підтверджують терапевтичне застосування СО в клінічно доречній ситуації, де обробку починали після стимуляції гепатиту.

Результати, що обговорюються в даному прикладі, демонструють, що низька концентрація СО може захищати проти TNF- α /D-gal-індукованого гепатиту, що швидко розвивається, та ілюструють унікальну і невідому раніше залежність від HO-1 і iNOS при СО-індукованому захисті печінки від ураження TNF- α /D-gal.

Не зв'язуючись теорією, можливо, що СО-опосередкований захист діє при активації NF- κ B, що у присутності запального стимулу веде до позитивної регуляції iNOS з подальшим виробництвом NO. У доповнення до індукції iNOS можуть бути індуковані інші NF- κ B-залежні антиапоптоз-

ні/захисні гени. Протягом 1-годинної попередньої обробки СО і до обробки клітин TNF- α відбувається суттєва активація NF- κ B, яка може становити частину ініціації клітинного апарату, що обговорюється вище. Активація NF- κ B оксидом вуглецю СО частково може відбуватись внаслідок помірного збільшення генерації видів реакційноздатного кисню, що походять з мітохондрій (попередні спостереження). Одна година може також забезпечити час для експресії NF- κ B-залежних антиапоптозних генів. Наступна стадія такої гіпотетичної моделі може вести до виробництва NO після позитивної регуляції iNOS. NO веде до позитивної регуляції HO-1, активність якої повідомляє захисні ефекти. Захисний ефект HO-1 може бути зумовлений видаленням гема або якого-небудь одного або декількох з трьох його продуктів: СО, білівердину/білірубину або заліза/феритину. За умови, що екзогенний СО вводять протягом проведення експериментів, здається малоймовірним, що сам по собі ендогенно продукований СО опосередковує HO-1-захист. Однак можна включити комбінацію СО з іншими продуктами HO-1 або ці інші продукти, які діють індивідуально. В описаному вище дослідженні СО вводять на клінічно доречній моделі ацетамінофен (APAP)-індукованого гепатиту, яка має таку ж часову протяжність як розвиток гострого гепатиту у людей. Дані показують, що вплив СО через 4год. після введення APAP (500мг/кг, внутрішньочеревинно) дає в результаті 62% зниження ураження печінки (Фіг.21). На паній моделі APAP-індукованого ураження печінки миші демонструють ознаки гепатиту через 2-4год. після введення APAP, і смерть настає через 24-48год. Таким чином, СО вводять після стимуляції ураження печінки. З даними, одержаними на APAP-моделі, узгоджуються результати, одержані на мишачій моделі геморагічного шоку, де терапевтична стимуляція СО, що вводиться за допомогою інгаляції, під час реанімації після 2,5-годинної фази шоку дає в результаті захист від ураження печінки (>65% зниження сироваткової ALT через 24год. $p < 0,01$; $n = 6-10$ /групу).

Викладаючи стисло, застосування моделі ураження печінки, що відбувається переважно в результаті TNF- α -індукованого апоптозу, продемонструвало наступне: по-перше, СО, що вдихується, може запобігати гепатиту на даній моделі; по-друге, захист із застосуванням СО вимагає утворення другої газоподібної молекули NO; по-третє, NO виробляє сприятливі ефекти, щонайменше, частково за допомогою позитивної регуляції HO-1, і, по-четверте, позитивна регуляція HO-1 є захисною, не маючи потреби в iNOS/NO-активності, тобто без обов'язкового продовження циклу.

Приклад 2.

Протокол лікування гепатиту

Наступний приклад ілюструє протоколи для застосування при лікуванні пацієнта, діагностованого як страждаючий гепатитом. Даний приклад також ілюструє протоколи лікування пацієнтів до, під час і/або після хірургічних операцій, наприклад, хірургічної операції по трансплантації печінки. Практикуючим фахівцям зрозуміло, що будь-який описаний тут протокол можна адаптувати, осно-

вуючись на індивідуальних потребах пацієнта, і можна адаптувати для використання в поєднанні з будь-яким іншим способом лікування гепатиту.

Лікування пацієнтів

Лікування пацієнта із застосуванням СО можна починати в день, коли пацієнту поставлений діагноз як страждаючому гепатитом, наприклад, гепатитом, викликаним вірусною інфекцією і/або зловживанням алкоголем. Пацієнт може бути діагностований лікуючим лікарем із застосуванням будь-якого відомого в даній галузі способу. Наприклад, лікуючий лікар може поставити такий діагноз, використовуючи дані аналізів крові, наприклад, аналізів із визначення рівнів сироваткової ALT і аналізів із визначення, чи не інфікований пацієнт конкретним вірусом (наприклад, яким-небудь відомим вірусом гепатиту). Крім того, ставлячи такий діагноз, лікуючий лікар може розглянути історію хвороби пацієнта (наприклад, врахувати, чи не є пацієнт алкоголіком або хронічним споживачем ліків). Пацієнт може вдихати СО при концентрації приблизно від 250 до 500млн.ч. протягом 1год. на день. Дане лікування можна продовжувати приблизно протягом 30 днів або доти, доки пацієнту більше не будуть ставити діагноз як такого, що хворіє, або схильного до ризику захворювання гепатитом.

Процедури трансплантації печінки

Обробка донора печінки

До вилучення печінки або її частини донора можна піддати обробці за допомогою інгаляції монооксидом вуглецю (250млн.ч.) протягом однієї години. Можна провести обробку при дозах в діапазоні від 10 до 1000млн.ч. протягом періодів часу в діапазоні від однієї до шести год. або протягом всього періоду від моменту, коли настає можливість обробити донора після смерті головного мозку (труп) до моменту видалення органу. Для донорів-людей обробку потрібно починати якнайшвидше після оголошення, що відбулась смерть головного мозку. У деяких застосуваннях може бути бажано почати обробку до смерті головного мозку.

Для тварин, відмінних від людей (наприклад, свиней), що використовуються як донори для ксєнотрансплантації, живу донорну тварину, якщо потрібно, можна піддати обробці монооксидом вуглецю при відносно високих рівнях монооксиду вуглецю, що вдихується, протягом такого часу, щоб продукований таким чином карбоксигемоглобін не піддавав ризику життєздатність і функцію підлягаючого трансплантації органу. Наприклад, можна застосовувати рівні більше 500млн.ч. (наприклад, 1000млн.ч. або вище і до 10000млн.ч., особливо протягом коротких періодів часу).

Обробка печінки на місці

Перед вилученням печінки у донора її можна промити або перфузувати розчином, наприклад, буфером або поживним середовищем, поки вона ще знаходиться в донорі. Значення полягає в тому, щоб промити печінку розчином, насиченим монооксидом вуглецю, і зберегти її в атмосфері монооксиду вуглецю, щоб вміст монооксиду вуглецю відповідав насиченню. Промивання можна провести протягом, щонайменше, 10хв., наприклад, 1год., декілька годин або довше. Ідеально розчин повинен доставляти максимально велику концентрацію монооксиду вуглецю, можливу для клітин печінки (або її частини).

Обробка печінки ex vivo

Печінку можна зберегти в поживному середовищі, яке включає моно оксид вуглецю, від моменту її видалення з донора до моменту трансплантації реципієнту. Це можна здійснити, витримуючи печінку в середовищі, що містить СО, або перфузуючи її таким поживним середовищем. Оскільки це відбувається швидше ex vivo, ніж в тварині, то можна застосовувати дуже високі концентрації газоподібного СО (наприклад, 10000млн.ч.) для підтримання насичення середовища СО.

Обробка печінки реципієнта

СО-обробку реципієнта можна починати в день трансплантації, щонайменше, за 30хв. до початку хірургічної операції. По-іншому, її можна починати, щонайменше, за 30хв. до реперфузії органу в організмі реципієнта. Обробку можна продовжувати протягом, щонайменше, 30хв., наприклад, 1год. Можна доставляти дози монооксиду вуглецю від 10 до 3000млн.ч. протягом різних періодів часу, наприклад, хвилин або годин, і можна застосовувати в день трансплантації і подальші дні. Наприклад, пацієнт може вдихати концентрацію монооксиду вуглецю, наприклад, 3000млн.ч. протягом трьох послідовних 10-секундних затримок дихання. По-іншому, можна доставляти меншу концентрацію газу періодично або постійно протягом більш тривалого часу, краще при регулярному диханні, ніж при затримці дихання. Концентрації карбоксигемоглобіну можна використати як орієнтир для відповідного введення монооксиду вуглецю пацієнту. Звичайно обробки реципієнтів не повинні підвищувати рівнів карбоксигемоглобіну вище значень, які, як вважають, дають допустимий ризик для пацієнта, потребуючого трансплантації.

Описаний ряд варіантів даного винаходу. Однак зрозуміло, що можна виробляти різні модифікації, не відхиляючись від духу і галузі даного винаходу. Таким чином, галузь формули, що слідує далі, винаходу включає інші варіанти.

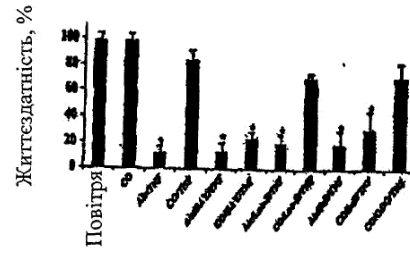


Fig. 1

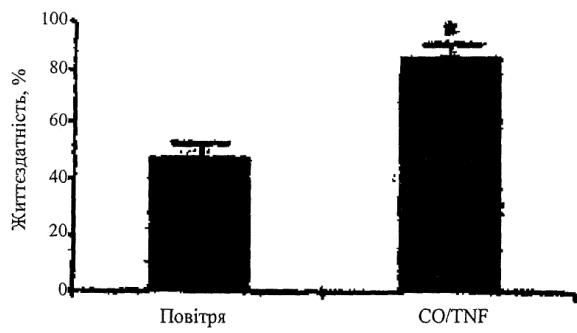


Fig. 2

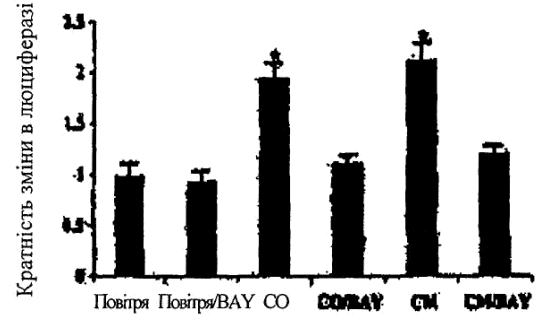
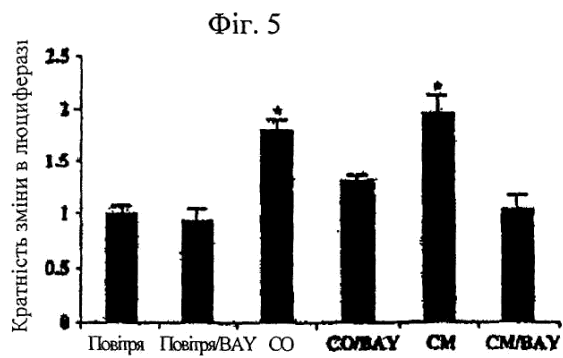
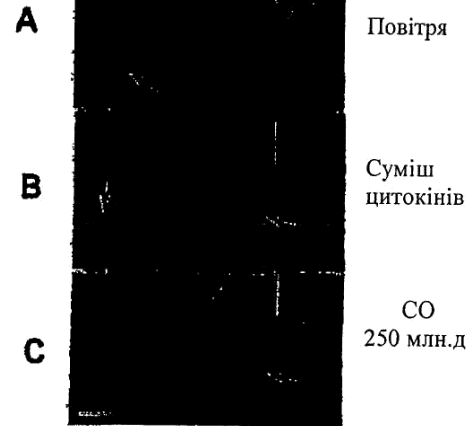
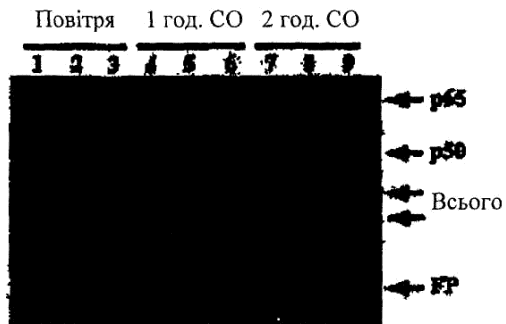
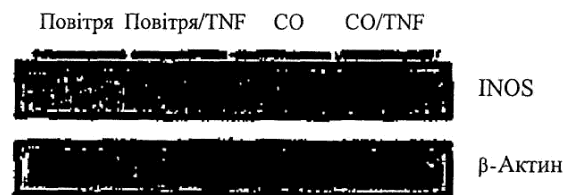


Fig. 3

Fig. 4

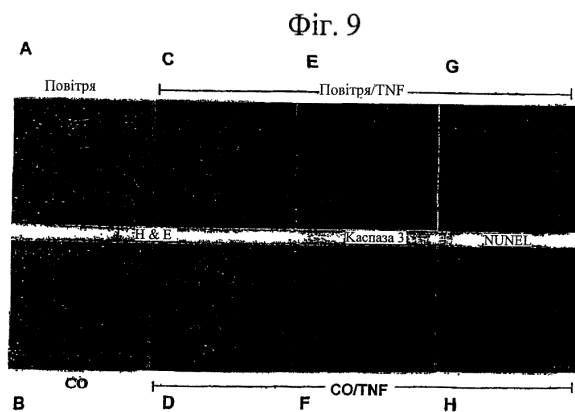
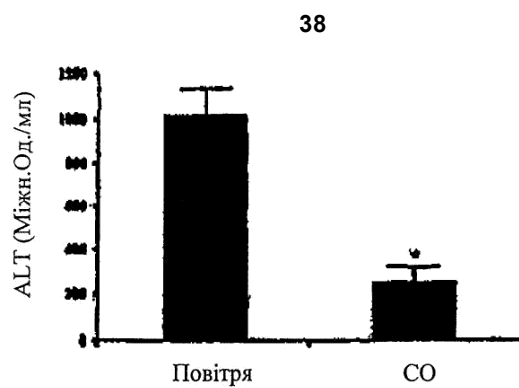
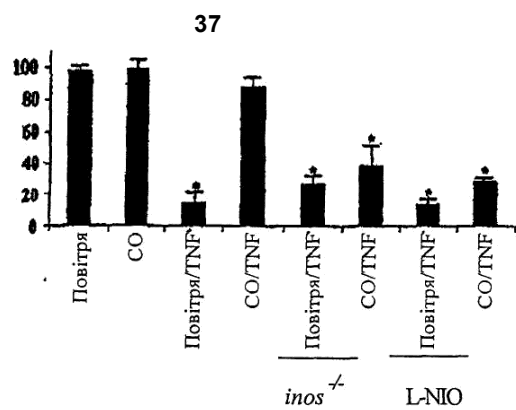


Фіг. 6A-6C

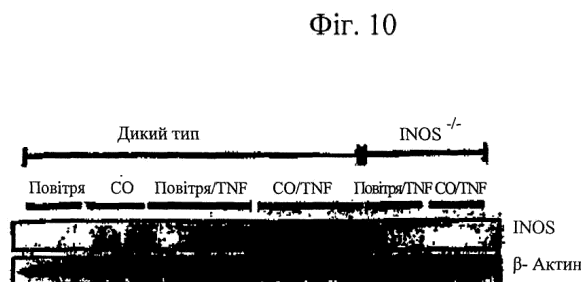


Фіг. 7

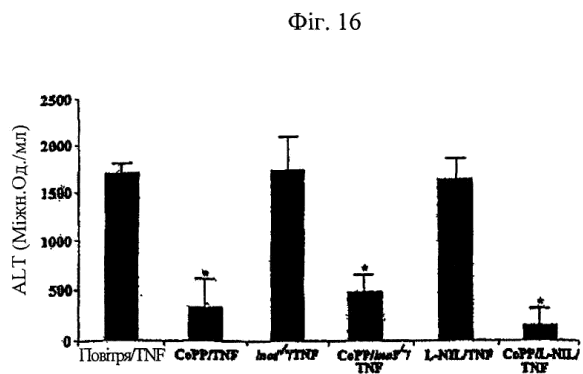
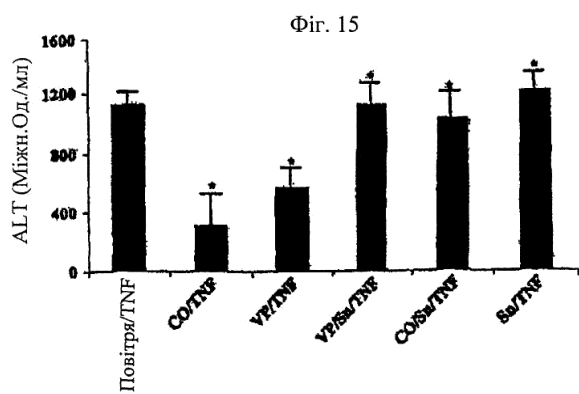
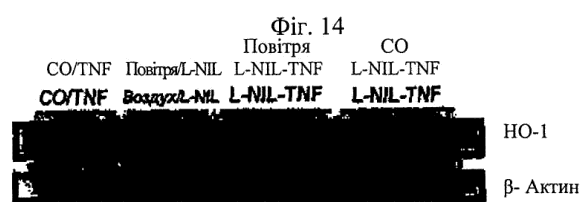
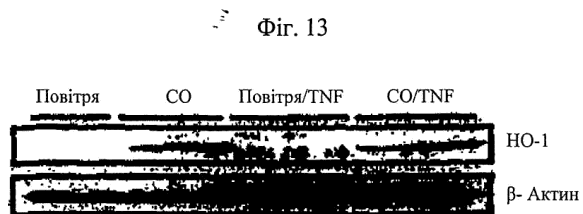
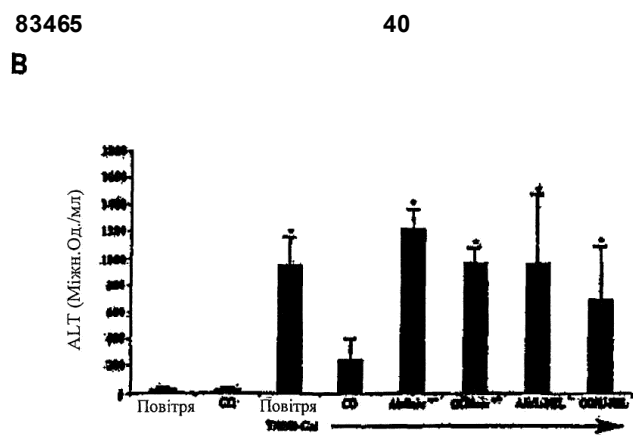
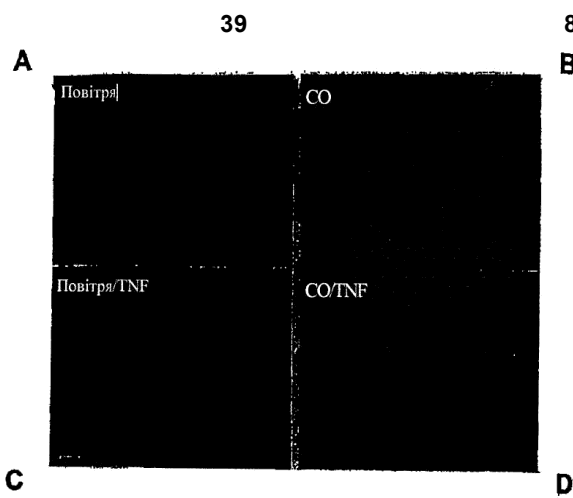
Фіг. 8



Фіг. 11A-11H

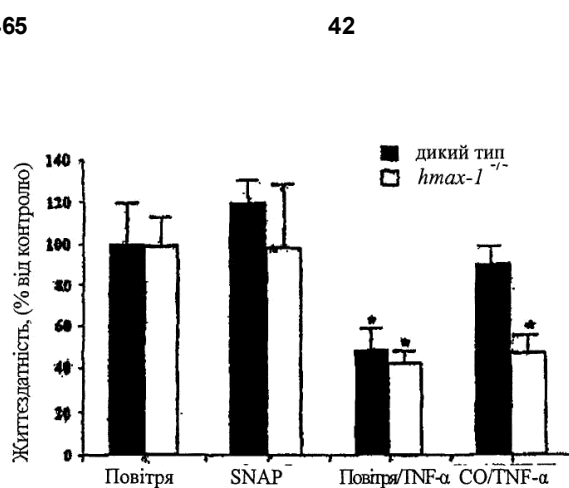
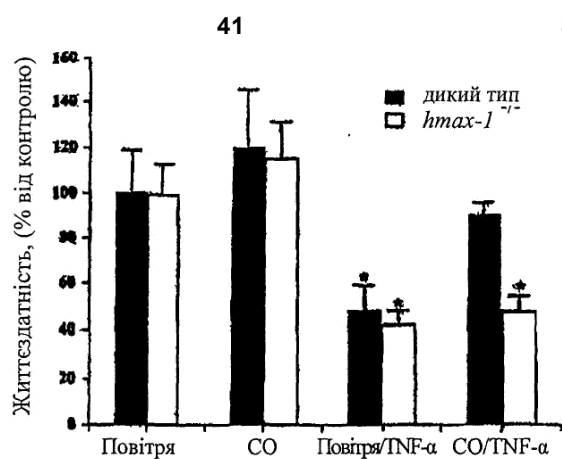


Фіг. 12

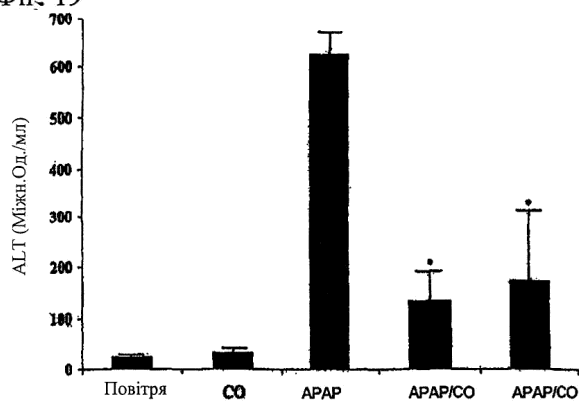


Фіг. 17

Фіг. 18



Фіг. 19



Фіг. 20

Фіг. 21