



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85041 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 33/00

A61K 9/08

A61K 9/72

A61P 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ КИШКОВОЇ НЕПРОХІДНОСТІ

1

2

(21) 20041109277

(22) 21.02.2003

(24) 25.12.2008

(86) PCT/US03/05428, 21.02.2003

(31) 60/372,652

(32) 15.04.2002

(33) US

(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.

(72) ОТТЕРБАЙН ЛЕО Е., ЧОІ ОГАСТІН М.К., МУР  
БЕВЕРЛІ А., БАУЕР ЕНТОНІ ДЖ.

(73) ЮНІВЕРСІТІ ОФ ПІТТСБУРГ ОФ ДЗЕ КОМ-  
МОНВЕЛТ СІСТЕМ ОФ ХАЙЄР ЕДЬЮКЕЙШН,  
ЙЄЙЛ ЮНІВЕРСІТІ

(56) US 5763431 A, 09.06.1998

US 6313144 B1, 06.11.2001

WO 9813058 A1, 02.04.1998

SU 1699062 A1, 27.02.1996

(57) 1. Спосіб лікування ілеусу у пацієнта, який  
включає:

ідентифікацію пацієнта, що страждає ілеусом, і  
введення пацієнту фармацевтичної композиції, що  
містить кількість окису вуглецю, ефективну для  
лікування ілеусу у пацієнта.

2. Спосіб за п.1, де ілеус є ілеусом тонкого кишеч-  
нику, ілеусом товстої кишки або ілеусом шлунку.

3. Спосіб за п.1, де ілеус є післяопераційним ілеу-  
сом або післяпологовим ілеусом.

4. Спосіб за п.1, де фармацевтичну композицію  
вводять пацієнту орально, за допомогою інгаляції  
або безпосередньо в черевну порожнину.

5. Спосіб за п.1, в якому фармацевтична компози-  
ція включає газоподібний окис вуглецю в  
концентрації щонайменше 50ppm, 100ppm,  
250ppm або 500ppm.

6. Спосіб за п.1, в якому фармацевтична компози-  
ція включає газоподібний окис вуглецю в концен-  
трації від приблизно 200ppm до приблизно 500ppm,  
від приблизно 150ppm до приблизно 600ppm, від  
приблизно 100ppm до 800ppm, від приблизно  
10ppm до приблизно 1000ppm.

7. Спосіб за п.1, в якому фармацевтична компози-  
ція представлена в газоподібній формі.

8. Спосіб за п.1, в якому фармацевтичну компози-  
цію вводять пацієнту за допомогою інгаляції.

9. Спосіб за п.1, в якому фармацевтична компози-  
ція представлена в газоподібній формі і її вводять  
пацієнту за допомогою вентилятора.

10. Спосіб за п.1, в якому фармацевтична компо-  
зиція представлена в газоподібній формі і її вво-  
дять пацієнту за допомогою штучної легені.

11. Спосіб за п.1, в якому фармацевтична компо-  
зиція представлена в рідкій формі.

12. Спосіб за п.1, в якому фармацевтична компо-  
зиція знаходиться в рідкій формі і її вводять пацієн-  
ту орально.

13. Спосіб за п.1, в якому фармацевтична компо-  
зиція знаходиться в рідкій формі і її вводять без-  
посередньо в черевну порожнину пацієнта.

14. Спосіб лікування або запобігання ілеусу в пацієн-  
та, який включає:

ідентифікацію пацієнта, що страждає від ілеусу  
або має ризик розвитку ілеусу, викликаного опера-  
цією на органах черевної порожнини, вибраною з  
групи, яка складається з: операції на сечостатевої  
системі, травній системі, лімфатичній системі, ди-  
хальній системі, операції на діафрагмі, операції з  
видалення пухлини, операції на ендометрії і орто-  
педичної операції, і введення пацієнту фармацев-  
тичної композиції, яка містить кількість окису вуг-  
лецю, ефективну для лікування або запобігання  
ілеусу у пацієнта.

15. Спосіб за п.14, де ілеус є ілеусом тонкого ки-  
шечнику, ілеусом товстої кишки або ілеусом шлун-  
ку.

16. Спосіб за п.14, де фармацевтичну композицію  
вводять пацієнту орально, за допомогою інгаляції  
або безпосередньо в черевну порожнину.

17. Спосіб за п.14, в якому фармацевтична компо-  
зиція включає газоподібний окис вуглецю в конче-  
нтрації щонайменше 50ppm, 100ppm, 250ppm або  
500ppm.

18. Спосіб за п.14, в якому фармацевтична компо-  
зиція включає газоподібний окис вуглецю в конче-  
нтрації від приблизно 200ppm до приблизно  
500ppm, від приблизно 150ppm до приблизно  
600ppm, від приблизно 100ppm до 800ppm, від  
приблизно 10ppm до приблизно 1000ppm.

(13) C2

(11) 85041

(19) UA

19. Спосіб за п.14, в якому фармацевтична композиція представлена в газоподібній формі.
20. Спосіб за п.14; в якому фармацевтичну композицію вводять пацієнту за допомогою інгаляції.
21. Спосіб за п.14, в якому фармацевтична композиція представлена в газоподібній формі і її вводять пацієнту за допомогою вентилятора.
22. Спосіб за п.14, в якому фармацевтична композиція представлена в газоподібній формі і її вводять пацієнту за допомогою штучної легені.
23. Спосіб за п.14, в якому фармацевтична композиція представлена в рідкій формі.
24. Спосіб за п.14, в якому фармацевтична композиція знаходиться в рідкій формі і її вводять пацієнту орально.
25. Спосіб за п.14, у якому фармацевтична композиція знаходиться в рідкій формі і її вводять безпосередньо в черевну порожнину пацієнта.
26. Спосіб лікування або запобігання ілеусу у пацієнта, який включає:  
ідентифікацію пацієнта, що страждає від ілеусу або має ризик розвитку ілеусу, не викликаного операцією; і введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить кількість окису вуглецю, ефективну для лікування або запобігання ілеусу у пацієнта.
27. Спосіб за п.26, де ілеус є ілеусом тонкого кишечника, ілеусом товстої кишки або ілеусом шлунка.
28. Спосіб за п.26, де фармацевтичну композицію вводять пацієнту орально, за допомогою інгаляції або безпосередньо в черевну порожнину.
29. Спосіб за п.26, в якому фармацевтична композиція включає газоподібний окис вуглецю в концентрації щонайменше 50ppm, 100ppm, 250ppm або 500ppm.
30. Спосіб за п.26, в якому фармацевтична композиція включає газоподібний окис вуглецю в концентрації від приблизно 200ppm до приблизно 500ppm, від приблизно 150ppm до приблизно 600ppm, від приблизно 100ppm до 800ppm, від приблизно 10ppm до приблизно 1000ppm.
31. Спосіб за п.26, в якому фармацевтична композиція представлена в газоподібній формі.
32. Спосіб за п.26, в якому фармацевтичну композицію вводять пацієнту за допомогою інгаляції.
33. Спосіб за п.26, в якому фармацевтична композиція представлена в газоподібній формі і її вводять пацієнту за допомогою вентилятора.

34. Спосіб за п.26, в якому фармацевтична композиція представлена в газоподібній формі і її вводять пацієнту за допомогою штучної легені.
35. Спосіб за п.26, в якому фармацевтична композиція представлена в рідкій формі.
36. Спосіб за п.26, у якому фармацевтична композиція знаходиться в рідкій формі і її вводять пацієнту орально.
37. Спосіб за п.26, у якому фармацевтична композиція знаходиться в рідкій формі і її вводять безпосередньо в черевну порожнину пацієнта.
38. Спосіб лікування ілеусу у пацієнта, що включає:  
а) забезпечення резервуара, що містить газ, який включає газоподібний окис вуглецю, що знаходиться під тиском;  
б) ідентифікацію пацієнта, що страждає ілеусом;  
с) вивільнення газу, що знаходиться під тиском, з резервуара з утворенням атмосфери, що містить газоподібний окис вуглецю, і  
д) вплив на пацієнта атмосфери, у якій вміст окису вуглецю є достатнім для лікування ілеусу у пацієнта.
39. Спосіб за п.38, де ілеус є ілеусом тонкого кишечника, ілеусом товстої кишки або ілеусом шлунка.
40. Спосіб за п.38, де ілеус є післяопераційним ілеусом або післяпологовим ілеусом.
41. Застосування ефективної кількості окису вуглецю для виготовлення фармацевтичної композиції для лікування ілеусу в пацієнта.
42. Застосування за п.41, де ілеус є ілеусом тонкого кишечника, ілеусом товстої кишки або ілеусом шлунка.
43. Застосування за п.41, де ілеус є післяопераційним ілеусом або післяпологовим ілеусом.
44. Застосування за п.41, в якому фармацевтична композиція включає газоподібний окис вуглецю в концентрації щонайменше 50ppm, 100ppm, 250ppm або 500ppm.
45. Застосування за п.41, де фармацевтична композиція включає газоподібний окис вуглецю в концентрації від приблизно 200ppm до приблизно 500ppm, від приблизно 150ppm до приблизно 600ppm, від приблизно 100ppm до 800ppm, від приблизно 10ppm до приблизно 1000ppm.
46. Застосування за п.41, в якому фармацевтична композиція представлена в газоподібній формі.
47. Застосування за п.41, в якому фармацевтична композиція представлена в рідкій формі.

Дана заявка заявляє пріоритет попередньої [заявки США №60/372652, поданої 15 квітня 2002 року], яка повністю включена в опис як посилання.

Заява відносно досліджень, які спонсоруються державою

Даний винахід був виконаний при фінансовій підтримці уряду по грантах №HL55330, HL60234, GM58241 і GM53789 і AI42365 Національних інститутів охорони здоров'я. Уряд має певні права на даний винахід.

Даний винахід відноситься до лікування шлунково-кишкових порушень.

Газоподібний окис вуглецю (CO) у високих концентраціях є отруйним. Однак в наш час признається його роль як важливої сигнальної молекули [Verma et al., Science 259: 381-384, 1993]. Також було висловлене припущення, що окис вуглецю функціонує як нейромедіатор в мозку (Id.) і як нейроендокринний модулятор в гіпоталамусі [Pozzoli et al., Endocrinology 735: 2314-2317, 1994]. Подібно окису азоту (NO) окис вуглецю є релакса-

нтом для гладкої мускулатури [Utz et al., Biochem Pharmacol. 47: 195-201, 1991; Christodoulides et al., Circulation 97: 2306-9, 1995] та інгібує агрегацію тромбоцитів [Mansouri et al., Thromb Haemost. 48: 286-8, 1982]. Було показано, що інгаляційний вплив окису вуглецю в низьких концентраціях надає протизапальну дію на деяких моделях.

Ілеус являє собою стан, що характеризується відсутністю рухливості кишечника, і є однією з найбільш частих форм непрохідності кишечника [дивись, наприклад, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Часто ілеус має місце по всьому кишково-му тракту (наприклад, товстому і тонкому кишечнику), але іноді він може зачіпати тільки один або декілька сегментів.

Маніпуляції на кишечнику під час абдомінальної операції часто приводять до ілеусу.

Були запропоновані різні фармацевтичні препарати для лікування ілеусу [дивись, наприклад, патент США №5362756 (федотозин); 5929035 (нейропептиди); 6214843 (піразолопіридин) і 5958407 (наприклад, антагоністичний активований протеїнази рецептор-2)].

Даний винахід частково оснований на встановленні того факту, що введення СО може ослаблювати ілеус.

Отже, в одному аспекті винахід описує спосіб лікування ілеусу у пацієнта, який включає ідентифікацію пацієнта, який страждає або має ризик розвитку ілеусу, і введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить ефективну кількість або концентрацію окису вуглецю.

Ілеус може являти собою ілеус будь-якої ділянки шлунково-кишкового тракту, наприклад, шлунку, тонкого кишечника і/або ободової кишки. Причиною ілеусу може бути будь-який фактор, який викликає ілеус, наприклад, операція, наприклад, операція на органах черевної порожнини, така, як операція з трансплантації (наприклад, трансплантації тонкого кишечника (SITx)) або інша операція на органах черевної порожнини (наприклад, операція на органах черевної порожнини, що включає лапаротомію або не включає лапаротомію, наприклад, лапароскопічні процедури); ортопедичні операції (наприклад, операція на стегні); роди; ішемія кишечника; ретроперітонеальна гематома; внутрішньочеревинний сепсис; інтраперітонеальне запалення; наприклад, гострий апендицит, холецистит, панкреатит; переломи хребта; ниркова колька; пошкодження грудної клітки; базальна пневмонія; переломи ребер; інфаркт міокарда; обмінні порушення або будь-яке з їх поєднань.

Фармацевтичну композицію можна вводити пацієнту будь-яким способом, відомим в даній галузі для введення газів, рідин і/або твердих речовин пацієнтам, наприклад, інгаляцією, інсуфляцією, інфузією, ін'єкцією і/або введенням в шлунок. Наприклад, в одному варіанті даного винаходу фармацевтичну композицію вводять пацієнту інгаляційно. В іншому варіанті фармацевтичну композицію вводять пацієнту перорально. У ще одному варіанті фармацевтичну композицію вводять безпосередньо в черевну порожнину пацієнта.

Спосіб може додатково включати введення пацієнту, щонайменше, одного з наступних препаратів в доповнення до СО: індукуючого НО-1 або феритин у пацієнта; експресуючого рекомбінантний НО-1 або феритин у пацієнта і введення J<sup>u</sup> пацієнту фармацевтичної композиції, що містить НО-1, білірубін, білівердин, феритин, десфероксамін, залізо-декстран або апоферитин.

В іншому аспекті винахід описує спосіб лікування ілеусу у пацієнтів після операції. Спосіб включає ідентифікацію пацієнта, страждаючого післяопераційним ілеусом і введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить кількість окису вуглецю, ефективну для лікування ілеусу у пацієнта. Ілеус може являти собою ілеус будь-якої ділянки шлунково-кишкового тракту, наприклад, шлунку, тонкого кишечника і/або товстого кишечника (наприклад, ободової кишки). Фармацевтичну композицію можна вводити пацієнту будь-яким описаним шляхом, наприклад, інгаляційно (газо-подібні композиції); перорально і/або безпосереднім введенням в черевну порожнину пацієнта.

Також винахід описує спосіб лікування ілеусу у пацієнта, який страждає або має ризик розвитку ілеусу, викликаного не операцією на органах черевної порожнини, наприклад, ілеусу, викликаного будь-яким описаним фактором, іншим, ніж операція на органах черевної порожнини. Спосіб включає ідентифікацію пацієнта, який страждає або має ризик розвитку ілеусу, не викликаного операцією на органах черевної порожнини, і введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить кількість окису вуглецю, ефективну для лікування ілеусу у пацієнта.

В іншому аспекті винахід описує спосіб лікування ілеусу у пацієнта, який включає стадії забезпечення резервуара, що містить газ, який знаходиться під тиском, що включає газоподібний окис вуглецю, ідентифікацію пацієнта, який страждає або має ризик розвитку ілеусу, вивільнення газу, що знаходиться під тиском, з резервуара з утворенням атмосфери, яка включає газоподібний окис вуглецю і вплив атмосфери на пацієнта, де кількість окису вуглецю в атмосфері достатня для лікування ілеусу у пацієнта.

У ще одному аспекті винахід забезпечує спосіб проведення операції у пацієнта. Спосіб включає ідентифікацію пацієнта, для якого необхідна операція, та інгаляційний вплив на пацієнта перед, під час і/або після операції кількості газоподібного окису вуглецю, достатньої для лікування ілеусу у пацієнта.

Операція може бути будь-якою операцією, яка викликає і/або піддає пацієнта ризику розвитку ілеусу. Наприклад, операція може включати маніпуляції (наприклад, маніпуляції (безпосередньо або опосередковано)) на шлунково-кишковому тракту, наприклад, шлунку і/або кишечника, наприклад, тонкому або товстому кишечнику (наприклад, ободовій кишці), і може бути операцією, що включає лапаротомію або не включає лапаротомію (наприклад, операції, що включають лапароскопію). У деяких варіантах операція може являти собою операцію з приводу трансплантації або операцію не з приводу трансплантації, наприклад,

операцію, що зачіпає будь-який орган(и) або тканину(и) в черевній порожнині, наприклад, операцію на органах сечостатевої системи (наприклад, нирках, сечоводі і/або сечовому міхурі; або органах репродуктивної системи (наприклад, матці, яєчниках і/або фалопієвих трубах)); органах травної системи (наприклад, шлунку, тонкому кишечнику, товстому кишечнику (наприклад, ободовій кишці), апендиксі, жовчному міхурі, печінці, селезінці і/або підшлунковій залозі)); органах лімфатичної системи; органах дихальної системи (наприклад, легенях); діафрагмі; операції з приводу видалення пухлини з будь-якого органу або тканини в черевній порожнині; операції на ендометрії і ортопедичні операції, наприклад, операції на стегні.

В іншому аспекті винахід забезпечує резервуар, що містить стиснений газоподібний СО для медичних цілей. Резервуар має мітку, яка вказує, що газ можна використати для лікування ілеусу, наприклад, ілеусу, викликаного операцією (наприклад, операцією, що включає маніпуляції на кишечнику) у пацієнта (наприклад, людини). Газоподібний СО може знаходитись в суміші з газоподібним азотом, з окисом азоту і газоподібним азотом або з газом, що містить кисень. Газоподібний СО може знаходитись в суміші в концентрації, щонайменше, приблизно 0,025%, наприклад, щонайменше, приблизно 0,05%, 0,10%, 0,50%, 1,0%, 2,0%, 10%, 50% або 90%.

У ще одному аспекті винахід забезпечує спосіб лікування ілеусу у пацієнта, який включає ідентифікацію пацієнта, який страждає або має ризик розвитку ілеусу, і введення пацієнту, щонайменше, одного з наступних препаратів в поєднанні з лікуванням СО: індукуючого НО-1 або феритин у пацієнта; експресуючого рекомбінантний НО-1 або феритин у пацієнта, і введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить НО-1, білірубін, білівердин, феритин або апоферітин. Також включається застосування СО і будь-якого одного з вищеперелічених засобів в одержанні лікарського препарату для лікування або запобігання ілеусу.

Також в об'ємі винаходу знаходиться застосування СО у виробництві лікарського препарату для лікування або профілактики стану, описаного тут, наприклад, ілеусу. Лікарський препарат можна також використати у способі лікування ілеусу у пацієнта і/або для обробки донорів, органів і/або реципієнтів при трансплантації. Лікарський препарат може бути в будь-якій описаній формі, наприклад, рідкій або газоподібній композиції СО.

Якщо не вказано інакше, всі технічні і наукові терміни, що використовуються, мають ті ж значення, які звичайно розуміються фахівцями в даній галузі, до якої відноситься даний винахід. Відповідні способи і матеріали описані нижче, хоча в практиці або при випробуванні даного винаходу можна використати способи і матеріали, аналогічні або рівноцінні описаним. Всі публікації, заявки на патент, патенти та інші згадані джерела повністю включені тут для інформації. У випадку виникнення суперечності даний опис, включаючи визначення, буде служити контролем. Матеріали, способи і приклади є тільки ілюстративними і не призначаються для обмеження.

Деталі одного або більше варіантів винаходу представлені в супроводі фігур і опису нижче. Інші ознаки, цілі і переваги винаходу стануть зрозумілими з опису і фігур, і з формули винаходу.

Фіг.1 представляє лінійний графік, що показує вплив трансплантації тонкого кишечника (SITx) і обробки СО на спонтанну і стимульовану бетанехолом скоротність круглих м'язів тонкого кишечника.

▲ = контроль;  
 ◇ = контроль+СО;  
 X = SITx;  
 ■ = SITx+СО.

Фіг.2А представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив СО на прохідність кишечника у контрольних тварин (тварини, що не піддавались SITx). Суцільні колонки = контроль; смугасті колонки = контроль+СО (250ppm); stom = шлунок; sb = тонкий кишечник.

Фіг.2В представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив СО на прохідність кишечника у тварин, що піддавались SITx. Суцільні колонки = SITx; смугасті колонки = SITx+СО (250ppm); stom = шлунок; sb = тонкий кишечник і col = ободова кишка.

Фіг.2С представляє графік у вигляді діаграми, яка показує, що СО достовірно поліпшує прохідність кишечника у щурів, що піддавались SITx. На графіку підсумовані підраховані значення геометричної середньої прохідності. Контроль = контрольні тварини, що піддавались впливу повітря; контроль+СО = контрольні тварини, що піддавались впливу СО; SITx = тварини, що піддавались SITx і що піддавались впливу повітря; SITx+СО = тварини, що піддавались SITx і що піддавались впливу СО.

Фіг.3 представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив СО на рекрутинг лейкоцитів у м'язовій оболонці кишечника після SITx. Контроль = контрольні тварини, що піддавались впливу повітря; контроль+СО = контрольні тварини, що піддавались впливу СО; SITx = тварини, що піддавались SITx і що піддавались впливу повітря; SITx+СО = тварини, що піддавались SITx і що піддавались впливу СО.

Фіг.4А представляє лінійний графік, що показує експресію мРНК IL-6 у слизовій і м'язовій оболонці в різні періоди часу після SITx за даними тесту захисту від РНКази.

■ = м'язи;  
 ○ = слизова.

Фіг.4В представляє лінійний графік, що показує експресію мРНК IL-1β в слизовій і м'язовій оболонці в різні періоди часу після SITx за даними тесту захисту від РНКази.

■ = м'язи;  
 ○ = слизова.

Фіг.5 представляє групу графіків у вигляді діаграми, що показують вплив СО на експресію синтази окису азоту (iNOS), IL-6, IL-1β і IL-10 у зовнішній м'язовій оболонці трансплантатів кишечника через чотири години після реперфузії за даними аналізу RT-ПЛП в режимі реального часу. Нормальні = контрольні тварини, що піддавались впливу повітря; нормальні+СО = контрольні тварини, що

піддавались впливу CO. SITx= тварини, що піддавались SITx і що піддавались впливу повітря; SITx+CO= тварини, що піддавались SITx і що піддавались впливу CO.

Фіг.6 представляє групу графіків у вигляді діаграми, що показують вплив CO на концентрацію IL-6 і нітрату/нітритів в сироватці крові у тварин, що піддавались SITx через одну (SITx+CO (1год.) і чотири (SITx+CO (4год.)) години після реперфузії. Нормальні= контрольні тварини, що піддавались впливу повітря; нормальні+CO= контрольні тварини, що піддавались впливу CO; SITx (1год.) і SITx (4год.)= тварини, що піддавались SITx відповідно через одну і чотири години і після реперфузії.

Фіг.7A представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив маніпуляцій на кишечнику на експресію HO-1 в екстрактах м'язової оболонки за даними двостадійної RT-ПЛР в режимі реального часу. Проби аналізували через 3 (IM 3год.), 6 (IM 6год.), 12 (IM 12год.) і 24 (IM 24год.) години після лапаротомії.

Максимальна експресія мала місце через 3-6год. після операції. Дані показують середнє кратне збільшення у порівнянні з контролем  $\pm$  SEM,  $n=6$ . \* $P=0,001$ ; \*\* $P=0,0001$ .

Фіг.7B представляє вигляд цілісного препарату м'язової оболонки, що показує HO-1-подібну імунореактивність поліморфолейкоцитів, інфільтруючи м'язову оболонку, після IM.

Фіг.7C представляє вигляд цілісного препарату м'язової оболонки, що показує HO-1-подібну імунореактивність макрофагоподібних клітин, інфільтруючих м'язову оболонку після IM.

Фіг.7D представляє вигляд цілісного препарату м'язової оболонки, що показує HO-1-подібну імунореактивність грануловмісних клітин, інфільтруючи м'язовий шар після IM. Місця нерозрізнуваної імунофлуоресценції в нижній частині знімка представляють клітини нижче площини фокусу.

Фіг.7E представляє вигляд цілісного препарату м'язової оболонки, що показує відсутність HO-1-подібної імунореактивності у м'язовій оболонці контрольних тварин.

Фіг.8A представляє вплив інгаляційного впливу CO (експозиція 24год.) на прохідність кишечнику у мишей, що не піддавались IM. stom= шлунок; sb= тонкий кишечник і col= ободова кишка. Суцільні колонки= тварини, що не піддавались впливу CO; смугасті колонки= тварини, що піддавались впливу CO. Велика частина сигналів флуоресценції локалізована в сліпій кишці і проксимальній частині ободової кишки.

Фіг.8B представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляційного впливу CO (експозиція 24год.) на прохідність кишечнику у мишей, що піддавались IM. stom шлунок; sb= тонкий кишечник і col= ободова кишка. Суцільні колонки= тварини, що не піддавались впливу CO; смугасті колонки= тварини, що піддавались впливу CO. Після IM прохідність значно знижена. Інгаляційний вплив CO приводив до більш дистального розподілу міченого декстрану (IM-CO).

Фіг.8C представляє графік у вигляді діаграми, що показує розрахункові дані геометричної середньої (GC). Більш високі номери відповідають біль-

ше дистальному розподілу міченого декстрану. Контроль= контрольні тварини; контроль+CO= контрольні тварини, що піддавались впливу CO; IM тварини, що піддавались IM; IM+CO= тварини, що піддавались IM і впливу CO. \* У групі IM значення GM були достовірно нижче у порівнянні з контролем,  $P<0,0001$ ;  $n=6$ . † Інгаляційний вплив CO (IM+CO) приводив до достовірного підвищення GC у порівнянні з IM,  $P=0,001$ ;  $n=6$ .

Фіг.9A представляє типові графіки, що показують вплив CO на спонтанну скорочувальну здатність. Контроль: ритмічні скорочення, характерні для неоперованих мишей. Контроль+ CO: інгаляційний вплив окису вуглецю (CO) протягом 24год. у контрольних мишей не надавав впливу на спонтанну скоротність. IM: ритмічна скоротність відсутня внаслідок хірургічних маніпуляцій на тонкому кишечнику. IM+CO: ритмічність відновлена у тварин, що піддавались маніпуляції і оброблених CO.

Фіг.9B представляє лінійний графік (криву залежності доза-ефект), що показує вплив CO на величину тонічних скорочень смужок круглої гладкої мускулатури від тварин, що не піддавались IM. Скорочення індукували впливом на смужки бетанехолом у зростаючих концентраціях (від 0,1 до 300 мкмоль/л). Інгаляційний вплив CO на контрольних тваринах не надавав впливу на індуковану бетанехолом скорочувальну активність.

■= контроль;

▲= контроль+CO.

Фіг.9C представляє лінійний графік (криву залежності доза-ефект), що показує вплив CO на величину тонічних скорочень смужок круглої гладкої мускулатури від тварин, що піддавались IM. Скорочення індукували впливом на смужки бетанехолом в зростаючих концентраціях (від 0,1 до 300 мкмоль/л). Здатність круглих м'язів до скорочення у відповідь на бетанехол була достовірно нижче після IM. Інгаляційний вплив CO відновлював скорочувальну активність до ^контрольного рівня (IM+CO).

■=IM;

▲=IM+CO.

Фіг.10 представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції CO на кількість позитивних на мієлопероксидазу (МРО) лейкоцитів, інфільтруючих м'язову оболонку кишечнику у контрольних мишей і після маніпуляцій на кишечнику (IM). Контроль= контрольні тварини; контроль+CO= контрольні тварини, що піддавались впливу CO; IM= тварини, що піддавались IM; IM+CO= тварини, що піддавались IM і впливу CO. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P<0,0001$ ;  $n=4$ .

Фіг.11A представляє графік у вигляді діаграми, що показує результати проведення двостадійної RT-ПЛР в режимі реального часу за оцінкою впливу анестезії при операції і IM на протікання у часі експресії мРНК IL-6. Проби аналізували через 3 (IM 3год.), 6 (IM 6год.), 12 (IM 12год.) і 24 (IM 24год.) години. Максимальну експресію відмічали через 3 і 6год. після операції. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P<0,0001$  у порівнянні з контролем.

Фіг.11В представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на експресію мРНК IL-6 через 3 (ІМ+СО 3год.) і 6 (ІМ+СО 6год.) годин після операції. ІМ 3год. і ІМ 6год.=ІМ контрольні тварини відповідно через 3год. і 6год. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка.

Фіг.11С представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на виділення білка IL-6 з екстрактів м'язової оболонки, взятої через 24год. після операції. Виділення білка IL-6 було достовірне нижче під дією інгаляційного впливу СО. Контроль= контрольні тварини; контроль+СО= контрольні тварини, що піддавались впливу СО; ІМ= тварини, що піддавались ІМ; ІМ+СО= тварини, що піддавались ІМ і впливу СО. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P < 0,0001$  у порівнянні з контролем і  $\dagger P = 0,001$  у порівнянні з ІМ;  $n = 6$ .

Фіг.12А представляє графік у вигляді діаграми, що показує результати проведення двостадійної RT-ПЛР в режимі реального часу за оцінкою впливу анестезії при операції і ІМ на протікання у часі експресії мРНК IL1 $\beta$ . Експресія мРНК після маніпуляцій на кишечнику (ІМ). Проби аналізували через 3 (ІМ 3год.), 6 (ІМ 6год.), 12 (ІМ 12год.) і 24 (ІМ 24год.) години. Максимальну експресію відмічали через 6год. після операції. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P = 0,001$  і \*\* $P < 0,0001$  у порівнянні з контролем,  $n = 6$ .

Фіг.12В представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на експресію мРНК IL-1 $\beta$  через 3 (ІМ+СО 3год.) і 6 (ІМ+СО 6год.) годин після операції. СО достовірно придушувала експресію мРНК IL-1 $\beta$ . ІМ 3год. і ІМ 6год.=ІМ контрольні тварини відповідно через 3год. і 6год. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P = 0,001$  у порівнянні з ІМ 6год.,  $n = 6$ .

Фіг.12С представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на виділення білка IL-1 $\beta$  з екстрактів м'язової оболонки через 24год. після операції. Інгаляційний вплив СО достовірно зменшував виділення білка IL-1 $\beta$ . Контроль= контрольні тварини; контроль+СО= контрольні тварини, що піддавались впливу СО; ІМ= тварини, що піддавались ІМ; ІМ+СО= тварини, що піддавались ІМ і впливу СО. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. ND= не детектували. \* $P = 0,001$  у порівнянні з контролем,  $\dagger P = 0,001$  у порівнянні з ІМ;  $n = 6$ .

Фіг.13А представляє графік у вигляді діаграми, що показує результати проведення двостадійної RT-ПЛР в режимі реального часу за оцінкою впливу анестезії при операції і ІМ на протікання у часі експресії мРНК iNOS. Проби аналізували через 3 (ІМ 3год.), 6 (ІМ 6год.), 12 (ІМ 12год.) і 24 (ІМ 24год.) години. Максимальну експресію відмічали через 6год. після операції. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P = 0,001$ ; \*\* $P < 0,0001$  у порівнянні з контролем;  $n = 6$ .

Фіг.13В представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на експресію мРНК iNOS через 3 (ІМ+СО 3год.) і 6 (ІМ+СО 6год.) годин після операції. ІМ 3год. і ІМ 6год.=ІМ контрольні тварини відповідно через 3год. і 6год. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка,  $\dagger P = 0,001$  у порівнянні з ІМ 6год.;  $n = 6$ .

Фіг.13С представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на загальне виділення нітритів з екстрактів м'язової оболонки через 24год. після операції. Загальне виділення нітритів визначали у вигляді показника активності iNOS. Інгаляційний вплив СО достовірно придушував індуковане операцією підвищення виділення нітритів з м'язової оболонки після маніпуляцій. Аналогічне зниження концентрації нітритів було досягнуто при інкубації екстрактів м'язової оболонки у присутності вибірного інгібітора iNOS, L-Nil (30мкМ; ІМ + L-Nil). Контроль = контрольні тварини; контроль+СО= контрольні тварини, що піддавались впливу СО; ІМ= тварини, що піддавались ІМ; ІМ+СО= тварини, що піддавались ІМ і впливу СО. \* $P = 0,001$  у порівнянні з контролем,  $\dagger P = 0,001$  у порівнянні з ІМ;  $n = 6$ . Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка.

Фіг.14А представляє графік у вигляді діаграми, що показує результати проведення двостадійної RT-ПЛР в режимі реального часу за оцінкою впливу анестезії при операції і ІМ на протікання у часі експресії мРНК COX-2. Проби аналізували через 3 (ІМ 3год.), 6 (ІМ 6год.), 12 (ІМ 12год.) і 24 (ІМ 24год.) години. Максимальну експресію відмічали через 3-12год. після операції. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P = 0,01$ ; \*\* $P = 0,0001$  у порівнянні з контролем;  $n = 6$ .

Фіг.14В представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на експресію мРНК COX-2 через 3 (ІМ+СО 3год.) і 6 (ІМ+СО 6год.) годин після операції. ІМ 3год. і ІМ 6год.=ІМ контрольні тварини відповідно через 3год. і 6год. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка.

Фіг.14С представляє графік у вигляді діаграми, що показує, що інгаляційний вплив СО у контрольних тварин достовірно підвищував експресію мРНК COX-2 через 3год. (СО 3год.) після обробки. СО 6год.= експресія через 6год. після обробки. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P = 0,01$ .

Фіг.14D представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на виділення білка PGE2 з екстрактів м'язової оболонки через 24год. після операції. Виділення білка PGE2 визначали у вигляді показника активності COX-2. Інгаляційний вплив СО достовірно підвищував виділення білка з м'язової оболонки контрольних мишей, але не надавав впливу на індуковане операцією підвищене виділення PGE2 з м'язової оболонки після маніпуляцій. Контроль контрольні тварини; контроль+СО = контрольні тварини, що піддавались впливу СО; ІМ = тварини, що піддавались ІМ; ІМ+СО= тварини, що піддавались ІМ і впливу СО. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка.

тична похибка. \* $P=0,01$  і \*\* $P=0,0001$  у порівнянні з контролем;  $n=6$ .

Фіг.15А представляє графік у вигляді діаграми, що показує результати проведення двостадійної RT-ПЛР в режимі реального часу за оцінкою впливу анестезії при операції і ІМ на протікання у часі експресії мРНК IL-10. Проби аналізували через 3 (ІМ 3год.), 6 (ІМ 6год.), 12 (ІМ 12год.) і 24 (ІМ 24год.) години. Максимальну експресію відмічали через 3 і 6год. після операції. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P<0,001$  у порівнянні з контролем;  $n=6$ .

Фіг.15В представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на експресію мРНК IL-10 через 3год. (ІМ+СО 3год.) і 6 (ІМ+СО 6год.) годин після операції. Інгаляційний вплив СО підвищував експресію IL-10 через 3год., але не через 6год. після операції. ІМ 3год. і ІМ 6год.=ІМ контрольні миші відповідно через 3год. і 6год. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка, † $P=0,001$  у порівнянні з ІМ через 3год.;  $n=6$ .

Фіг.15С представляє графік у вигляді діаграми, яка показує, що інгаляція СО у контрольних мишей достовірно підвищувала експресію мРНК IL-10 через 3 (СО 3ч) і 6год. (СО 6год.) після обробки. Дані виражені у вигляді середнього значення  $\pm$  середньоквадратична похибка. \* $P<0,001$  у порівнянні з контролем;  $n=6$ .

Фіг.16А представляє графік у вигляді діаграми, що показує результати проведення двостадійної RT-ПЛР в режимі реального часу за оцінкою впливу анестезії при операції і ІМ на протікання у часі експресії мРНК HO-1 через 3год. і 6год. після операції (ІМ). Інгаляційний вплив СО достовірно підвищував експресію мРНК HO-1 через 3год. (ІМ+СО 3год.), але не через 6год. (ІМ+СО 6год.) після операції. ІМ 3год. і ІМ 6год.=ІМ контрольні миші відповідно через 3год. і 6год. після операції, † $P<0,001$  у порівнянні з ІМ 3год.;  $n=6$ .

Фіг.16В представляє графік у вигляді діаграми, що показує вплив інгаляції СО на експресію мРНК HO-1 через 3год. (СО 3год.) і 6год. (СО 6год.) після обробки. Інгаляційний вплив на контрольних мишей підвищував експресію мРНК HO-1 через 6год. після обробки. \* $P<0,05$  у порівнянні з контролем;  $n=6$ .

Термін «окис вуглецю» (або «СО») в тому значенні, в якому він тут використовується, описує молекулярний окис вуглецю в його газоподібному стані, стисненому в рідку форму або розчиненому у водному розчині. Терміни «композиція на основі окису вуглецю» або «фармацевтична композиція, що містить окис вуглецю» використовуються в описі для позначення газоподібної або рідкої композиції, що містить окис вуглецю, який можна вводити пацієнту і/або до органу, наприклад, тонкого кишечника. Фахівцеві в даній галузі, очевидно зрозуміло, яка форма фармацевтичної композиції, наприклад, газоподібна, рідка або як газоподібна, так і рідка, є переважною для конкретного застосування.

Терміни «ефективна кількість» або «ефективна для лікування» в тому значенні, в якому вони використовуються, відносяться до введення окису

вуглецю в кількості або концентрації і протягом часу, включаючи короточасне або тривале введення, і періодичне або постійне введення, яке ефективно відносно його введення для вияву призначеної дії або фізіологічного ефекту. Ефективні кількості СО для застосування в даному винаході включають, наприклад, кількості, які профілякують або ослаблюють ілеус після процедури, наприклад, трансплантації тонкого кишечника.

Для газів ефективні кількості СО, як правило, знаходяться в межах приблизно від 0,0000001% до приблизно 0,3% за масою, наприклад, від 0,0001% до приблизно 0,25% за масою, переважно становлять, 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% за масою СО. Для рідких розчинів СО ефективні кількості, як правило, знаходяться в межах приблизно від 0,0001 до приблизно 0,0044г СО/100г рідини, наприклад, становлять, щонайменше, приблизно 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 0,0042 СО/100г рідкого розчину. Переважно межі включають, наприклад, приблизно від 0,0010 до приблизно 0,0030г СО/100г рідини, приблизно від 0,0015 до приблизно 0,0026г СО/100г рідини або приблизно від 0,0018 до приблизно 0,0024г СО/100г рідини. Фахівці в даній галузі, очевидно, розуміють, що можна використати кількості, що виходять з даних меж, в залежності від застосування.

Термін «пацієнт» використовується в описі для позначення тварини, людини або такої, що не є людиною, для якої забезпечується лікування способами за даним винаходом. Безсумнівно, що застосування у ветеринарії передбачаються для включення у винахід. Термін включає, але не обмежується ссавцями, наприклад, людьми, іншими приматами, свинями, гризунами такими, як миші і щури, кролики, морські свинки, хом'яки, коровами, кіньми, кішками, собаками, вівцями і козами. Термін «лікувати» («лікування») використовується для опису затримки розвитку, придушення, запобігання або полегшення симптомів стану, наприклад, ілеусу. Термін «донор» або «пацієнт-донор» в тому значенні, в якому він використовується, відноситься до пацієнта (людини або такого, що не є людиною), від якого можна одержати орган або тканину для трансплантації пацієнту-реципієнту. Термін «реципієнт» або «пацієнт-реципієнт» відноситься до пацієнта (людини або такого, що не є людиною), якому трансплантують орган або тканину.

Термін «ілеус» в тому значенні, в якому він використовується, відноситься до часткового або повного паралічу або порушення рухливості шлунково-кишкового тракту. Ілеус може мати місце по всьому шлунково-кишковому тракту або може вражати тільки один або декілька його відділів, наприклад, шлунок, тонкий кишечник або ободову кишку. Очевидно, фахівець в даній галузі розуміє, що причиною ілеусу може бути велике число факторів, які включають, наприклад, операцію (напри-

клад, будь-яку операцію, що включає лапаротомію, наприклад, трансплантацію тонкого кишечника (SITx) або будь-яку операцію, що включає лапароскопію); ішемію кишечника; ретроперітонеальну гематому; внутрішньочеревинний сепсис; інтраперітонеальне запалення; гострий апендицит; холецистит; панкреатит; ниркові кольки; ураження грудної клітки; базальну пневмонію; інфаркт міокарда; обмінні порушення, наприклад, виникаючі внаслідок низького рівня калію; лікарські препарати, наприклад, опіати при тривалому застосуванні, і травми, наприклад, переломи хребта і ребер [дивись, наприклад, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Термін також включає ілеус після родів, який є звичайною проблемою у жінок в післяпологовому періоді, наприклад, після родів через піхву («природних родів»). У тому значенні, в якому він використовується, термін «післяопераційний ілеус» відноситься до ілеусу, що виявляється у пацієнта після будь-якого хірургічного втручання, наприклад, операції на органах черевної порожнини. Термін «нехірургічні втручання» відноситься до медичних процедур, що не включають операцію. Термін «ілеус, виникаючий внаслідок стану, що не включає операцію» відноситься до ілеусу, викликаного факторами іншими, ніж операція, наприклад, описаними факторами.

Для індивідумів з ризиком розвитку ілеусу винахід може мати особливе корисне значення, в основному тому, що профілактичне лікування можна почати до вияву ознак ілеусу. Індивідуми «з ризиком» включають, наприклад, пацієнтів, для яких необхідне проведення операції на органах черевної порожнини за медичними показаннями або по вибору, і/або індивідуми, які страждають одним зі станів або пошкоджень, вказаних вище. Фахівець в даній галузі, очевидно, розуміє, що пацієнта з ризиком розвитку ілеусу можна визначити будь-яким способом, відомим в даній галузі, наприклад, внаслідок встановлення лікарем діагнозу.

Термін «трансплантація» використовується в описі як загальний термін для опису способу пересаджування органу або тканини (наприклад, тонкого кишечника) пацієнту. Термін «трансплантація» визначається в даній галузі, як пересаджування живих тканин або клітин від донора реципієнту зі збереженням функціональної цілісності трансплантованої тканини або клітин у реципієнта [дивись, наприклад, The Merck Manual, Berkow, Fletcher and Beers, Eds., Merck Research Laboratories, Rahway, N.J., 1992]. Термін включає всі відомі в даній галузі трансплантати. Трансплантати поділяються за місцем і генетичним взаємозв'язком між донором і реципієнтом. Термін включає, наприклад, аутотрансплантацію (видалення і пересаджування клітин або тканини з одного місця у пацієнта в те ж або інше місце у того ж пацієнта), алотрансплантацію (трансплантацію у членів одного виду) і ксенотрансплантацію (трансплантацію у членів різних видів).

Одержання газоподібних композицій

Композиція на основі CO може являти собою газоподібну композицію CO. Стиснений газ або

газ, що знаходиться під тиском, придатний у способах за винаходом, можна одержати з будь-якого комерційного джерела і в резервуарі будь-якого типу, придатному для зберігання стисненого газу. Наприклад, стиснені гази або гази, що знаходяться під тиском, можна одержати з будь-якого джерела, що постачає стиснені гази такі, як кисень, для медичних цілей. Термін газ «для медичних цілей» витою значенні, в якому він використовується/відноситься до газу, придатного для введення пацієнтам, як визначено. Газ, що знаходиться під тиском, який включає окис вуглецю, що використовується у способах за даним винаходом, може бути забезпечений таким чином, що всі гази бажаного кінцевого складу (наприклад, CO, He, NO, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) будуть знаходитись в одному резервуарі, за винятком того, що NO і O<sub>2</sub> не можуть зберігатись разом. Необов'язково способи за даним винаходом можна здійснювати з використанням декількох резервуарів, що містять окремі гази. Наприклад, може бути забезпечений окремий резервуар, що містить окис вуглецю з або без інших газів, вміст якого може бути необов'язково змішаний з кімнатним повітрям або з вмістом інших резервуарів, наприклад, резервуарів, що містять кисень, азот, двоокис вуглецю, стиснене повітря або будь-який інший придатний газ або їх суміші.

Газоподібні композиції для введення пацієнту за даним винаходом, як правило, містять від 0% до приблизно 79% за масою азоту, приблизно від 21% до приблизно 100% за масою кисню і приблизно від 0,0000001% до приблизно 0,3% за масою (відповідає приблизно від 1 ppb (частина на мільярд) або 0,001 ppt (частина на мільйон) до приблизно 3000 ppt) окису вуглецю. Переважно, щоб кількість азоту в газоподібній композиції становила приблизно 79% за масою, кількість кисню становила приблизно 21% за масою і кількість окису вуглецю знаходилось в межах приблизно від 0,0001% до приблизно 0,25% за масою. Кількість CO переважно становить, 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% за масою. Переважні межі включають приблизно від 0,005% до приблизно 0,24%, приблизно від 0,01% до приблизно 0,22%, приблизно від 0,015% до приблизно 0,20%, приблизно від 0,08% до приблизно 0,20% і приблизно від 0,025% до приблизно 0,1% за масою. Необхідно зазначити, що газоподібні композиції на основі окису вуглецю з концентрацією окису вуглецю вище 0,3% (наприклад, 1% або більше) можна використати протягом короткого періоду часу (наприклад, один або декілька вдихів) в залежності від застосування.

Газоподібні композиції на основі окису вуглецю можна використати для створення атмосфери, що містить газоподібний окис вуглецю. Атмосферу, яка містить відповідні концентрації газоподібного окису вуглецю, можна створити, наприклад, забезпеченням резервуара, що містить газ, який знаходиться під тиском, що включає газоподібний окис вуглецю, і вивільненням газу, що знаходиться під тиском, з резервуара в камеру або простір з



утворенням атмосфери, що містить газоподібний окис вуглецю в камері або просторі. Альтернативно, газу можуть знаходитись в апараті, який проходить до дихальної маски або дихальної трубки, за допомогою чого створюється атмосфера, що містить газоподібний окис вуглецю в дихальній масці або дихальній трубці з гарантією того, що пацієнт є єдиною людиною в кімнаті, що піддається впливу окису вуглецю у високих концентраціях.

Концентрацію окису вуглецю в атмосфері можна визначити або контролювати з використанням будь-якого методу, відомого в даній галузі. Подібні методи включають електрохімічне детектування, газову хроматографію, радіоізотопний метод, інфрачервону спектрометрію, колориметрію та електрохімічні методи, основані на вибірних мембранах [дивись, наприклад, Sundeman et al., *Clin. Chem.* 28: 2026-2032, 1982; Ingi et al., *Neuron* 16: 835-842, 1996]. Наприклад, за допомогою газової хроматографії і радіоізотопного методу можна детектувати концентрації окису вуглецю на рівні менше однієї частини на мільйон частин. Крім того, в даній галузі відомо, що концентрацію окису вуглецю на рівні менше ррт можна визначити в біологічній тканині за допомогою інфрачервоного газового детектора [дивись, наприклад, Morimoto et al., *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol* 280: H482-H488, 2001]. Детектори окису вуглецю і детектуючі газові пристрої є промислово доступними з багатьох джерел.

#### Одержання рідких композицій

Композиція на основі окису вуглецю також може являти собою рідку композицію окису вуглецю. Рідку композицію на основі окису вуглецю можна одержати будь-яким методом, відомим в даній галузі для розчинення газів в рідині. Наприклад, рідину можна вмістити в так званий «CO<sub>2</sub>-інкубатор» і піддати впливу постійного потоку окису вуглецю, переважно збалансованого з двоокисом вуглецю, до досягнення бажаної концентрації окису вуглецю в рідині. Як інший приклад газоподібний окис вуглецю можна «барботувати» безпосередньо в рідину до досягнення бажаної концентрації окису вуглецю в рідині. Кількість окису вуглецю, яку можна розчинити в конкретному водному розчині, зростає зі зменшенням температури. Як ще один приклад відповідну рідину можна пропустити через трубку для дифузії газу, де трубка проходить через атмосферу, що містить окис вуглецю (наприклад, при використанні пристрою такого, як екстракорпоральний мембранний оксигенатор). Окис вуглецю дифундує в рідину з одержанням рідкої композиції окису вуглецю.

Ймовірно, що подібна рідка композиція, призначена для введення живій тварині, повинна мати температуру, рівну або близько 37°C під час введення тварині.

Рідина може являти собою будь-яку рідину, відому фахівцям в даній галузі, як відповідну для введення пацієнтам або для збереження і/або промивання, і/або перфузії органів, що цікавлять, [дивись, наприклад, *Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Як правило, рідина буде водним розчином. Приклади відповідних розчинів включають забу-

ферений фосфатом фізіологічний розчин (PBS), Celsior, Perfadex, розчин Коллінза, цитратний розчин і розчин Університету Вісконсину (VW) [*Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. В одному варіанті даного винаходу рідина являє собою розчин Рінгера, наприклад, розчин Рінгера з лактатом або будь-яку іншу рідину, яку можна інфузувати пацієнту. В іншому варіанті рідина включає кров, наприклад, цільну кров.

Будь-яку відповідну рідину можна наситити до потрібної концентрації окису вуглецю за допомогою газового дифузора. Альтернативно можна використати заздалегідь приготовані розчини, які ретельно відрегульовані відносно вмісту потрібної концентрації окису вуглецю для застосування. Ретельний контроль дози можна досягнути за допомогою вимірювань за допомогою проникної для газу, непроникної для рідини мембрани, з'єднаної з аналізатором окису вуглецю. Розчини можна наситити до бажаних ефективних концентрацій і підтримувати на даному рівні.

Лікування пацієнтів композиціями на основі окису вуглецю

Пацієнта можна лікувати композицією окису вуглецю будь-яким способом, відомим в даній галузі для введення газів і/або рідин пацієнту. Композиції на основі окису вуглецю можна вводити пацієнту з вже поставленим діагнозом або йти ризику розвитку ілеусу, наприклад, хірургічним пацієнтам, включаючи пацієнтів, що піддавались SITx. Винахід включає системне введення рідких або газоподібних композицій окису вуглецю пацієнтам (наприклад, інгаляцією і/або введенням всередину) і місцеве застосування композицій в шлунково-кишковий тракт пацієнта (наприклад, введенням всередину, інгаляцією і/або введенням в черевну порожнину).

#### Системна доставка окису вуглецю

Газоподібні композиції окису вуглецю можна вводити пацієнту системно, наприклад, хірургічному пацієнту або донору і/або реципієнту трансплантата тонкого кишечника. Газоподібні композиції на основі окису вуглецю, як правило, вводять інгаляційно через рот або носові проходи в легені, де окис вуглецю може виявляти свою дію безпосередньо або після всмоктування в кровотік пацієнта. Концентрація активної сполуки (CO), що використовується в терапевтичній газоподібній композиції, буде залежати від швидкості всмоктування, розподілу, інактивації і виділення (як правило, через органи дихання) окису вуглецю, а також інших факторів, відомих фахівцям в даній галузі. Потрібно розуміти, що для будь-якого конкретного суб'єкта, конкретні схеми введення потрібно підводити протягом часу в залежності від потреб індивідуума і професійного рішення осіб, які займаються введенням або проводять спостереження за введенням композицій, і що вказані межі концентрацій є тільки зразковими і не призначаються для обмеження об'єму або практики заявленої композиції. Короткочасне, середнє за тривалістю і тривале введення окису вуглецю входить в об'єм даного винаходу в залежності, наприклад, від тяжкості або тривалості ілеусу у пацієнта. Окис вуглецю

можна вводити пацієнту протягом часу (включаючи невизначено довго), достатнього для лікування стану і вияву фармакологічної або біологічної дії, що призначається.

Подальше представляє приклади деяких способів і пристроїв, які можна використати для введення газоподібних композицій окису вуглецю пацієнтам.

#### Вентилятори

Окис вуглецю для медичних цілей (концентрації можуть варіювати) можна одержати в суміші з повітрям або іншим газом, який містить кисень, у звичайному резервуарі для стисненого газу (наприклад, 21% O<sub>2</sub>, 79% N<sub>2</sub>). Він не є реакційноспроможним, і концентрації, які необхідні для здійснення способів за даним винаходом, знаходяться нижче меж займистості (10% в повітрі). У лікарні газ переважно буде доставлятися до ліжка, де він буде змішуватись з киснем або кімнатним повітрям в змішувачі до бажаної концентрації в ррт (частини на мільйон). Пацієнт буде вдихати газову суміш через вентилятор, який буде налагоджений на швидкість потоку, основуючись на комфорті і потребах пацієнта. Це визначається за дихальними графіками (тобто частотою дихання, дихальним об'ємом і т.д.). Дана система введення повинна бути спланована таким чином, щоб забезпечити механізм(и) безпеки для попередження одержання не виправдано більших кількостей, ніж бажані, окису вуглецю. Можна контролювати концентрацію окису вуглецю у пацієнта при визначенні (1) карбоксигемоглобіну (COHb), який можна визначати у венозній крові і (2) окису вуглецю, що видихається, зібраного з бічного отвору вентилятора. Вплив окису вуглецю можна регулювати, основуючись на стані здоров'я пацієнта і на основі маркерів. Якщо необхідно, окис вуглецю можна видалити з організму пацієнта інгаляцією 100% O<sub>2</sub>. Окис вуглецю не метаболізується, і таким чином те, що поступило при вдиху, буде повністю виділятися при видиху, за винятком дуже невеликого процента, який перетворюється в СО<sub>2</sub>. Окис вуглецю також можна змішати з будь-якою кількістю O<sub>2</sub> для забезпечення терапевтичної доставки окису вуглецю без ризику можливої подальшої гіпоксії.

#### Маски на обличчя і палатки

Газоподібну суміш, яка містить окис вуглецю, готують, як указано вище, для пасивної інгаляції пацієнтами з використанням масок на обличчя або палаток. Концентрацію, яка вдихується, можна змінювати і можна видаляти просто доведенням до 100% O<sub>2</sub>. Потрібно проводити моніторинг концентрації окису вуглецю на або поряд з маскою або палаткою безпечним механізмом для попередження вдихання дуже високої концентрації окису вуглецю.

#### Портативний інгалятор

Стиснений окис вуглецю можна вмістити в портативний інгаляційний пристрій і вдихати в дозі, яка відмірюється, наприклад, для переривчастого лікування реципієнта, який не знаходиться в лікарні. У контейнері окис вуглецю можна вмістити в різних концентраціях. Пристрій може бути таким простим, як невеликий резервуар (наприклад, масою менше 5кг) з розбавленим відповідним чином

СО з клапаном для включення-виключення і трубкою, з якої пацієнт вдихає порцію СО за стандартною схемою або як це потрібно.

#### Внутрішньовенна штучна легеня

Штучну легеню (катетерний пристрій для газообміну в крові), що призначається для доставки O<sub>2</sub> і видалення СО<sub>2</sub>, можна використати для доставки окису вуглецю. Катетер після імплантації залишається в одній з великих вен і здатний доставляти окис вуглецю в заданій концентрації або при системному введенні, або місцево. Введення може бути місцевим введенням окису вуглецю у високій концентрації протягом короткого періоду часу в місці проведення процедури, наприклад, в безпосередній близькості до тонкого кишечника (дана висока концентрація буде швидко проникати і розбавлятися в кровотоці) або при відносно більш тривалому впливі окису вуглецю в більш низькій концентрації [дивись, наприклад, Hattler et al., Artif. Organs 18 (11): 806-812 (1994); і Golob et al., ASAIO J., 47 (5): 432-437 (2001)].

#### Камера з нормальним тиском

У деяких випадках буде бажаним впливати окисом вуглецю на пацієнта загалом. Пацієнт буде знаходитись всередині герметичної камери, яку заповнюють окисом вуглецю (в концентрації, безпечній для пацієнта або в концентрації, що представляє певний ризик, але без ризику для осіб, що знаходяться поряд). Після завершення лікування камеру можна наповнити повітрям (наприклад, 21% O<sub>2</sub>, 79% N<sub>2</sub>) і відібрати проби для аналізу за допомогою аналізатора окису вуглецю для гарантії того, що окис вуглецю не залишається перед виходом пацієнта з системи впливу.

#### Системна доставка рідких композицій СО

Даний винахід додатково включає створення рідких композицій СО для системного введення пацієнту, наприклад, інфузією пацієнту. Наприклад, рідкі композиції СО такі, як насичений СО розчин Рінгера, можна вводити пацієнту до, під час і/або після хірургічного втручання. Альтернативно або додатково можна вводити насичену СО частково і повністю цільну кров (або частково) пацієнту. Даний винахід також включає застосування засобів, здатних доставляти дози газоподібної або рідкої СО (наприклад, вивільняючі полімери, креми, мазі або пластирі).

Місцеве лікування шлунково-кишкового тракту окисом вуглецю

Альтернативно або додатково композиції на основі окису вуглецю можна застосовувати безпосередньо на шлунково-кишковий тракт, наприклад, на внутрішню і/або зовнішню поверхню шлунково-кишкового тракту загалом або на будь-яку його ділянку. Газоподібну композицію можна безпосередньо застосовувати на шлунково-кишковий тракт пацієнта, наприклад, хірургічного пацієнта або донора або реципієнта при трансплантації тонкого кишечника, будь-яким методом, відомим в даній галузі для вдування газів пацієнту. Наприклад, гази, наприклад, двоокис вуглецю, часто вдувають в шлунково-кишковий тракт і черевну порожнину пацієнта для полегшення обстеження відповідно під час ендоскопічних і лапароскопічних процедур [дивись, наприклад, Oxford Textbook of

Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Фахівці в даній галузі, очевидно, розуміють, що для введення композицій окису вуглецю безпосередньо у шлунково-кишковий тракт пацієнта можна використати аналогічні методи. Передбачається, що даний винахід можна використати для профілактики ілеусу, виникаючого в результаті лапароскопії і ендоскопії, наприклад, колоноскопії і езофагогастродуоденоскопії.

Водні композиції окису вуглецю можна також вводити місцево в шлунково-кишковий тракт пацієнта. Водні форми композицій можна вводити будь-яким методом, відомим в даній галузі для введення рідин пацієнтам. Як і у випадку газоподібних композицій, водні композиції можна застосовувати безпосередньо на внутрішню і/або зовнішню поверхню шлунково-кишкового тракту. Наприклад, водну форму можна вводити перорально, наприклад, при заковтуванні інкапсульованої або неінкапсульованої дози водної композиції окису вуглецю. Як інший приклад рідини, наприклад, сольові розчини, що містять розчинений CO, можна вводити в шлунково-кишковий тракт і черевну порожнину пацієнтів відповідно під час ендоскопічної і лапароскопічної процедури. У відношенні SITx можна проводити вплив *in situ* будь-яким методом, відомим в даній галузі, наприклад, промиванням органу рідкою композицією окису вуглецю перед витягненням з організму донора [дивись Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)].

Консервація органів *ex vivo* при трансплантації тонкого кишечника

Композиції на основі окису вуглецю можна використати для лікування пацієнтів, що піддавались трансплантації будь-якої ділянки шлунково-кишкового тракту, наприклад, трансплантації тонкого кишечника (SITx). Відносно трансплантації, композиції окису вуглецю можна використати для обробки донорів, реципієнтів і/або обробки самого органу на будь-якій стадії взяття і зберігання органу і процесу трансплантації. Орган шлунково-кишкового тракту можна взяти від донора, обробити композицією окису вуглецю *ex vivo* за даним винаходом і трансплантувати реципієнту. Альтернативно або додатково орган можна обробити *in situ*, поки він ще знаходиться в організмі донора. Необов'язково композицію окису вуглецю можна вводити реципієнту до, під час і/або після операції: наприклад, після реперфузії органу кров'ю реципієнта. Композицію окису вуглецю можна вводити донору до або під час взяття органу з організму донора.

Вплив окису вуглецю *ex vivo* на тонкий кишечник (або його ділянку) можна проводити впливом на тонкий кишечник атмосфери, що містить газоподібний окис вуглецю, рідкої композиції окису вуглецю, наприклад, рідкого перфузату, розчину для зберігання або розчину для промивання, що містить розчинений в ньому окис вуглецю, або обох разом.

Вплив газоподібних композицій на основі окису вуглецю на тонкий кишечник можна здійснити в будь-якій камері або просторі, придатними для створення атмосфери, в якій міститься газоподіб-

ний окис вуглецю у відповідних концентраціях. Подібні камери включають, наприклад, інкубатори і камери, призначені для акомодатії органу в розчині консерванту. Відповідна камера може являти собою камеру, в якій внутрішня атмосфера містить тільки газ, що подаються в камеру так, що можна встановити і підтримувати рівень окису вуглецю в заданій концентрації і чистоті, наприклад, коли камера є герметичною. Наприклад, можна використати CO<sub>2</sub>-інкубатор для впливу на орган композиції окису вуглецю, в якій газоподібний окис вуглецю подається безперервним потоком з резервуара, який містить газ.

Вплив на орган рідкої композиції окису вуглецю *ex vivo* можна проводити будь-яким методом, відомим в даній галузі. Наприклад, вплив *ex vivo* можна здійснювати в будь-якій камері або просторі, що має достатній об'єм для занурення органу, повністю або частково, в композицію окису вуглецю. Як інший приклад орган можна піддати впливу композиції окису вуглецю вміщенням органу в будь-який придатний контейнер і забезпеченням «обмивання» органу таким чином, що на орган впливає постійний потік композиції окису вуглецю.

Як інший приклад орган можна перфузувати композицією окису вуглецю. Термін «перфузія» є загальноприйнятим терміном в даній галузі і відноситься до пропущення рідини, наприклад, композиції окису вуглецю через кровоносні судини органу. Відносно шлунково-кишкового тракту термін включає промивання просвіту кишечника композицією окису вуглецю. Способи перфузії органів *ex vivo* та *in situ* є добре відомими в даній галузі. Орган можна піддати перфузії композицією на основі окису вуглецю *ex vivo*, наприклад, за допомогою пристрою для постійної гіпотермічної перфузії [дивись Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Необов'язково при перфузіях *in situ* або *ex vivo* орган можна перфузувати розчином для промивання, наприклад, розчином UW без окису вуглецю, перед перфузією композицією окису вуглецю для видалення крові донора з органу. Подібний процес можна здійснювати для уникнення виникнення конкуренції за окис вуглецю у гемоглобін донора. При іншому виборі композиції окису вуглецю може бути розчин для промивання.

Як ще один приклад орган може бути вміщений, наприклад, занурений в середовище або розчин, який не містить окис вуглецю і який, в свою чергу, вміщений в камеру таким чином, що середовище або розчин можна перетворити в композицію окису вуглецю за допомогою впливу атмосфери, яка містить окис вуглецю, як тут описано. Як ще один приклад орган можна занурити в рідину, яка не містить окис вуглецю і потім окис вуглецю можна «барботувати» в рідину.

Тонкий кишечник можна взяти від донора і трансплантувати будь-яким відомим фахівцям в даній галузі методом [дивись, наприклад, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Практикуючий фахівець в даній галузі, очевидно, розуміє, що методи трансплантації і/або взяття органів для трансплантації

можуть варіювати в залежності від багатьох обставин таких, як вік донора/реципієнта.

Даний винахід включає, що будь-який або всі вищезгадані способи впливу на орган рідкої композиції окису вуглецю, наприклад, промивання, занурення або перфузію, можна використати в даній процедурі, наприклад, при однократній SITx.

Застосування гемоксигенази-1 та інших сполук

Також передбачається включення в даний винахід індукції або експресії гемоксигенази-1 (НО-1) в поєднанні з введенням окису вуглецю. У відношенні SITx, необов'язково НО-1 можна індукувати в органі, органі донора, у реципієнтів або трьох разом взятих, в комбінації з введенням окису вуглецю. Наприклад, НО-1 можна індукувати у донора, наприклад, перед або під час видалення органу, в органі в умовах *ex vivo* і/або у реципієнта перед, під час або після трансплантації. Відносно інших втручань (тобто що не відносяться до трансплантації), що з більшою вірогідністю приводять до розвитку ілеусу, то НО-1 потрібно індукувати в кишечнику незадовго до, під час або незабаром після втручання. У тому значенні, в якому він використовується, термін «індукувати(ний)» відноситься до забезпечення підвищеної продукції білка, наприклад, НО-1, в ізольованих клітинах або клітинах тканини, органі або у тварини з використанням власного ендогенного (наприклад, нерекомбінантного) гена клітин, який кодує білок.

НО-1 можна індукувати у пацієнта будь-яким методом, відомим в даній галузі. Наприклад, продукцію НО-1 можна стимулювати геміном, протопорфірином-залізом або протопорфірином-кобальтом. Найрізноманітніші засоби, що не містять гем, включаючи важкі метали, цитокіни, гормони, окис азоту,  $\text{COCl}_2$ , ендотоксин і тепловий шок також є сильними стимуляторами експресії НО-1 [Otterbein et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 279: L1029-L1037, 2000; Choi et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517-554, 1997 і Tenhunen et al., *J. Lab. Clin. Med.* 75: 410-421, 1970]. НО-1 також піддається індукції в сильній мірі під дією різних агентів і умов, які приводять до окислювального стресу, включаючи перекис водню, речовини, що приводять до виснаження глутатіону, УФ-опромінення і гіпероксії [Choi et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517-554, 1997 і Keyse et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 99-103, 1989]. «Фармацевтична композиція, що містить індуктор НО-1» означає фармацевтичну композицію, що містить будь-який засіб, здатний індукувати НО-1 у пацієнта, наприклад, будь-який із засобів, описаних вище, наприклад, гемін, протопорфірин-залізо і/або протопорфірин-кобальт.

Експресію НО-1 в клітині можна підвищити за допомогою перенесення гена. У тому значенні, в якому він тут використовується, термін «експресувати(ний)» означає забезпечення підвищеної продукції білка, наприклад, НО-1 або феритину в ізольованих клітинах або клітинах тканини, органі або у тварини з використанням екзогенно введеного гена (наприклад, рекомбінантного гена). НО-1 або феритин переважно є того ж виду (наприклад, лю-

дини, миші, щура і т.п.), що і реципієнт для зведення до мінімуму вияву імунної реакції. Експресія може направлятися конститутивним промотором (наприклад, промоторами цитомегаловірусу) або тканеспецифічним промотором (наприклад, промотором сироватки молока для клітин молочної залози або промотором альбуміну для клітин печінки). Відповідний вектор генної терапії (наприклад, ретровірусу, аденовірусу, вірусу, пов'язаного з аденовірусом (AAV), вірусу віспи (наприклад, вакцинного), вірусу синдрому імунодефіциту людини (HIV), малого вірусу мишей, вірусу гепатиту В, вірусу грипу, герпесвірусу-1 і лентівірусу), що кодує НО-1 або феритин, потрібно вводити пацієнту перорально, інгаляційно або ін'єкційно в стінку кишечника, просвіт кишечника або черевну порожнину в будь-який час до, під час і/або після процедури, яка викликає ілеус, наприклад, приблизно через 24 год. або безпосередньо перед процедурою, яка викликає ілеус. Аналогічним чином можна вводити плазмідні вектори, що кодують НО-1 або апоферитин, наприклад, у вигляді «голої» ДНК в ліпосомах або мікрочастинках.

Крім того, екзогенний білок НО-1 можна вводити пацієнту безпосередньо будь-яким відомим в даній галузі методом. Екзогенну НО-1 можна безпосередньо вводити, в доповненні або як альтернатива, для індукції або експресії НО-1 у пацієнта, як описано вище. Білок НО-1 можна вводити пацієнту, наприклад, в ліпосомах і/або у вигляді злитого білка, наприклад, у вигляді ТАТ-злитого білка [дивись, наприклад, Becker-Hapak et al., *Methods* 24: 247-256, 2001].

Альтернативно або додатково будь-який з продуктів метаболізму НО-1, наприклад, білірубін, білівердин, залізо і/або феритин, можна вводити пацієнту в поєднанні з окисом вуглецю для запобігання або лікування ілеусу. Крім того, в даному винаході передбачається, що пацієнту можна вводити інші зв'язувальні залізо молекули, ніж феритин, наприклад, десфероксамін (DFO), декстран-залізо і/або апоферитин. Крім того, в даному винаході передбачається, що ферменти (наприклад, білівердинредуктаза), які каталізують розщеплення будь-якого з Даних продуктів, можна інгібувати з одержанням/посиленням бажаної дії. Будь-яку з вищезгаданих сполук можна вводити, наприклад, перорально, внутрішньовенно, внутрішньочеревинно або безпосереднім введенням на внутрішню або зовнішню поверхню кишечника.

В даному винаході передбачається, що сполуки, які вивільняють СО в організмі при введенні сполуки (наприклад, СО-вивільняючі сполуки, наприклад, фотоактивовані СО-вивільняючі сполуки), наприклад, декакарбонілдимарганець, димер трикарбонілдихлоррутенію (II) і метиленхлорид (наприклад, в дозі в межах від 400 до 600 мг/кг, наприклад, приблизно 500 мг/кг), також можна використати у способах за даним винаходом, як і замісники карбоксигемоглобіну і СО-вивільняючий гемоглобін.

Введення будь-якої з вищезгаданих сполук пацієнту можна проводити будь-яким шляхом, наприклад, пероральним, внутрішньовенним або внутрішньоартеріальним шляхом. Будь-яку з ви-

щезгаданих сполук можна вводити пацієнту місцево і/або системно і в будь-якому поєднанні.

Даний винахід додатково включає лікування ілеусу введенням CO пацієнту в комбінації з функціональною стимуляцією шлунково-кишкового тракту пацієнта, наприклад, введенням розм'якшувачів калу, послаблюючих і/або ковзаючих речовин пацієнту, і/або внутрішньовенною гідратацією і/або назошлунковою декомпресією. CO можна вводити в комбінації з будь-яким відомим методом або сполукою для лікування ілеусу.

Винахід частково ілюструється подальшими прикладами, які жодним чином не призначаються для обмеження винаходу.

Приклад 1. Захисна дія окису вуглецю при індукованому трансплантацією ілеусі

#### Тварини

Інбредних щурів самців LEW (RT1) масою 200-300г одержували з Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN) і утримували в приміщенні для тварин з ламінарним повітряним потоком в Університеті Пітсбурга. Тваринам досхочу згодовували звичайний раціон.

#### Трансплантація тонкого кишечника

Для дослідження можливості Захисної дії при ілеусі, викликаному трансплантацією тонкого кишечника, проводили ортотопічну SITx у син генних щурів Левіс. SITx при порожнинному дренаванні проводили з використанням раніше описаного методу. Виділяли тонкий кишечник донора цілком від зв'язки Трейтца до ілеоцекального клапана на судинній ніжці, що складається з портальної вени і верхньої брижової артерії разом з ділянкою аорти. Трансплантат перфузували через ділянку аорти 5мл охолодженого розчину Рінгера з лактатами і порожнину кишечника зрошували 20мл холодного фізіологічного розчину, що містить 0,5% неоміцину сульфату (Sigma, St. Louis, MO). Накладали анастомози від кінця-до-боку між трансплантатом аорти і нирковою артерією реципієнта і між трансплантованою портальною веною і порожнистою веною реципієнта за допомогою шовного матеріалу 10-0 Novafil™. Час ішемії на холоді становив 1год. У реципієнта видаляли весь кишечник і відновлювали цілісність кишечника накладенням проксимальних і дистальних анастомозів від кінця-до-кінця на кишечнику. Протягом 3 діб після операції тваринам-реципієнтам в профілактичних цілях вводили цефамандол нафат в дозі 20мг/день. Реципієнтам після трансплантації давали воду через 3год. після операції і годували через 24год. після операції.

#### Експериментальні групи

В даному досліді брало участь чотири групи тварин, двом з яких проводили SITx. Група 1 складалась з нормальних щурів, які не піддавались операції. Тварин групи 2 піддавали впливу CO без операції. Тваринам групи 3 проводили сингенну SITx, і реципієнтів утримували при кімнатному повітрі. Група 4 складалась з реципієнтів при SITx, яких вміщували в камеру з CO на 1год. перед операцією і потім повторювали вплив CO відразу ж після операції до забою. В обох групах 3 і 4 звичайні щури LEW служили як донори.

#### Вплив CO

Тварин обробляли CO в концентрації 250ppm. Стисло, 1% CO в повітрі змішували з повітрям (21% кисню) в циліндрі для змішування з нержавіючої сталі і потім подавали в скляну камеру для впливу об'ємом 3,70 футів<sup>3</sup> з швидкістю 12л/хв. Використали аналізатор CO (InterScan, Chatsworth, CA) для постійного визначення CO в камері. Концентрацію CO в камері протягом всього часу підтримували нарівні 250ppm. Під час обробки тварини одержували корм і воду.

#### Функціональні дослідження

Вплив CO на відсутність рухливості кишечника у кишкових трансплантатів оцінювали *in vitro* та *in vivo*. Тканини відбирали через 24 або 48год. після операції, періоди часу, в які спостерігали максимальне порушення рухливості, викликані трансплантацією. В умовах *in vitro* оцінювали механічну активність круглих м'язів, як описано раніше [Eskandari et al., Am. J. Physiol. 273(3 Pt 1): G727-34 (1997)]. Щурів усипляли і вбивали кровопусканням через 24год. після операції. Сегмент в середині дванадцятипалої кишки прикріплювали в розлінійній кюветі для розкриття Sylgaard, що містить заздалегідь насичений киснем бікарбонатний буфер Кребса-Пінгера (KRB вмм: 137,4 Na<sup>+</sup>, 5,9 K<sup>+</sup>, 2,5 Ca<sup>+</sup>, 1,2 Mg<sup>2+</sup>, 134 Cl<sup>-</sup>, 15,5 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1,2 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> і 11,5 глюкози), який врівноважували сумішшю 97% O<sub>2</sub>/3% CO<sub>2</sub>. Кишечник розкривали по брижовому краю і слизову видаляли зскрібанням гострим пінцетом. Смужки м'язової оболонки по повній товщині (1×6мм) розрізали паралельно шару круглих м'язів. М'язові смужки вміщували у звичайні горизонтальні механічні камери для органів, які постійно суперфузували заздалегідь насиченим киснем KRB при 37°C. Один кінець кожної смужки прикріплювали лігатурою до нерухомого блока та інший до ізометричного силового перетворювача (WPI, Sarasota, FL). Смужкам давали урівноважитись протягом 1год., після чого їх поступово розтягували до довжини, при якій мало місце максимальне спонтанне скорочення (L<sub>0</sub>). Після другого урівноваження протягом 30хв. будували криві залежності скоротність-ефект, впливаючи на тканини мускариновим агоністом бетанехолом у зростаючих концентраціях (від 0,3 до 300мкМ) протягом 10хв. з подальшим промиванням протягом 10хв. Скорочувальну активність розраховували інтегруванням площі під кривою, нормалізованою перетворенням маси і довжини смужки в квадратні міліметри тканини (1,03мг/мм<sup>2</sup>) і виражали в г/сек./мм<sup>2</sup>.

Прохідність кишечника визначали у контрольних тварин і тварин, що піддавались маніпуляціям, через 48год. після операції при оцінці розподілу по кишечнику міченого флуоресцеїном декстрану (Molecular Probes). Тваринам давали легкий наркоз інгаляцією ізофлурану і згодовували мічений декстран (200мкл з розчину з концентрацією 6мг/мл на фізіологічному розчині). Через 2год. після введення тварин вбивали і витягували весь кишечник від шлунку до дистальної частини ободової кишки. Витягували вміст шлунку, тонкого кишечника (розділеного на 10 сегментів однакової довжини), сліпої кишки і ободової кишки (3 сегменти, проксимальний, середній і дистальний), вміщу-

вали в 2мл фізіологічного розчину і енергійно перемішували для виділення декстрану, що знаходиться в кожному сегменті. Після центрифугування тканини і хімусу кишечника, аліквотні порції супернатанту аналізували в паралелях на рідері для планшетів (CytoFluor II; довжина хвилі збудження 530nm і емісії 590nm) для кількісного визначення сигналу флуоресценції в кожному сегменті кишечника. Бували середню гістограму сигналів флуоресценції для демонстрації змін розподілу міченого декстрану у тварин дослідних груп. Дані щодо прохідності кишечника статистично обробляли при обчисленні геометричної середньої (GC).

#### Морфологічні дослідження

##### Гістологічні дослідження

Трансплантати тонкого кишечника фіксували в 10% забуференому формаліні і заливали в парафін. Робили зрізи товщиною 4мкм і забарвлювали гематоксиліном та еозинном.

##### Гістохімія на мієлопероксидазу

Готували цілісні препарати м'язової оболонки з середньої частини тонкого кишечника, взятого через 24год. після операції. Сегменти кишечника занурювали в KRB в розлінійну скляну кювету Sylgaard і прикріплювали без розтягнення по брижовому краю. За допомогою циркуля визначали довжину і ширину сегментів. Ободову кишку розкривали по брижовому краю і розтягували до 150% довжини і 250% ширини. За допомогою гострого пінцета видаляли слизову і підслизову і тканину, що залишилась, фіксували в 100% денатурованому етанолі протягом 30хв. Після промивання декілька разів в PBS тканину обробляли реактивом Ханкера-Ятеса для виявлення поліморфоядерних нейтрофілів (PMN), що володіють активністю мієлопероксидази (MPO) [Sheibani et al., Am. J. Clin. Pathol. 75(3): 367-70 (1981)]. Тканини вміщували на предметне скло з використанням Gel/Mount™ (Biomedica Corp., Foster City, CA), покривали покривним склом і досліджували під світловим мікроскопом (Nikon FXA, Fryer, Huntley, IL) під збільшенням 200x. Визначали кількість MPO-позитивних PMN, інфільтруючих у зовнішню м'язову оболонку по середніх значеннях в 5-6 суміжних полях зору між брижовим і протибрижовим краями.

#### Молекулярні біологічні дослідження

##### Тест захисту від РНКаз (RPA)

Для встановлення подальшого аналізу експресії мРНК цитокінів в слизовій і м'язовій оболонці ставили тест захисту від РНКаз з використанням набору Riboquant (Pharmingen), слідуючи протоколу виробника. Синтезували численні мічені радіоізотоп антисмислові РНК-зонди з використанням набору для транскрипції *in vitro* і набору матриць мультизондів цитокіну (rCK-1), який включав зонди для цитокінів (інтерлейкіну (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  і IFN- $\gamma$ ) і генів «домашнього господарства» (L32 і GAPDH). <sup>32</sup>P-мічені зонди (8,0 $\times 10^5$  імпульсів в хвилину) і пробу РНК (5мкг) гібридизували при 56°C протягом 12-16год. і одностандартну РНК, що включає антисмислові РНК-зонди, розщеплювали з використанням набору RPA (Pharmingen). Захищені зонди наносили на 40% поліакриламідний гель. Автора-

діографію проводили з використанням системи PhosphorImager (Molecular Dynamics, Krefeld, Німеччина). Кількісне визначення радіоактивності смуг мРНК проводили за допомогою NIH Image, нормалізованою до GAPDH, і виражали у вигляді співвідношення цитокінів/GAPDH (n=3-4).

RT-ПЛР в режимі реального часу з використанням SYBR зеленого

Оцінювали вплив інгаляції СО на індуковану трансплантацією експресію генів прозапалення і протизапалення в екстрактах м'язової оболонки за допомогою RT-ПЛР. Зовнішню м'язову оболонку витягували з нормального і трансплантованого кишечника через 4год. після операції і заморожували в рідкому азоті. Даний період часу знаходиться в межах вияву максимальної експресії медіаторів запалення, яка має місце між 3 і 6год. після розкриття черевної порожнини. Екстракції загальної фракції РНК проводили з використанням екстракції гуанідій-тіоціанат-фенол-хлороформом, як описано раніше [Eskandari et al., Am. J. Clin. Pathol. 75(3): 367-370 (1997)]. Осідання РНК після центрифугування ресуспендували в розчині для ресуспендування РНК (Ambion Inc., TX) з подальшим видаленням потенційно забруднюючої ДНК обробкою оберненою ДНКазою I (DNA-Free Kit, Ambion Inc., Austin, TX). Рівні аліквотні порції (по 5мкг) загальної фракції РНК з кожної проби визначали кількісно спектрофотометрією" (при довжині хвилі 250nm) і розливали на аліквотні порції з концентрацією 40нг/мкл. Максимальну експресію РНК визначали в паралелях встановленням двостадійної RT-ПЛР з SYBR зеленим в режимі реального часу. GAPDH використали як внутрішній стандарт. Аліквотні порції РНК піддавали синтезу першого ланцюга, комплементарної ДНК (кДНК) з використанням довільних гексамерів (PE applied Biosystems, Foster City, CA) і Super Script II (Life Technologies, Rockville, MD). Послідовності праймерів одержували з літератури або синтезували згідно з опублікованими послідовностями (таблиця 1). Реакційну суміш для ПЛР готували з використанням реагентів для ПЛР з SYBR зеленим (PE Applied Biosystems). Кожну пробу аналізували в двох паралелях з використанням умов, рекомендованих виробником. Реакційну суміш інкубували при 50°C протягом 2хв. для активації урацил-N'-глікозилази і потім протягом 12хв. при 95°C для активації полімерази Amplitaq Gold з подальшими 40 циклами, що перебувають при 95°C протягом 15сек. і при 60°C протягом 1хв. в системі детектування послідовностей ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). За даними ПЛР в режимі реального часу будували графік залежності  $\Delta R_n$  сигналів флуоресценції від кількості циклів. Довільний поріг був встановлений в середній частині лінійної ділянки графіка циклів в  $\log \Delta R_n$ . Поріг циклів ( $C_T$ ) визначали як число циклів, при яких  $\Delta R_n$  перетинає даний поріг. Кількісне визначення експресії мРНК нормалізували до GAPDH і розраховували по відношенню до контролю з використанням порівняльного  $C_T$ -методу [Schmittgen et al., J. Biophys. Methods 46(1-2): 69-8 (2000)].

Для виключення ампліфікації при ПЛР забруднюючої генної ДНК в кожну реакцію ПЛР включали

RT-негативні контролю (проби, що містять РНК, яка не піддається оберненій транскрипції). Проводили визначення кривої плавлення для кожної реакції для гарантії ампліфікації специфічного продукту. Крім того, праймери піддавали електрофорезу в гелі для підтвердження відсутності неспецифічних смуг і підтвердження того, що амплікони мали правильний розмір. Оцінювали ефективність ампліфікації

кДНК-мішені при ПЛР для визначення лінійності розбавлення. Робили серійне 3-кратне розведення кДНК в трьох паралелях. Будували стандартні криві залежності значення  $C_t$  від числа копій. Вважали прийнятними нахили стандартних кривих  $-3,2 \pm 0,3$  при коефіцієнтах кореляції 0,99, що мають відповідну ефективність  $100 \pm 10\%$ .

Таблиця 1 Підсумовані дані по праймерах

Таблиця 1

Праймер	Послідовність в напрямі 5' -3'	Порядковий номер послідовності	Джерела
GAPDH	ATGGCACAGTCAAGGCTGAGACGCTCCTGGAAGATGGTGAT	1	NM_017008
		2	
IL-6	GCCCTTCAGGAACAGCTATGATGTCAACAACATCAGTCCCAAGA	3	M26744
		4	
IL-1 $\beta$	CACCTCTAAGCAGAGCACAGGGGTTCATGGTGAAGTCAAC	5	Li & Wang, Brain Research Protocols 2000; 5, 211-217
		6	
TNF $\alpha$	GGTGATCGGTCCCAACAAGGACACGCTGGCTCAGCCACTC	7	Fink et al. Nature Med 1998; 4: 1329-1333.
		8	
ICAM-1	CGTGGCGTCCATTTACACCTTTAGGGCCTCCTCCTGAGC	9	NM_012967
		10	
iNOS	GGAGAGATTTTTCACGACACCCCATGCATAATTTGGACTTGCA	11	NM_012611
		12	
COX-2	CTCTGCGATGCTCTTCCGAGAAGGATTTGCTGCATGGCTG	13	AF233596
		14	
IL-10	TGCAACAGCTCAGCGCATGTCACAGCTTTCGAGAGACTGGAA	15	Harness et al., J. Neurol. Sci. 2001; 187,7-16.
		16	

#### Нозерн-блотинг HO-1

Проводили нозерн-блотинг, як описано раніше (Camhi et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 13: 387-398 (1995)). Стисло, проводили електрофорез 10мкг загальної фракції РНК, електрагованої з тканини, як описано вище, в 1% агарозному гелі і потім переносили на нейлонові мембрани за допомогою капіляра. Потім нейлонові мембрани заздалегідь гібридизували в буфері для гібридизації (1% бичачий сироватковий альбумін (BSA), 7% SDS, 0,5М PO<sub>4</sub> буфер, pH7,0 і 1мМ ЕДТА) при 65°C протягом 2год. з подальшою гібридизацією з олігонуклеотидними зондами <sup>32</sup>P-міченого кДНК HO-1 щура, <sup>32</sup>P-мічений L-феритину щура або <sup>32</sup>P-міченого H-феритину щура при 65°C протягом 24год. Потім нейлонові мембрани промивали в буфері А (0,5% BSA, 5% SDS, 40мМ PO<sub>4</sub>-буфер, pH7,0 і 1мМ ЕДТА) протягом 15хв. 2 рази при 65°C з подальшим відмиванням в буфері В (1% SDS, 40мМ PO<sub>4</sub>-буфер, pH7,0 і 1мМ ЕДТА) протягом 15хв. 3 рази при 65°C.

#### кДНК-зонд HO-1

Повнорозмірна кДНК щура (pHO-1) була люб'язно надана Dr. S.Shibahara з Університету Тохоку (Sendai, Японія). PHOI субклонували у вектор pBluescript і розщеплювали за допомогою HindIII/EcoRI для виділення вставки кДНК HO-1 розміром 0,9т.п.н. у векторі pBluescript. Для конт-

ролю варіацій в кількості РНК в різних пробах або помилках при нанесенні, блоти гібридизували з олігонуклеотидним зондом, відповідним 18S рРНК. Синтезували олігонуклеотид розміром 24 пари основ (5'-ACGGTATCTGATCGTCTTCAAC-3'; SEQ ID NO:17), комплементарний 18S РНК з використанням ДНК-синтезатора (Applied Biosystems, Foster City, CA). кДНК HO-1 мітили [<sup>32</sup>P] СТР з використанням набору довільних праймерів виробництва Boehringer Mannheim (Mannheim, Німеччина). Всі олігонуклеотидні зонди мітили [<sup>32</sup>P] АТФ в 3'-кінці за допомогою кінцевої дезоксинуклеотидилтрансферази (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD). Сигнали авторадіографії порівнювали з 18S рРНК, одержаної з того ж блоту.

#### Визначення рівня цитокінів в сироватці крові

Проби сироватки крові послідовно відбирали через 1, 4 і 24год. після реперфузії і зберігали при -80°C до аналізу. Концентрацію сироваткових цитокінів, включаючи IL-6, IL-10 і TNF- $\alpha$ , визначали з використанням наборів для твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) для проб турів, як описано виробником (R&D, Cambridge, MA).

Визначення концентрації нітритів/нітратів в сироватці крові

Для контролю стабільних кінцевих продуктів метаболізму NO визначали концентрацію нітритів/нітратів в сироватці крові через 1, 4 і 24год. з

використанням промислово доступних тест-наборів (Cauman, Ann Arbor, MI) і кількісний аналіз проводили, слідуючи рекомендаціям виробника. У даній аналітичній системі нітрати відновлюють до нітритів з використанням нітратредуктази і потім визначають концентрацію нітритів з використанням реакції Грісса.

#### Культивування м'язових клітин

Витягували тонкий кишечник контрольних і щурів (в стерильних умовах), що піддавались трансплантації через 24 год. після операції. Ободову кишку залишали на місці. Кишечник переносили в стерильний гомогенізатор, що містить збалансований розчин Хенкса (Sigma, St. Louis, MO) з 200 О/мл пеніциліну G і 200 мкг/мл стрептоміцину (HBSS). М'язову оболонку відділяли, як описано вище, і переносили на стерильну марлю. Визначали сиру масу проб і робили аліквотні навішування масою 150-200 міліграм тканини. Тканини двічі промивали в HBSS. Аліквотні порції переносили в ямкові культуральні планшети розміром 35 мм, що містять 3 мл середовища DMEM, яке не містить сироватку крові, але містить пеніцилін/стрептоміцини, як указано вище, та інкубували протягом 24 год. в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Після інкубації аліквотні порції об'ємом 1 мл заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80°C. Концентрацію білків цитокінів визначали ELISA і нормалізували до маси сирової тканини. Промислово доступні набори для встановлення ELISA використовували згідно з рекомендаціями виробника.

#### Аналіз даних

Дані виражали у вигляді середнього значення плюс або мінус середньоквадратична похибка (SEM). Статистичну обробку проводили по t-тесту Стьюдента або варіаційним аналізом (ANOVA), у випадках відповідності. Рівень імовірності  $p \leq 0,05$  вважали статистично значущим.

СО придушує розвиток дисфункції кишечника, викликаной SITx

Вплив SITx і обробки СО на спонтанну і стимульовану бетанехолом скоротність круглих м'язів тонкого кишечника досліджували в дослідях на бані для органів в умовах *in vitro*. Тканини відбирали через 24 год. після реперфузії трансплантату кишечника. М'язові смужки з кишечника контрольних тварин мали регулярні скорочення (дані не представлені). Обробка СО протягом 24 год. не надавала впливу на спонтанну скорочувальну активність у неоперованих контрольних щурів (дані не представлені). Після проведення SITx спонтанна скорочувальна активність була відсутня (дані не представлені). Обробка СО відновлювала спонтанну скорочувальну активність у щурів, що піддавались трансплантації (дані не представлені).

Додавання бетанехолу (від 0,3 до 300 мкМ) до суперфузату на бані викликало залежні від концентрації тоничні скорочення. Інтегровані скорочувальні реакції, нормалізовані до площі тканини, одержані у відповідь на зростаючі концентрації бетанехолу, подані на Фіг.1. У контрольних тварин скорочувальна активність залежала від концентрації в межах від 10 до 300 мкМ бетанехолу з максимальним значенням  $3,5 \pm 0,7$  г/мм<sup>2</sup>/сек. у відповідь на концентрацію бетанехолу, рівну 100 мкМ. Обро-

бка СО не надавала впливу на скоротність у неоперованих тварин (максимальна скорочувальна активність  $3,2 \pm 0,5$  г/мм<sup>2</sup>/сек.). SITx приводила до зниження скорочувальної активності по всій кривій залежності дозу-ефект у порівнянні з контролем, яке ставало статистично достовірним при значеннях концентрації бетанехолу вище 10 мкМ. При концентрації бетанехолу 100 мкМ максимальна скорочувальна активність знижувалась на 49% до  $1,7 \pm 0,4$  г/мм<sup>2</sup>/сек. Обробка СО попереджала інгібуючу дію SITx по всій кривій залежності доза-ефект, відновлюючи максимальну скорочувальну активність до контрольних значень ( $3,6 \pm 0,7$  г/мм<sup>2</sup>/сек.).

Прохідність кишечника визначали у контрольних тварин і тварин, що піддавались трансплантації через 48 год. після операції, за оцінкою розподілу в кишечнику введеного перорально міченого флуоресцеїном декстрану. Фіг.2A-2B являють собою гістограми прохідності, що показують розподіл міченого FITC декстрану, який не всмоктується, по шлунково-кишковому тракту (від шлунку до ободової кишки) через 2 год. після перорального введення. Середня гістограма флуоресценції в кожному сегменті кишечника через 2 год. після перорального введення від неоперованих контрольних щурів і від контрольних щурів, оброблених СО, представлена на Фіг.2A. В обох групах велика частина флуоресцентної мітки знаходилась в сегментах 9 і 10 тонкого кишечника і сліпої кишки. Протилежна тенденція характерна для розподілу, що спостерігається у щурів, які піддавались трансплантації (Фіг.2B), де флуоресцентна мітка виявлялась в основному в шлунку з деякою кількістю мітки, що поступила в проксимальну частину тонкого кишечника. У тварин після трансплантації, оброблених СО, розподіл мітки був більш дистальним з накопиченням в основному в сегментах 6, 7 і 8 тонкого кишечника. Статистичний аналіз даних за розрахунками середньої геометричної, представлений загальною на Фіг.2C, показує, що інгаляційний вплив СО достовірно підвищував прохідність кишечника у щурів, які піддавались трансплантації тонкого кишечника.

#### Рекрутинг лейкоцитів

Клітинні події у м'язовій оболонці тонкого кишечника оцінювали через 24 год. після SITx. Активність мієлопероксидази (МРО), визначену гістохімічним методом Хенкера-Ятеса, використали для кількісної оцінки лейкоцитарного інфільтрату у контрольних тварин і тварин після трансплантації з і без обробки СО. У неоперованих контрольних і оброблених СО контрольних щурів кількість МРО-позитивних клітин була низькою (дані не представлені). SITx приводила до достовірного рекрутингу лейкоцитів в м'язову оболонку кишечника (дані не представлені). Кількість клітин в полі зору (200x) представлена на Фіг.3, яка показує, що обробка СО знижувала середнє число МРО-позитивних клітин; однак дане зниження не досягало статистичної значущості ( $p=0,08$ ,  $n=6$ ).

Секвенування цитокінів в слизовому і м'язовому шарах

Результати тесту захисту від РНКаз показували, що SITx спричиняла значне підвищення мРНК IL-6 і IL-1 $\beta$  в трансплантаті з піком через 3-



6год. (Фіг.4А і 4В). Отже, концентрацію мРНК медіаторів запалення визначали через 4год. після реперфузії.

#### Молекулярна запальна відповідь

Фіг.5 представляє серію графіків у вигляді діаграми, що показують вплив СО на експресію синтази окису азоту (iNOS), IL-6, IL-1 $\beta$  і IL-10 в м'язовому шарі трансплантатів кишечника через 4год. після реперфузії. Дані ПЛР в режимі реального часу показували достовірне підвищення експресії мРНК цитокінів прозапалення (IL-6 (в 3400 разів) і IL-1 $\beta$  (в 38 разів) у м'язовій оболонці трансплантатів кишечника. Концентрація TNF $\alpha$  також була достовірною вище, але в меншій мірі (в 3 рази). Експресія гена ICAM-1, молекули адгезії, яка грає важливу роль в рекрутингу циркулюючих клітин запалення, була вище в 14 разів. У щурів-реципієнтів, оброблених СО, експресія IL-6 і IL-1 $\beta$  в середньому була нижчою (відповідно на 40% і 50%), в той час, як експресія TNF $\alpha$  і ICAM-1 залишалась без змін. За рахунок великого значення стандартного відхилення для даних по групах тварин після трансплантації зменшення експресії мРНК IL-6 у оброблених СО щурів не досягало статистичної значущості ( $p=0,084$ ,  $n=6$ ), в той час, як експресія IL-1 $\beta$  знижувалась достовірно ( $p=0,046$ ,  $n=6$ ). Експресія генів форм циклооксигенази (COX-2), що індуються, і синтази окису азоту (iNOS) також була достовірно вище у м'язовому шарі трансплантатів (відповідно в 5 разів і 48 разів). Середня відносна експресія мРНК обох ферментів знижувалась приблизно на 50% у оброблених СО щурів. Аналогічним чином, зниження експресії iNOS не було достовірним ( $p=0,060$ ,  $n=6$ ), в той час, як зменшення експресії COX-2 було достовірним ( $p=0,26$ ,  $n=6$ ). Тільки один інгаляційний вплив СО не надавав впливу на експресію якого-небудь з медіаторів, що тестуються.

Фіг.6 представляє групу графіків у вигляді діаграми, що показують вплив СО на концентрацію IL-6 і нітратів/нітритів у тварин після пересаджування трансплантату кишечника через 1 і 4год. після реперфузії. Для одержання цих даних проби сироватки крові відбирали через різні періоди часу після трансплантації і зберігали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до аналізу. Концентрацію IL-6 в сироватці крові визначали з використанням набору для твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) для проб щурів (R&D, Cambridge, MA). Концентрацію нітритів/нітратів, стабільних кінцевих продуктів метаболізму NO, визначали за допомогою промислово доступного тест-набору (Cayman, Ann Arbor, MI). У даній аналітичній системі нітрати відновлюють до нітритів з використанням нітратредуктази і потім визначають концентрацію нітритів в пробі з використанням реакції Грісса. Концентрація IL-6 і нітритів/нітратів у тварин, що піддавались SITx, і оброблених повітрям, підвищувалась протягом часу. У тварин після SITx і обробки СО (SITx+CO) відмічали достовірне зменшення концентрації IL-6 і нітритів/нітратів в сироватці крові.

Дані, що показують захисну дію СО при дисфункції кишечника, індукованій трансплантацією, представлені в таблиці 1 нижче. У ранньому періоді після SITx (<48год.) для кишкових трансплантатів спостерігали достовірне зниження прохідності кишечника, зменшення скоротності м'язів і масивні запальні інфільтрати. Дані зміни були менш виражені у реципієнтів після обробки СО. Концентрація IL-6 в сироватці крові (через 4год. після реперфузії) була достовірно нижчою при SITx з обробкою СО у порівнянні з SITx без обробки СО. СО попереджав запалення трансплантату кишечника та I/R пошкодження, викликані SITx, негативною регуляцією цитокінів прозапалення IL-6 і IL-1.

Таблиця 2

СО придушує дисфункцію кишечника, викликану SITx

	Прохідність кишечника	Скорочувальна здатність (г/мм <sup>2</sup> /сек.)	Запальні інфільтрати	мРНКIL-1 $\beta$ (%GAPDH)	мРНКIL-6 (%GAPDH)	Концентрація IL-6 в сироватці крові (пг/мл)
Нормальні	Норма	2,5 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 1,1	0	0,8 $\pm$ 0,1	273
SITx	Знижена	1,0 $\pm$ 0,3	37 $\pm$ 8,4	12,2 $\pm$ 2,7	41,9 $\pm$ 3,8	6042
SITx+CO	Норма	3,0 $\pm$ 0,4	21 $\pm$ 3,2	6,6 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 1,8	1439

Приклад 2. СО придушує розвиток ілеусу, що виник внаслідок хірургічних маніпуляцій на тонкому кишечнику

#### Тварини

Мишей самців дикого типу C57B16 (20-25г) одержували з Harlan (Indianapolis, IN). Мишей утримували в приміщенні, що не містить патогенів, при циклі 12год. світло/темрява і досхочу згодували промислово доступні сухі корми для гризунів і давали воду.

Експериментальні групи і оперативні втручання

Статевозрілих мишей розділяли на чотири дослідних групи: інтактні контрольні тварини (контроль); контрольні тварини, оброблені СО (контроль+СО); миші, що піддавались оперативному втручанню на тонкому кишечнику (IM), і миші, що піддавались оперативному втручанню і обробці СО (IM+СО).

Хірургічне втручання. Мишей усипляли інгаляцією ізофлураном і розкривали черевну порожнину по серединній лінії лапаротомією. Оголяли тонкий кишечник і м'яко натискали вздовж всієї його довжини з використанням аплікаторів із зволоженої стерильної вати. Дана процедура призначалась для стимуляції «руху» кишечника, що звичайно проводиться під час операції на кишечнику в клініці. Змінювали положення кишечника в черевній порожнині і розріз закривали двома шарами безперервних швів. Тривалість операції становила

15хв., через 20хв. після припинення анестезії тварини вільно пересувались по клітці.

Інгаляційна обробка СО. Мишей, що знаходяться в клітках, вміщували в камери з плексигласу, які постійно вентильовали повітрям або повітрям, що містить СО (250ppm). Забезпечували приймач для постійного моніторингу концентрації кисню вуглецю всередині камери. Протягом всього часу тварини досхочу одержували корм і воду. Мишей піддавали впливу СО або повітря за 1год. до лапаротомії, забирали для проведення хірургічної операції і потім повертали в камери на 24год. Мишей, що не піддавались операції, забирали з камери на такий же період часу і потім повертали в камеру на 24год.

#### Морфологічні дослідження

Гістохімія на МРО. Готували цілісні препарати м'язової оболонки з середньої частини дванадцятипалої кишки, взятої через 24год. після операції. Сегменти кишечника ^занурювали в ICRB в розлінійній скляній кюветі Sylgaard™ і прикріплювали шпильками без розтягнення по брижовому краю. За допомогою циркуля визначали довжину і ширину сегментів. Ободову кишку розкривали по брижовому краю і розтягували до 150% довжини і 250% ширини. За допомогою гострого пінцета видаляли слизову і тканину, що залишилась, фіксували в 100% денатурованому етанолі протягом 30хв. Після промивання декілька разів в PBS тканину обробляли реактивом Ханкера-Ятеса (Polysciences, Warrington, PA) для виявлення поліморфоядерних нейтрофілів (PMN), що володіють активністю мієлопероксидази (MPO). Тканини вміщували на предметне скло з використанням Gel/Mount (Biomedica Corp., Foster City, CA), покривали покривним склом і досліджували під світловим мікроскопом (Nikon Microphot-FXA, Fryer, Huntley, IL) під збільшенням 200х. Визначали кількість PMN, інфільтруючих зовнішню м'язову оболонку по середніх значеннях чисел, зібраних в 5-6 суміжних полях зору між брижовим і протибрижовим краями.

Імуногістохімія на HO-1. Цілісні препарати м'язової оболонки, приготовані як представлено вище, фіксували у фіксаторі Замбоні протягом 1год., освітлювали ДМСО. Після промивання декілька разів PBS тканини обробляли PBS, що містить 10% нормальної ослиної сироватки і 0,1% Тритону-X. Потім цілісні препарати інкубували протягом ночі з кролячими антитілами проти щурячого HO-1 (1:500, Stressgen, Vancouver, Канада), промивали та інкубували протягом 2год. з ослиним кон'югатом проти кролячого IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). Тканини покривали Gel/Mount™, як описано вище, і досліджували під флуоресцентним мікроскопом (Nikon Microphot-FXA, Huntley, IL).

#### Функціональні дослідження

Мишей ушивали і вбивали кровопусканням в кінці 24-часової обробки СО або кімнатним повітрям в камері. Визначали механічну активність круглих м'язів, як описано у Eskandari et al. [Am. J. Physiol. 273: G727-G734 (1997)]. Стисло, сегмент в середині тонкого кишечника вміщували в розлінійну кювету для розкриття Sylgaard, що містить за-

здалегідь насичений киснем бікарбонатний буфер Кребса-Рінгера (KRB в mM: 137,4 Na<sup>+</sup>, 5,9 K<sup>+</sup>, 2,5 Ca<sup>2+</sup>, 1,2 Mg<sup>2+</sup>, 134 Cl<sup>-</sup>, 15,5 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1,2 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> і 11,5 глюкози), пропускали газову суміш з 97% O<sub>2</sub>/3% CO<sub>2</sub> для встановлення pH7,4. Кишечник розкривали по брижовому краю і слизову видаляли зскрібанням гострим пінцетом. Смужки м'язової оболонки по повній товщині (1×6мм), розрізані паралельно круглим м'язам, вміщували у звичайні горизонтальні механічні камери для органів і постійно суперфузували заздалегідь насиченим киснем ICRB при 37°C. Один кінець кожної смужки прикріплювали лігатурою до нерухомого блока та інший до ізометричного силового перетворювача (WPI, Sarasota, FL). Смужки врівноважували протягом 1год., після чого їх поступово розтягували до L<sub>0</sub> (довжина, при якій є максимальне спонтанне скорочення). Після запису базової лінії протягом 30хв. будували криві залежності скоротність-ефект, впливаючи на тканини мускариновим агоністом бетанехолом у зростаючих концентраціях (від 0,3 до 300мкМ) протягом 10хв. з подальшим промиванням протягом 10хв. Скорочувальну активність вилічували інтегруванням площі під кривою. Реакцію нормалізували перетворенням маси і довжини зрізу в квадратні міліметри тканини (1,03мг/мм<sup>2</sup>) і виражали в г/сек./мм<sup>2</sup>. Прохідність кишечника визначали у контрольних тварин і тварин, що піддавались маніпуляціям через 24год. після операції, за оцінкою розподілу по кишечнику міченого флуоресцеїном декстрану, що не всмоктується (Molecular Probes). Тваринам давали легкий наркоз інгаляцією ізофлураном і згодували мічений декстран (100мкл з вихідного розчину з концентрацією 25мг/мл). Через 90хв. після введення тварин вбивали і витягували кишечник цілком від шлунку до дистальної частини ободової кишки. Вміст шлунку, тонкого кишечника (розділеного на 10 сегментів однакової довжини), сліпої кишки і ободової кишки (3 сегменти однакової довжини) подрібнювали в 1мл фізіологічного розчину і енергійно перемішували для виділення декстрану, що знаходиться в кожному сегменті. Після центрифугування тканини і хімусу кишечника, аліквотні порції освітленого супернатанту аналізували в двох паралелях на рідері для планшетів (CytoFluor II; довжина хвилі збудження 530nm і емісії 590nm) для кількісного визначення сигналів флуоресценції в кожному сегменті кишечника. Визначали розподіл сигналу по шлунково-кишковому тракту при обчисленні геометричної середньої GC=Σ (процент загального сигналу флуоресценції в кожному сегменті × кількість сегментів) для кількісного статистичного порівняння даних за експериментальними групами.

RT-ПЛР в режимі реального часу з SYBR зеленим

Експресію генів про- і протизапалення визначали RT-ПЛР в режимі реального часу. Зовнішню м'язову оболонку тонкого кишечника відбирали в 4 часові точки (3, 6, 12 і 24год.) після операції і заморожували в рідкому азоті. Екстракцію загальної фракції РНК проводили з використанням екстракції гуанідій-тіоціанат-фенол-хлороформом, як описано у Eskandari et al. (Id). Осідання РНК після

центрифугування ресуспендували в розчині для ресуспендування РНК (Ambion Inc., Austin, TX) з подальшим видаленням потенційно забруднюючої ДНК обробкою ДНКазою I (DNA-Free Kit, Ambion Inc., Austin, TX). Рівні аліквотні порції (по 5мкг) загальної фракції РНК з кожної проби визначали кількісно спектрофотометрією (при довжині хвилі 250нм). Максимальну експресію РНК визначали в двох паралелях встановленням двостадійної RT-ПЛР з SYBR зеленим в режимі реального часу,  $\beta$ -актин використали як внутрішній стандарт. Аліквотні порції РНК (40нг) піддавали синтезу першого ланцюга комплементарної ДНК (кДНК) з використанням довільних гексамерів (PE applied Biosystems, Foster City, CA) і Super Script II™ (Life Technologies, Rockville, MD). Праймери одержува-

ли з літературних джерел або синтезували згідно з опублікованими послідовностями (таблиця 3). Суміш для ПЛР готували з використанням реагентів для ПЛР з SYBR зеленим (PE Applied Biosystems). Кожну пробу аналізували в двох паралелях з використанням умов, рекомендованих виробником. За даними ПЛР в режимі реального часу будували графік залежності сигналів флуоресценції від кількості циклів. Довільний поріг був встановлений в середній лінійній ділянці графіка циклів в  $\log \Delta R_n$ . Поріг циклів ( $C_{1.}$ ) визначали як число циклів, при яких  $\Delta R_n$  перетинає даний поріг. Кількісне визначення експресії мРНК нормалізували до  $\beta$ -актину і розраховували по відношенню до контролю з використанням порівняльного СТ-методу

Таблиця 3

Сумарні дані за праймерами

Праймер Порядковий номер послідовності	Джерело	Послідовність в напрямі 5'-3'	Продукт Розмір (п.н.), N
$\beta$ -актин 17	Overbergh et al.	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	138
18		CAATAGTGATGACCTGGCCGT	
IL-6 19	GenBank M20572	TCAATTCCAGAAACCGCTATGA	78
20		CACCAGCATCAGTCCCAAGA	
IL-1 $\beta$ 21	GenBank M15131	CAGGTCGCTCAGGGTCACA	75
22		CAGAGGCAAGGAGGAAACACA	
IL-10 23	GenBank M37897	CACAAAGCAGCCTTGCAGAA	68
24		AGAGCAGGCAGCATAGCAGTG	
HO-1 25	GenBank X13356	CTCACTGGCAGGAAATCATCC	67
26		ACCTCGTGGAGACGCTTTACA	
iNOS 27	GenBank NM 010927	GTGACGGCAAACATGACTTCAG	74
28		GCCATCGGGCATCTGGTA	
COX2 29	GenBank NM 011198	CTGGGACCCAACCCTCTGA	71
30		ACGGTGTGTACCACACGGC	

Для виключення ампліфікації при ПЛР забруднюючої геномної ДНК в кожну реакцію ПЛР включали RT-негативні контролі (проби, що містять РНК, яка не піддається оберненій транскрипції). Проводили визначення кривої плавлення для кожної реакції для гарантії ампліфікації специфічного продукту. Крім того, праймери піддавали електрофорезу в гелі для підтвердження відсутності неспецифічних смуг і підтвердження того, що амплікони мали правильний розмір. Оцінювали ефективність ампліфікації кожної кДНК-мішені при визначенні колінеарності послідовних розведень. Готували серійне 3-кратне розведення кДНК в

трьох паралелях для всіх праймерів. Будували стандартну криву залежність значення  $C_t$  до числа копій для підтвердження праймерів. Вважали прийнятними нахили стандартних кривих  $-3,2 \pm 0,3$  при коефіцієнтах кореляції 0,99, що мають відповідні ефективності  $100 \pm 10\%$ .

Дослідження вивільнення медіаторів з м'язової оболонки кишечника

Визначення білка і окису азоту. Тонкий кишечник контрольних мишей і мишей, що піддавались маніпуляції на кишечнику, видаляли в стерильних умовах через 4 або 24 год. після операції, залишаючи ободову кишку на місці. Тонкий кишечник пе-

реносили в склянку, що містить охолоджений збалансований сольовий розчин Хенкса (Sigma, St. Louis, MO) з 200О/мл пеніциліну G і 200мкг/мл стрептоміцину (HBSS), порожнину промивали і тканину переносили у другу склянку з HBSS. М'язову оболонку відбирали, як описано вище, для проведення RT-ПЛР в режимі реального часу. Тканини підтримували у стерильних умовах при температурі 3-5°C під час відбору. Виділену м'язову оболонку вміщували на стерильну марлю і визначали сиру масу для одержання аліквотних порцій масою 40-60мг. Дані аліквотні порції двічі промивали в HBSS, переносили в ямкові культуральні планшети розміром 35мм, що містять 3мл середовища DMEM, що не містить сироватки, але містить пеніцилін/стрептоміцину, та інкубували протягом 24год. у вологій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> в інкубаторі при 37°C. Фармакологічні агенти, додані в культуральне середовище, стерилізували фільтруванням перед використанням.

Після інкубації м'язову тканину центрифугували і аліквотні порції культурального середовища заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80°C. Визначали концентрацію білків IL-6, IL-β, PGE2 і IL-10, секретованих в культуральне середовище з використанням промислово доступних наборів для встановлення ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), слідуючи інструкціям виробника. Окис азоту (NO), що вивільняється в культуральне середовище, визначали при аналізі стабільних кінцевих продуктів метаболізму NO. Концентрацію нітритів/нітратів визначали через 24год. після операції з використанням промислово доступного тест-набору (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) і проводили кількісний аналіз, слідуючи інструкціям виробника. У даній аналітичній системі нітрати відновлюють до нітритів з використанням гранульованого кадмію і потім визначають загальну концентрацію нітритів з використанням реакції Грісса. Всі дані нормалізують до маси сирової тканини.

Інгаляційний вплив CO придушує розвиток післяопераційного ілеусу

Загальні спостереження

Всі тварини швидко відновлювались після операції. Падіж або хворобливий стан, пов'язаний з хірургічним втручанням або з впливом CO, був відсутній. Незважаючи на те, що у мишей розвивався ілеус, їх звичайне чищення і поведінка після операції залишались в нормі з поновленням прийому корму і води через рот через декілька годин після відновлення від анестезії.

Експресія HO-1

Фіг.7А-7Е представляють графіки і картини у вигляді діаграми, що показують експресію гемоксигенази (HO-1) у м'язовій оболонці кишечника після хірургічного втручання на тонкому кишечнику мишей. Для дослідження потенційної протизапальної захисної ролі продуктів ендогенної HO-1, визначали зміни експресії мРНК HO-1 за допомогою RT-ПЛР в режимі реального часу з SYBR зеленим. На Фіг.7А представлений характер експресії мРНК HO-1 у м'язовій оболонці кишечника у неоперованих контрольних мишей і у мишей після операції через 3, 6, 12 і 24год. після лапаротомії.

Експресія мРНК HO-1 була достовірно вище в 35 разів у порівнянні з контрольними тваринами через 3год. після лапаротомії з максимальною експресією через 6год. після операції, підвищеної в 45 разів. Незважаючи на те, що експресія дещо знижувалась через 6год., вона залишалась підвищеною (в 22 рази) до кінця спостережень, тобто через 24год. після операції.

Також досліджували, чи привело підвищення мРНК HO-1 до експресії білка у м'язовій оболонці кишечника після хірургічних маніпуляцій. Проводили імуногістохімічні дослідження на HO-1 в цілісних препаратах м'язової оболонки середньої частини дванадцятипалої кишки від неоперованих мишей і через 24год. від мишей після операції на тонкому кишечнику. Спостерігали, що у мишей, які піддавались операції, імунореактивність на HO-1 виражалась у великих кількостях інфільтруючих поліморфолейкоцитів (Фіг.7В) і клітин, морфологічно близьких до макрофагів (Фіг.7С). У деяких випадках виявляли також клітини, що містять численні цитоплазматичні гранули (гранулоцити), з виявом високої імунореактивності на HO-1 (Фіг.7Б). Високу імунореактивність на HO-1 також спостерігали в неохарактеризованій популяції клітин, розсіяних всередині м'язових шарів. Імунореактивність на HO-1 не спостерігали в цілісних препаратах від неоперованих контрольних мишей (Фіг.7Е). Специфічність імунозabarвлювання на HO-1 підтверджували за відсутністю первинних антигенів (не показано).

Функціональні дослідження

Прохідність кишечника оцінювали у контрольних тварин і тварин, що піддавались хірургічному втручання через 24год. після операції, за визначенням розподілу в шлунково-кишковому тракті введенного перорально міченого флуоресцином декстрану. Фіг.8А-8С представляють графіки у вигляді діаграми, що показують результати дослідження прохідності за розподілом міченого флуоресцином декстрану, що не всмоктується, через 1,5год. після перорального введення. Середня гістограма флуоресценції, що знаходиться в кожному сегменті кишечника у інтактних контрольних мишей і оброблених CO мишей, представлена на Фіг.8А. У інтактних мишей мічений декстран розподілявся в основному в кінцевій частині тонкого кишечника, сліпій кишці і проксимальній частині ободової кишки через 90хв. після прийому декстрану. Тільки один інгаляційний вплив CO (250ppm) викликав незначний недостовірний зсув у прохідності, що виражалось у розподілі мітки в основному в сліпій і ободовій кишці. На Фіг.8В наведене порівняння розподілу сигналу флуоресценції у мишей, що піддавались маніпуляції на кишечнику з або без обробки CO. Після проведення маніпуляцій на кишечнику сигнали флуоресценції були зосереджені в шлунку і 3 проксимальних сегментах тонкого кишечника. Коли тварин обробляли CO, мітка розподілялась більш дистально по шлунково-кишковому тракту. Дані визначення середньої геометричної (GC) підсумовані на Фіг.8С для статичного аналізу. Більш високі значення GC вказують на більше дистальний розподіл сигналів флуоресценції і відповідають більш швидкому

проходженню. Значення на даній фігурі показують, що СО підвищував прохідність кишечнику у неоперованих мишей, але значення GC не досягали статистичної значущості. Крім того, як було показано раніше, значення GC свідчать про те, що прохідність значно нижче після проведення операції на кишечнику, але що дане подовження в прохідності достовірно знімалося у мишей, оброблених СО інгаляційно.

Досліджували вплив СО на спонтанну і стимульовану бетанехолом скоротність круглих м'язів тонкого кишечнику в умовах *in vitro* в дослідах з банею для органів через 24 год. після операції на кишечнику, тобто в період часу, коли, як було показано, ілеус добре виражений. Фіг.9А-9С показують механічну активність таких смужок круглих м'язів гладкої мускулатури тонкого кишечнику. Фіг.9А представляє групу типових графіків, що показують спонтанну скоротність круглих м'язів тонкого відділу кишечнику інтактних мишей мали регулярні скорочення (Фіг.9А; контроль), і обробка СО не надавала впливу (Фіг.9А; контроль+ СО). Після ІМ спонтанна скорочувальна активність достовірно знижувалась (Фіг.9А; ІМ). Однак у мишей ІМ, оброблених СО, ритмічність достовірно поліпшувалась (Фіг.9А; ІМ+ СО). Додавання мускаринового агоністу бетанехолу (від 0,3 до 300 мкМ) до суперфузату приводило до залежних від концентрації тонічних скорочень. Інтегрували площу під кривою скоротності і нормалізували до площі поверхні м'язової смужки з одержанням показника скоротності круглих м'язів. Фіг.9В і 9С представляють лінійні графіки, що показують нормалізовану скоротність. У контрольних мишей максимальну скорочувальну активність ( $3,5 \pm 0,7$  г/сек./мм<sup>2</sup>) відмічали у відповідь на бетанехол в концентрації 100 мкМ (Фіг.9В). Один вплив СО не надавав впливу на скорочення у контрольних мишей ( $3,2 \pm 0,5$  г/сек./мм<sup>2</sup>). Хірургічне втручання привело до зниження скорочувальної активності по всій кривій залежності доза-ефект у порівнянні з контрольними тваринами при досягненні статистичної значущості при концентрації бетанехолу вище 10 мкМ (Фіг.9С). Максимальна скорочувальна активність у відповідь на бетанехол в концентрації 100 мкМ знижувалась на 49% ( $1,7 \pm 0,4$  г/сек./мм<sup>2</sup>) у даних мишей. Інгаляційний вплив СО (250 ppm) повністю попереджав інгібуючу дію хірургічного втручання ( $3,6 \pm 0,7$  г/сек./мм<sup>2</sup>).

#### Гістохімія на МРО

Хірургічне втручання на тонкому кишечнику, як правило, приводить до масивної клітинної запальної реакції у відповідь у м'язовій оболонці. Гістохімію за методом Ханкера-Ятеса на активність мієлопероксидази (МРО<sup>+</sup>) використали для кількісної оцінки лейкоцитарного інфільтрату в тканинах від контрольних мишей, що піддавались операції, з і без обробки СО. Фіг.10 представляє гістограму, на якій підсумовані дані по МРО<sup>+</sup>-клітинах, інфільтруючим м'язову оболонку кишечнику, по чотирьох дослідних групах, використаних в даному дослідженні. Підрахунок лейкоцитів проводили при збільшенні 200X. У контрольних тварин, що не піддавались операції, кількість МРО<sup>+</sup>-клітин була низькою. Анестезія при операції і маніпуляції на

кишечнику приводили до 250-кратного збільшення числа МРО<sup>+</sup>-клітин, інфільтруючих м'язову оболонку, через 24 год. Цікаво зазначити, що інгаляційний вплив СО не надавав впливу на величину лейкоцитарного інфільтрату в жодній групі.

#### Експресія цитокінів прозапалення

Фіг.11А-11С представляють графіки у вигляді діаграми, що показують вплив інгаляційного впливу СО на експресію IL-6. На фігурах показано протікання під час експресії гена IL-6 після операції на тонкому кишечнику і вплив інгаляції СО на експресію гена IL-6 і білка. Аналіз протікання у часі з використанням RT-IDIP в режимі реального часу показував, що експресія мРНК IL-6 збільшувалась в 300 разів у порівнянні з інтактними контрольними мишами через 3 і 6 год. після операції (Фіг.11А). Експресія швидко знижувалась до 12 год. з падінням до 50-кратного збільшення у порівнянні з контролем через 24 год. Інгаляційний вплив СО не надавав впливу на викликану операцією експресію гена через 3 і 6 год. (Фіг.11В). Визначали вивільнення білка IL-6 з ізольованої м'язової оболонки після інкубації в клітинному культуральному середовищі (Фіг.11С). Концентрація білка IL-6 значно підвищувалась через 24 год. після операції на кишечнику і в протилежність даним ПЛР вивільнення білка достовірно знижувалося на 70% у мишей, оброблених СО.

Також досліджували виділення цитокіну прозапалення IL-1 $\beta$ . Експресія гена IL-1 $\beta$  у часі представлена на Фіг.12А-12В. Визначення IL-1 $\beta$  ускладнювалось тим, що концентрація мРНК в екстрактах м'язової оболонки від інтактних контрольних мишей і від контрольних мишей, оброблених СО, була нижче межі визначення секвенатора. Таким чином, проби від мишей, що піддавались операції, відібрані через 6 год. після операції, послідовно розбавляли і значення порога циклів (C<sub>T</sub>) нормалізували до  $\beta$ -актину, визначеного в нерозбавлених пробах. Потім розраховували контрольні значення  $\Delta C_{T_0}$  з використанням найменшої концентрації IL-1 $\beta$ , для якої C<sub>T</sub> знижувалося до меж лінійної залежності. Потім визначали зміни в експресії гена для інших дослідних груп по відношенню до контролю і, отже, вони були постійними для встановлення фактичного збільшення. На основі даних розрахунків було встановлено, що експресія мРНК IL-1 $\beta$  у відповідь на анестезію при операції і маніпуляції на кишечнику підвищувалась в 38 разів у порівнянні з контролем через 3 год. після операції. Максимальна експресія мала місце трохи пізніше, ніж відмічалось для IL-6, досягаючи 170- і 150-кратного підвищення через 6 і 12 год. після операції і з подальшим зниженням до 40-кратного через 24 год. (Фіг.12А). У тварин, оброблених СО, експресія IL-1 $\beta$  через 6 год. була знижена на 60% (Фіг.12В). Визначали вивільнення білка IL-1 $\beta$  з екстрактів м'язової оболонки через 24 год. після операції після додаткової інкубації протягом 24 год. в клітинному культуральному середовищі (Фіг.12С). Узгоджуючись з даними RT-ПЛР, білок IL-1 $\beta$  неможливо було детектувати у тварин в жодній контрольній групі, в той час, як концентрація білка, продукованого 100 мг екстрагованої тканини, була підвищена після операції на

кишечнику. Дана реакція достовірно знижувалась на 60% у мишей, оброблених СО інгаляційно.

Експресія циклооксигенази-2 і індукованої синтази окису азоту

Активовані немігруючі макрофаги та інфільтруючі лейкоцити синтезують і виділяють простагландини, похідні ізоформи циклооксигенази, що індукуються, COX-2, і окис азоту (NO), похідний індукованої форми синтази окису азоту (iNOS), які володіють безпосередньою і сильною інгібуючою дією на скорочувальний апарат гладкої мускулатури кишечника.

Часовий профіль експресії iNOS після операції представлений на Фіг.13А-13С. Аналіз протікання у часі показував, що експресія гена достовірно зростала через 3 і 6 год. після проведення маніпуляцій на тонкому кишечнику (Фіг.13А). Максимальна експресія знижувалась на 60% у тварин, оброблених СО (Фіг.14В). Вплив СО на інтактних тварин не надавав впливу на експресію iNOS (кратне збільшення: контроль -  $1,06 \pm 0,18$ ; СО 3 год. -  $1,04 \pm 0,19$ ; СО 6 год. -  $1,26 \pm 0,19$ ). Визначали загальну кількість нітритів, вивільнену в культуральне середовище з екстрактів м'язової оболонки через 24 год. після операції як показник продукції NO (Фіг.13С). Як і можна було передбачити на основі даних ПЛР, кількість нітритів була достовірно вище після проведення маніпуляцій на кишечнику, і дане підвищення знижувалось на 75% при обробці мишей СО. Аналогічне ослаблення реакції у відповідь досягалося при інкубації екстрактів м'язової оболонки у присутності вибірного інгібітора iNOS, L-Nil (50 мкМ), вказуючи на те, що iNOS була причиною підвищення продукції NO, що індукуються операцією.

Фіг.14А-14В представляють графіки у вигляді діаграми, що показують вплив інгаляції СО на експресію COX-2. На фігурах представлений часовий профіль індукованої ІМ експресії COX-2. Аналіз протікання у часі показував, що експресія гена COX-2 підвищувалась в 8-10 разів через 3-6 год. після операції і залишалась підвищеною протягом 24 год. (Фіг.14А). Обробка СО не надавала впливу на експресію гена через 3 або 6 год. (Фіг.14В). Сам по собі тільки інгаляційний вплив СО на неоперованих контрольних мишей приводив до відносно невеликої індукції в 2,5 рази експресії COX-2 через 3 год. після операції (Фіг.14С). Визначали вивільнення PGE2 з екстрактів м'язової оболонки, взятої через 24 год. після операції, як маркер активності COX-2 (Фіг.14Д). Узгоджуючись з даними ПЛР, одна інгаляція СО і маніпуляції на кишечнику спричиняли достовірно підвищення вивільнення PGE2. Особливо стосуючись PGE2, обробка мишей, що піддавались операції, СО не надавав впливу на індуковане ІМ вивільнення даного простагландину.

Експресія протизапальних генів

IL-10 являє собою плейотропний цитокін, який надає важливу захисну і протизапальну дію в шлунково-кишковому тракті. На Фіг.15А-15С показаний вплив інгаляційного впливу СО на експресію IL-10. На фігурах представлений профіль експресії IL-10 у часі. Експресія гена підвищувалась в 12 разів у порівнянні з контролем у відповідь на про-

ведення маніпуляцій на кишечнику через 3 і 6 год. після операції. Потім експресія знижувалась, але залишалась підвищеною протягом 24 год., приблизно в 4 рази перевищуючи експресію у контрольних тварин (Фіг.15А). У оброблених СО тварин, що піддавались операції, експресія гена IL-10 через 3 год. підвищувалась в 43 рази у порівнянні з контролем, реакція на 300% вище, ніж та, що досягається тільки однією операцією (Фіг.15В). У контрольних мишей тільки одного інгаляційного впливу СО вистачало для індукції достовірного підвищення експресії IL-10 (Фіг.15С).

Також досліджували вплив СО на експресію гена HO-1. На Фіг.16А-16В показаний вплив інгаляції СО на експресію HO-1. На Фіг.16А наводиться порівняння ІМ-індукованої експресії гена через 3 і 6 год. після операції (дивись Фіг.7Д) з такою, досягнутою у мишей після операції і оброблених СО. Інгаляція СО також підвищувала експресію гена HO-1 через 3 год. після операції до рівня на 300% вище, ніж у тварин, що піддавались тільки одній операції (Фіг.16В). У цьому випадку тільки один інгаляційний вплив СО у неоперованих контрольних мишей спричиняв незначне, хоча і достовірне, підвищення експресії гена HO-1, але тільки через 6 год.

У даному прикладі наводяться докази, одержані в умовах *in vivo* і *in vitro*, які свідчать про те, що СО в низьких концентраціях (250 ppm) достовірно ослабляє порушену рухливість кишечника, яка характерна для післяопераційного ілеусу. Дані показують, що СО може функціонувати на генному рівні і експресії білка для вибіркової модуляції специфічних елементів шляхів прозапалення і проти-запалення, що приводить до достовірного поліпшення функціональної активності кишечника.

Післяопераційний ілеус часто є по суті неминучим наслідком хірургічної операції на органах черевної порожнини і може коливатись від короткочасної атонії до тяжкого паралітичного ілеусу, який продовжується протягом доби. Паралітичний ілеус характеризується стазом кишечника, високим зростанням бактерій, порушенням балансу рідин і електролітів, приводячи до тяжких хворобливих станів і часто фатального кінця. Вплив СО на мишей інгаляційно придушував викликану операцією супресію спонтанної скоротності круглих м'язів гладкої мускулатури, відновлював здатність м'язів до скорочення у відповідь на дії холінергічних агоністів і достовірно ослабляв порушення прохідності кишечника. Дане поліпшення скорочувальної функції загалом досягалося без значного зменшення інфільтрату клітин запалення, на основі чого можна передбачити, що СО впливає на елементи каскаду запалення іншим шляхом, а не пов'язаним з рекрутингом лейкоцитів. Для оцінки впливу СО на каскад запалення оцінювали експресію генів медіаторів про- і протизапалення RT-ПЛР в режимі реального часу.

Підвищені концентрації цитокінів прозапалення IL-6 і IL-1 постійно експресуються в період гострого і хронічного запалення кишечника у людей і тварин, включаючи ілеус після операції. IL-6 активує клітини самих різних типів з індукцією синтезу хемоатрактантів і молекул адгезії і, таким чином,

грає центральну роль в ініціації рекрутингу лейкоцитів і виходу в м'язову оболонку кишечника. У даному прикладі інгальційний вплив СО не змінював індуковане операцією на ранніх стадіях підвищення експресії гена IL-6 через 3 і 6 год. після операції, факт, що узгоджується з відсутністю його дії на величину інфільтрату запальних клітин. Однак вивільнення білка IL-6 з ізольованої м'язової оболонки кишечника через 24 год. після операції знижувалось на 60% з 5000 пг/мл до 2000 пг/мл у оброблених СО мишей, на основі чого можна передбачити, що СО надає посттрансляційний ефект на експресію IL-6. Даний постійний рівень вивільнення білка був помітно вище у порівнянні з інтактними контрольними тваринами (150 пг/мл), що робить скрутним встановити, яка дія може впливати на сигнальний шлях прозапалення з участю IL-6. Однак в нещодавно проведених дослідженнях було показано, що IL-6 може також володіти високими протизапальними властивостями, на основі чого можна передбачити, що постійна експресія IL-6 необхідна для індукції деяких захисних шляхів. Вони потенційно включають здатність до придушення продукції TNF-(X, IL-1 $\beta$  і макрофального білка-2 запалення і підвищувати концентрацію антагоністів рецептора IL-1 і розчинного TNF-рецептора в умовах *in vitro*. Таким чином, придушення опосередкованих IL-6 шляхів прозапалення, а також ініціація опосередкованих IL-6 протизапальних шляхів на більш пізніх стадіях в каскаді запалення, можуть робити свій внесок в поліпшення скоротності кишечника, що спостерігається протягом 24 год. після операції.

Роль, яку грає IL-1 $\beta$  в післяопераційному ілеусі, менш охарактеризована; однак було показано, що ендогенний IL-1 $\beta$  придушує скоротність гладкої мускулатури у щурів у відповідь на вплив холінергічних агоністів і електрики, на основі чого можна передбачити, що він надає свою інгібуючу дію за допомогою зміни нейронних шляхів. Крім того, імунонейтралізація активності IL-1 значною мірою знижувала тяжкість захворювання на моделі коліту у мишей, вказуючи на те, що даний цитокін також грає важливу роль в ініціації запалення кишечника. У мишей, що піддавались маніпуляціям на кишечнику і оброблених СО, експресія гена IL-1 $\beta$  була помітно знижена, при 75%-ому зниженні індукованою операцією експресії гена через 6 год. після операції і відповідному зменшенні експресії білка через 24 год. Таким чином, потрібно вважати, що дія IL-1 $\beta$  як медіатора прозапалення, а також його потенційна інгібуюча дія на нейром'язовий апарат, будуть в помітній мірі ослаблені. Підсумовуючи дані факти в сукупності, можна передбачити, що захисна дія інгальції СО відбувається, щонайменше, частково за рахунок механізму, направленого на вибірні елементи в каскаді прозапалення, опосередкованого IL-6 і IL-1 $\beta$ , які не залежать від рекрутингу лейкоцитів або відбуваються після повної ініціації рекрутингу лейкоцитів.

Незважаючи на те, що кількість інфільтруючих лейкоцитів не змінювалась у оброблених СО мишей, дані за цитокінами свідчать про те, що мало місце залежне від СО функціональне інгібвання цитокінів, які згідно з класичними уявленнями про-

дукуються лейкоцитами. Отже, досліджували модуляцію кінетично активних медіаторів гладкої мускулатури NO і PGE<sub>2</sub>, похідних лейкоцитів, як додаткових мішеней для придушення під дією СО. Було показано, що простаноїди, продуковані за участю COX-2, і окис азоту, продукований за участю iNOS, володіють високою інгібуючою дією на скоротність гладкої мускулатури кишечника і що інгібвання ферменту COX-2 або вибірна елімінація гена iNOS лейкоцитів помітно підвищують стійкість до розвитку післяопераційного ілеусу. В даному прикладі внаслідок дослідження експресії гена iNOS і COX-2 було встановлено, що активність обох ферментів зростала після проведення маніпуляцій на кишечнику. Викликане операцією підвищення експресії гена iNOS і продукції NO придушувалось приблизно на 75% у оброблених СО тварин, на основі чого можна передбачити, що СО може функціонувати на рівні транскрипції генів з модуляцією експресії iNOS. В умовах *in vitro* було показано, що активність iNOS, а також ендотеліальної і нейронної ізоформ NOS, може безпосередньо інгібуватись під дією СО, можливо за рахунок зв'язування СО з групами гема, присутніми в білках NOS. У сукупності потрібно очікувати, що зменшення вивільнення NO внаслідок зниженої експресії гена і/або інгібованої активності ферменту буде робити істотний внесок в поліпшення функції кишечника внаслідок інгальційного впливу СО. У протилежність iNOS інгальція СО не надавала впливу на індуковану операцією експресію мРНК COX-2 або вивільнення PGE<sub>2</sub> за даними визначення в культуральному середовищі при інкубації м'язової оболонки, взятої через 24 год. після операції. Цікаво, що інгальційний вплив СО на інтактних мишей приводив до підвищення експресії мРНК COX-2 в 2,5 рази через 3 год. після операції з відповідним збільшенням вивільнення PGE<sub>2</sub> через 24 год. Про індукції COX-2 під дією СО раніше не повідомлялось, і функціональний наслідок даної підвищеної активності залишається невідомим. У оброблених СО контрольних мишей не виявлялось функціонального порушення або підвищення рівня медіаторів прозапалення, на основі чого можна передбачити, що в цьому випадку індукція COX-2 не бере участь у вияві протизапальної активності.

Одним із значних ефектів інгальційного впливу СО був вплив на експресію генів, пов'язаних з протизапальними шляхами з участю: IL-10 і NO-1. У той час як обидва гени були індуковані після проведення маніпуляцій на кишечнику, експресія підвищувалась на 300% у мишей після операції, оброблених СО. Дане підвищення спостерігали через 3 год. після операції, але не через 6 год., на основі чого можна передбачити, що вплив СО приводив до ранньої індукції даних генів, що концепцію підтверджували дані, які показують, що тільки один інгальційний вплив СО на інтактних мишей приводить до достовірної індукції IL-10 і NO-1. Раніше не була охарактеризована роль, яку грають дані медіатори в розвитку ілеусу після операції. Однак IL-10 є плейотропним цитокіном з широким спектром біологічної дії у відношенні лімфоїдних і мієлоїдних клітин. Однією з його відомих

функцій є його здатність придушувати продукцію медіаторів прозапалення, включаючи продукцію фактор-альфа некрозу пухлин (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-1, колонієстимулюючого фактора гранулоцитів-макрофагів і утворення окису азоту активованими моноцитами/макрофагами. Зовсім нещодавно було встановлено, що IL-10 інгібує продукцію NO стимульованими LPS мишачими макрофагами за допомогою антагоністичної дії на захоплення клітинами L-аргініну, а також каталітичною активністю самої iNOS, тим самим роблячи потенційний внесок в ослаблення інгібуючої дії NO на гладку мускулатуру кишечника. Крім того, стало очевидним, що індукція опосередкованого NO-1 шляху надає важливу протизапальну і цитопротективну дію при різних гострих і хронічних запальних станах. У наш час є доказ, на основі якого можна передбачити, що експресія двох даних медіаторів взаємопов'язана. Оpubліковані дані показують, що вплив CO приводить до підвищення експресії гена IL-10 і вивільнення білка зі стимульованих LPS макрофагів. Пізніше було встановлено, що ендогенний IL-10 індукує NO-1 в мишачих макрофагах, але необхідна індукція NO-1 для вияву інгібуючої дії IL-10 на індуквану ліпополісартидами продукцію TNF- $\alpha$ . Рання індукція NO-1 могла привести до підвищеного виходу ендогенного CO, який, як слід очікувати, буде робити свій внесок в ефект екзогенно застосованого газу. Крім того, активність NO-1 включає цитопротективну і антиоксидантну дію, які відносяться до «гасіння» вільних радикалів за допомогою редокс-циклювання білівердину і білірубину. Отже, підвищена продукція IL-10 і підвищена активність NO-1 будуть спільно приводити до придушення розвитку запалення на ранніх стадіях зниження експресії медіаторів прозапалення, підвищенням доступності CO в тканинах і забезпеченням захисту від стресу вільних радикалів.

В закінчення, на основі представлених даних можна передбачити, що захисні ефекти CO при інгаляційному введенні відбуваються внаслідок цілеспрямованого впливу на вибірні елементи протизапальних шляхів. Виявилось, що CO функціонує на рівні експресії гена і білка, приводячи до індукції IL-10 і NO-1, негативної регуляції IL-1 $\beta$  і придушення активності iNOS. У сукупності дані ефекти приводять до модуляції індукованих операцією запальних реакцій у м'язовій оболонці кишечника, приводячи до поліпшення функціональної активності після операції.

Приклад 3. CO придушує розвиток ілеусу, викликаного проведенням хірургічних маніпуляцій в тонкому відділі кишечника у миші і свині

У мишей індукували розвиток ілеусу проведенням обережних маніпуляцій на тонкому кишечнику. Зробили розріз для оголення черевної порожнини миші, і проводили маніпуляції на кишечнику м'яким натисненням і уколіванням тонкого кишечника [дивись, наприклад, Schwarz et al., *Gastroenterology* 121(6): 1354-1357 (2001)]. Потім розріз закривали і через 24 год. проводили аналізи. Мишей піддавали інгаляційному впливу CO (250 і 500ppm) протягом 1 год. безпосередньо перед операцією на кишечнику і під час усього 24-годинного періоду відновлення. Скоротність кише-

chniku оцінювали в умовах *in vitro* при визначенні скоротності смужок круглих м'язів у відповідь на бетанехол (0,3-300мкМ) і в умовах *in vivo* при визначенні прохідності кишечника за розподілом введенного перорально міченого флуоресцином декстрану і розрахунку середньої геометричної, як описано в прикладі 1 вище. Експресію мРНК NO-1 і IL-10 оцінювали проведенням RT-ПЛР в режимі реального часу з SYBR зеленим з екстрактів зовнішньої м'язової оболонки, як описано у прикладі 1 вище. Вивільнення окису азоту (NO), сильного інгібітора скоротності гладкої мускулатури, досліджували при визначенні загальної концентрації нітритів в сироватці крові, як також описано у прикладі 1 вище.

Максимальна скорочувальна активність у відповідь на дію бетанехолу (100мкМ) була достовірно нижче після IM ( $1,1 \pm 0,2$  г/сек./мм<sup>2</sup>) у порівнянні з контрольними тваринами ( $2,2 \pm 0,5$  г/сек./мм<sup>2</sup>). Індукване IM придушення скоротності попереджалося у мишей IM+CO ( $1,9 \pm 0,5$  г/сек./мм<sup>2</sup>). Прохідність кишечника також підвищувалась у оброблених CO мишей (геометрична середня: контроль  $11,0 \pm 0,5$ , IM  $2,7 \pm 0,2$ , IM+CO  $6,3 \pm 0,8$ ). Дані RT-ПЛР показували, що IM спричиняла достовірне підвищення максимальної експресії NO-1 (в 45 разів) через 6 год., експресії IL-6 (в 300 разів), і IL-10 (в 13 разів) через 3 год. після IM у порівнянні з контролем. У мишей IM+CO експресія NO-1 досягала максимального значення раніше, через 3 год. після IM, при більш високому рівні (в 150 разів) у порівнянні з контролем. Експресія IL-10 через 3 год. також була вище у мишей IM+CO (в 35 разів). Концентрація нітритів в сироватці крові була вище після IM ( $18,3 \pm 3,6$  мкМ) у порівнянні з контрольними тваринами і зменшувалась після IM+CO ( $6,0 \pm 1,6$  мкМ).

Отже, CO ослабляє викликану операцією нерухомість кишечника в умовах *in vitro* та *in vivo* за допомогою механізмів, які можуть включати індукцію експресії протизапального цитокіну IL-10 і знижену продукцію NO. Індукція NO-1 (підвищення експресії на 300% у порівнянні тільки з однією IM) на ранніх стадіях буде приводити до підвищення доступності CO, збільшуючи тим самим вияв її протизапальної дії.

Аналогічні досліді проводили на свинях. Ілеус викликали маніпуляцією середньої міри на тонкому кишечнику (IM). Свиней піддавали впливу CO (250ppm) або повітря (контроль) протягом 3 год. перед IM. Функціональну активність шлунково-кишкового тракту оцінювали *in vivo* по спостереженню за прохідністю по кишечнику кульок з нейржавуючої сталі, вміщених в тонкий кишечник. Було встановлено, що CO підвищує прохідність кишечника після маніпуляцій на кишечнику.

Приклад 4. Попередня обробка CO в низьких концентраціях (від 250 до 75ppm) протягом 3 год., перед лапаротомією захищає від розвитку післяопераційного ілеусу

В даному прикладі показано, що CO в низьких концентраціях при впливі протягом короткого періоду часу захищає від розвитку післяопераційного ілеусу.

Ілеус індукували маніпуляцією середньої міри на тогочасному кишечнику (IM). Щурів піддавали впливу



ву СО у зменшуваних концентраціях (250, 125, 75, 30ppm) в повітрі протягом 1год. або 3год. перед лапаротомією (n=6). Результати порівнювали з одержаними раніше за протоколами впливу СО в концентрації 250ppm за 1год. до і протягом 24год. після лапаротомії.

Функціональну активність травного тракту оцінювали в умовах *in vivo* при визначенні прохідності кишечника за розподілом по шлунково-кишковому тракту введеного перорально міченого флуоресцином декстрану. Визначали середнє значення розподілу міченого декстрану для статистичного порівняння при розрахунку середньої геометричної (GC).

Середня геометрична була достовірно нижче у щурів, що піддавались хірургічній операції, у порівнянні з неоперованими контрольними тваринами (GC: контроль  $9,8 \pm 0,2$ , IM= $5,8 \pm 0,4$ ), вказуючи на достовірне зниження прохідності кишечника. Незважаючи на те, що вплив СО в концентрації 250ppm протягом 24год. неоперованих щурів приводив до незначного зниження прохідності кишечника (GC:  $8,8 \pm 0,4$ ), попередня обробка СО протягом 1год. з подальшим її впливом протягом 24год. в концентрації 250ppm приводила до достовірного підвищення прохідності кишечника, у щурів, що піддавались оперативному втручанню (GC:  $8,2 \pm 0,4$ ). Попередня обробка оперованих щурів СО в концентрації 250ppm протягом 1год. тільки перед операцією була менш ефективною у попередженні індукованого операцією зниження прохідності (GC:  $7,2 \pm 0,3$ ), в той час як попередня обробка протягом 3год. приводила до ефекту, рівноцінного такому, що досягається при 24-годинному впливі (GC:  $8,6 \pm 0,3$ ). Аналогічне поліпшення досягали попередньою обробкою СО в низьких концентраціях 125 і 75ppm (відповідно GC:  $8,6 \pm 0,4$  і  $8,8 \pm 0,1$ ). Даний захисний ефект знижувався при подальшому зменшенні концентрації СО до 30ppm (GC:  $7,2 \pm 0,2$ ).

У даному прикладі показано, що пролонгований вплив СО не потрібний для досягнення повного захисту від розвитку післяопераційного ілеусу. Включення СО в низьких концентраціях в газ для анестезії в передопераційному періоді може забезпечити мінімальне інвазивне втручання, яке буде сприяти зменшенню ілеусу у чутливих пацієнтів, тим самим прискорюючи видужання в післяопераційному періоді і скорочуючи перебування в лікарні.

#### Приклад 5. Протоколи для лікування ілеусу

У подальшому прикладі будуть представлені протоколи для застосування з метою лікування пацієнтів до, під час і після хірургічних втручань, наприклад, операцій з трансплантації (наприклад, SITx) або що не відносяться до трансплантації операцій (наприклад, процедури, внаслідок якої може виникнути ілеус). Приклад включає протоколи для лікування ілеусу, наприклад, ілеусу внаслідок операцій з трансплантації і що не відносяться до трансплантації, і додаткові протоколи для обробки донорів, шлунково-кишкового тракту або його ділянки, наприклад, тонкого кишечника, і реципієнтів за допомогою СО при трансплантації. Будь-яка одна і більше з подальших процедур може бути використана в даній хірургічній операції.

#### Лікування пацієнтів

СО можна вводити системно або місцево пацієнту до, під час і/або після хірургічної операції, що проводиться у пацієнта, або після встановлення діагнозу ілеусу у пацієнта (наприклад, ілеусу після операції або внаслідок станів, що не включають операцію). Пацієнти можуть піддаватись інгаляційному впливу СО в концентраціях в межах від 10ppm до 1000ppm, наприклад, приблизно від 100ppm до приблизно 800ppm, приблизно від 150ppm до приблизно 600ppm або приблизно від 200ppm до приблизно 500ppm. Переважні концентрації включають, наприклад, приблизно 30ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm, 125ppm, 200ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm або приблизно 1000ppm. СО можна вводити пацієнту з перервами або безперервно, починаючи з 0-20 діб до проведення операції, наприклад, починаючи, щонайменше, приблизно за 30 хвилин, наприклад, приблизно 1, 2, 3, 5, 7 або 10год. або приблизно 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 або 20 діб або більш 20 діб до операції. Альтернативно або додатково СО можна вводити пацієнту під час операції, наприклад, інгаляційно і/або місцево. Альтернативно або додатково СО можна вводити пацієнту після операції, наприклад, відразу ж після закінчення операції і продовжуючи протягом приблизно 1, 2, 3, 5, 7 або 10год. або приблизно 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 або 60 діб, невизначено довго, або до відновлення нормальної рухливості кишечника, після закінчення операції.

#### Операції з трансплантації

##### Обробка донора

Перед взяттям органу або його частини, донора можна обробити інгаляційно окисом вуглецю (250ppm) протягом 1год. Обробку можна проводити в дозах в межах від 10ppm до 1000ppm протягом періоду часу від 1год. до 6год. або протягом всього періоду з моменту, коли стає можливим обробити мертвий мозок (трупа) донора до часу витягання органу. Для донора-людини обробку потрібно починати як можна раніше після констатації смерті мозку. У деяких застосуваннях може бути бажаним починати обробку до смерті мозку.

Для тварин, що не відносяться до людини (наприклад, свиней), які використовуються як донори при ксенотрансплантації, живу донора-тварину можна обробити інгаляційно окисом вуглецю у відносно високих концентраціях, як бажано, за умови, що карбоксигемоглобін, який утворюється при цьому, не порушує життєздатність і функціональну активність органу, який трансплантується. Наприклад, можна використати концентрації вище 500ppm (наприклад, 1000ppm або вище і до 10000ppm, зокрема, протягом коротких періодів часу).

##### Обробка органу *in situ*

Перед витягненням органу від донора його можна промити або перфузувати його розчином, наприклад, буфером або середовищем, поки він ще знаходиться в організмі донора. Метою є промивання органу розчином, насиченим окисом вуглецю, і підтримання в атмосфері окису вуглецю так, щоб вміст окису вуглецю залишався насиченим. Промивання можна проводити протягом, що-

найменше, 10хв., наприклад, 1год., декількох годин або більше. Розчин повинен ідеально доставляти окис вуглецю в як можна більш високій концентрації до клітин органу.

#### Обробка органу ex vivo

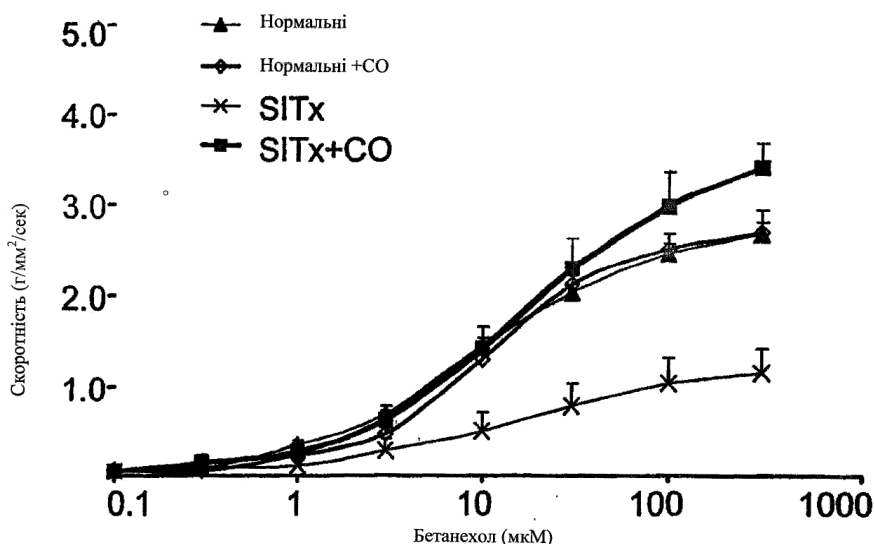
Орган такий, як тонкий кишечник, можна консервувати в середовищі, що містить окис вуглецю, з моменту, коли він витягується з організму донора до моменту, коли його трансплантують реципієнту. Це можна здійснити зберіганням органу в середовищі, що містить CO, або перфузією його подібним середовищем. Оскільки це має місце в умовах ex vivo, а не у тварини, то можна застосувати газоподібний CO в дуже високих концентраціях (наприклад, 10000ppm) для підтримання середовища, насиченого CO.

#### Обробка реципієнта

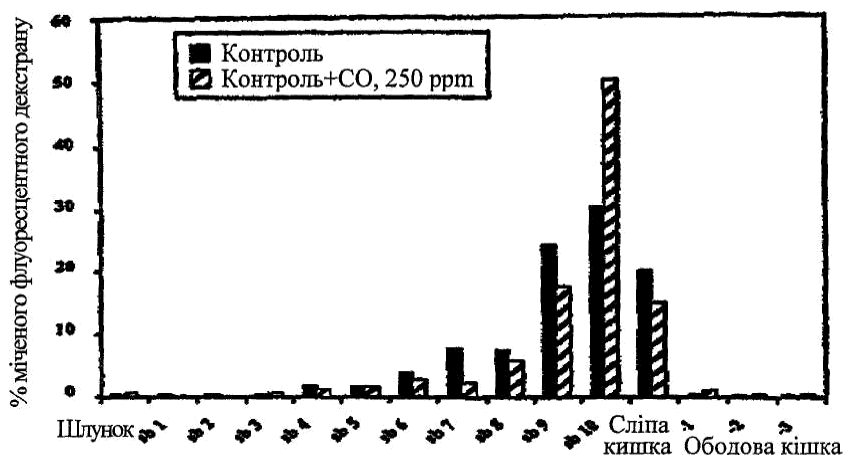
Обробку реципієнта CO можна починати в день трансплантації, щонайменше, за 30хв. до початку операції. Альтернативно її можна починати, щонайменше, за 30хв. до реперфузії органу у реципієнта. Її можна продовжувати протягом, щонайменше, 30хв., наприклад, 1год. Дози окису вуглецю в межах від 10ppm до 3000ppm можна до-

ставляти протягом різного періоду часу, наприклад, хвилин або годин, і можна вводити в день і подальші дні після трансплантації. Наприклад, пацієнту можна ввести інгаляційно окис вуглецю в концентрації, наприклад, 3000ppm за три послідовних 10сек. затримок дихання. Альтернативно газ в більш низькій концентрації можна вводити з перервами або постійно протягом більш тривалого періоду часу при ритмічному диханні, а не при затримці дихання. Концентрацію карбоксигемоглобіну можна використати як показник для відповідного введення окису вуглецю пацієнту. Звичайно внаслідок обробки реципієнтів концентрація карбоксигемоглобіну не повинна підвищуватись до такої, що представляє можливий ризик для пацієнта за необхідності трансплантації.

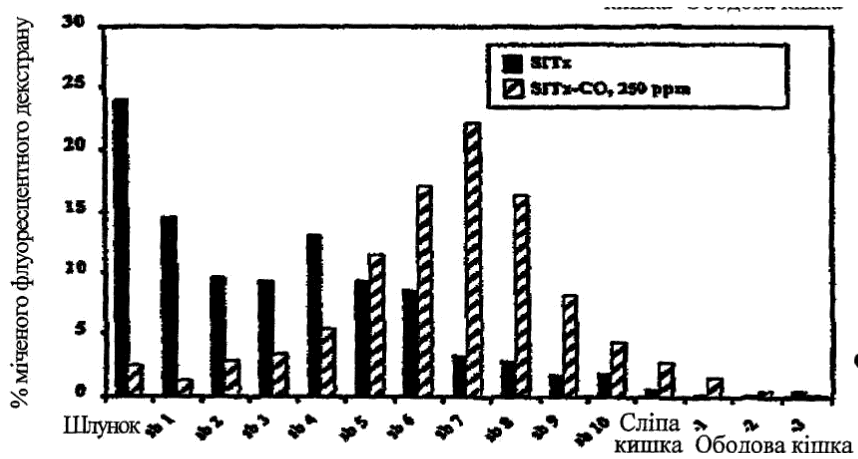
Очевидно, потрібно розуміти, що незважаючи на те, що винахід описаний в поєднанні з його докладним описом, представлений вище опис призначається для ілюстрації і не призначається для обмеження об'єму винаходу, який визначається об'ємом прикладеної формули винаходу. Інші аспекти, переваги і модифікації знаходяться в об'ємі наступної формули винаходу.



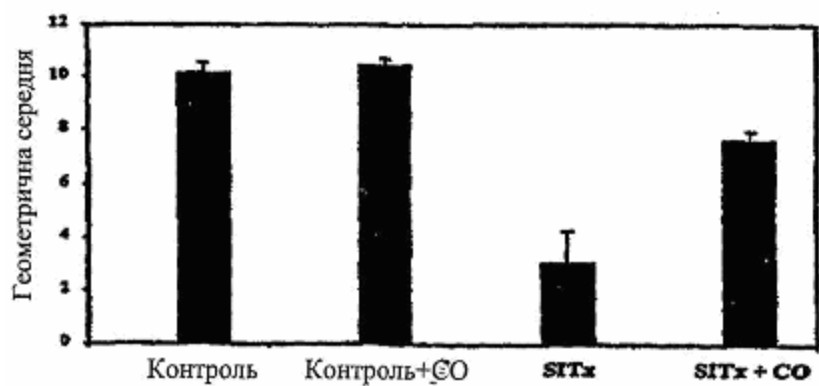
Фіг. 1



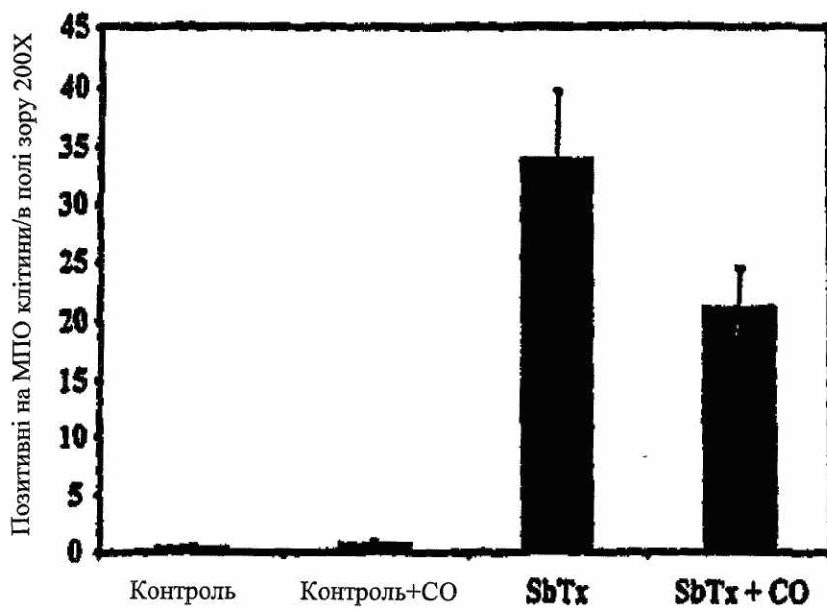
Фіг. 2А



Фіг. 2В



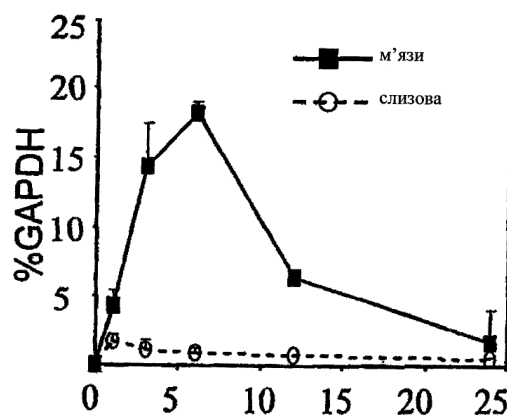
Фіг. 2С



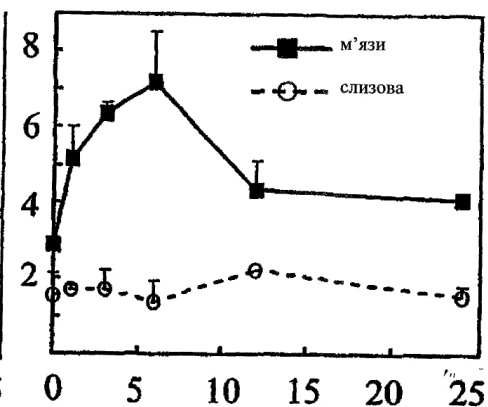
Фіг. 3

Фіг. 4А

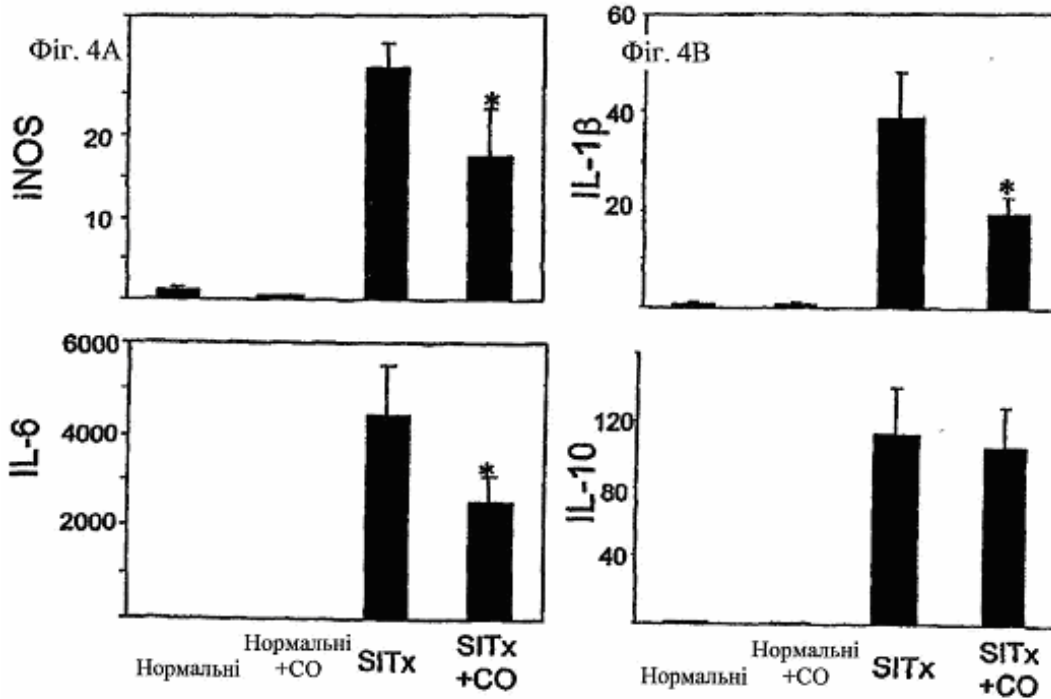
IL-6



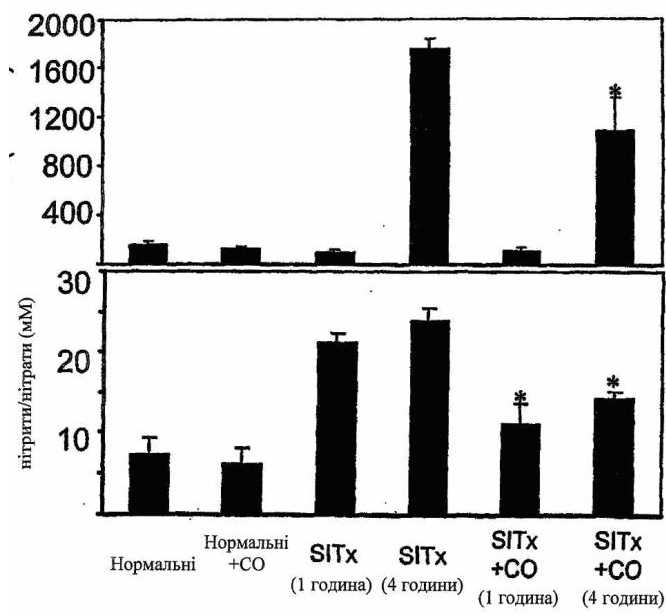
Фіг. 4В

IL-1 $\beta$ 

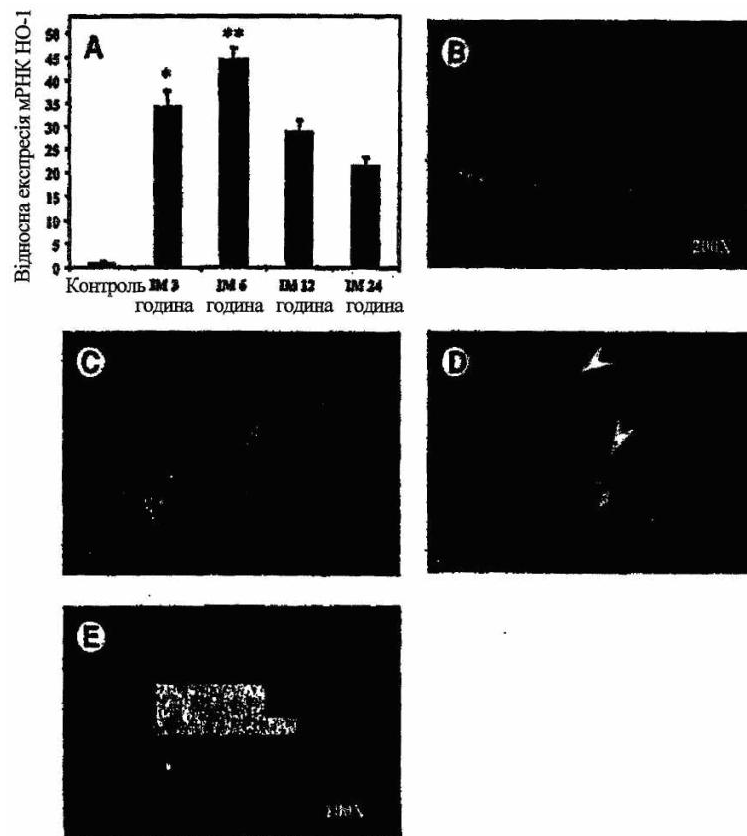
Час після реперфузії (години)



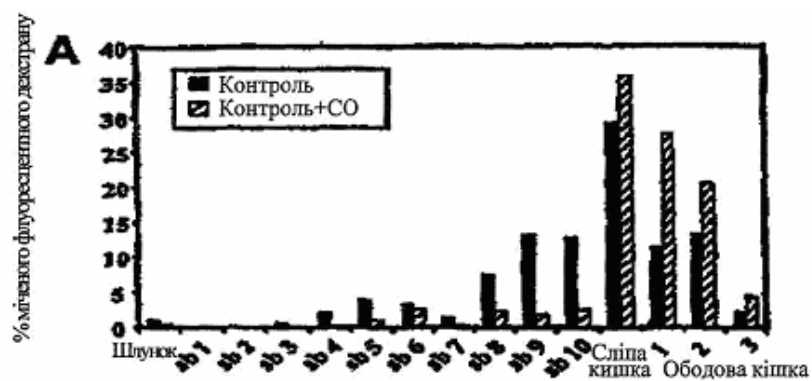
Фіг. 5



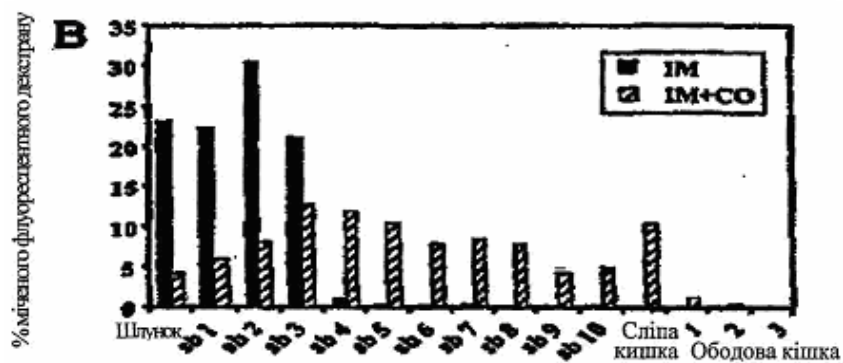
Фіг. 6



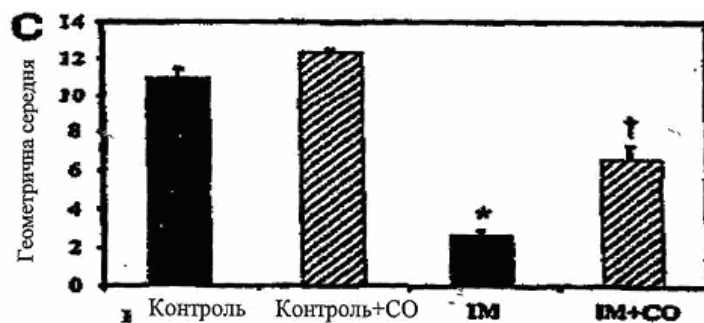
Фіг. 7A-7E



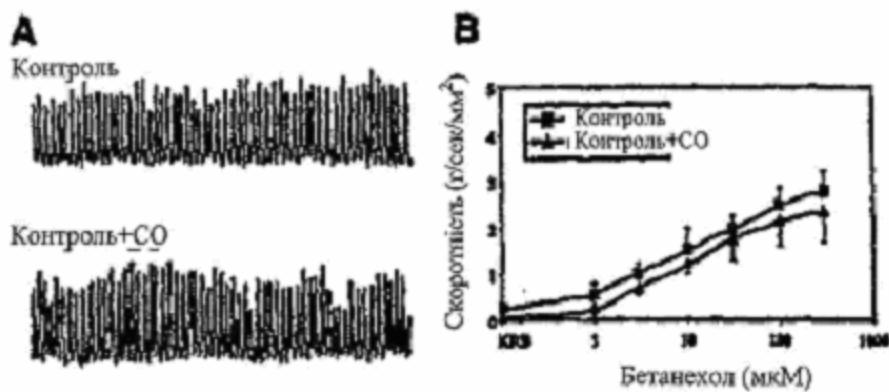
Фіг.8А



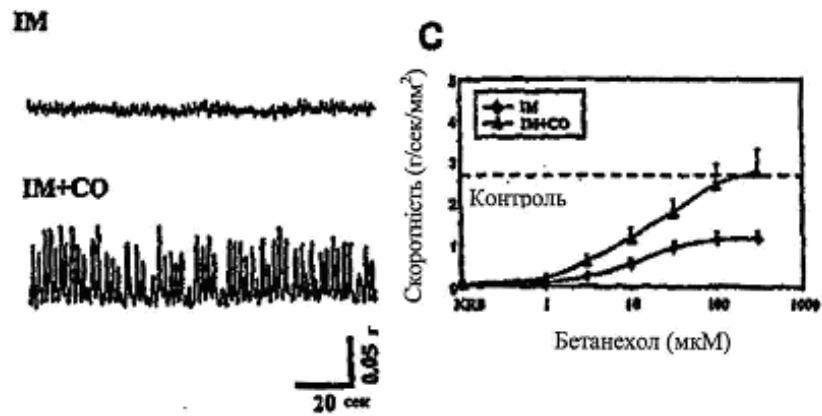
Фіг.8В



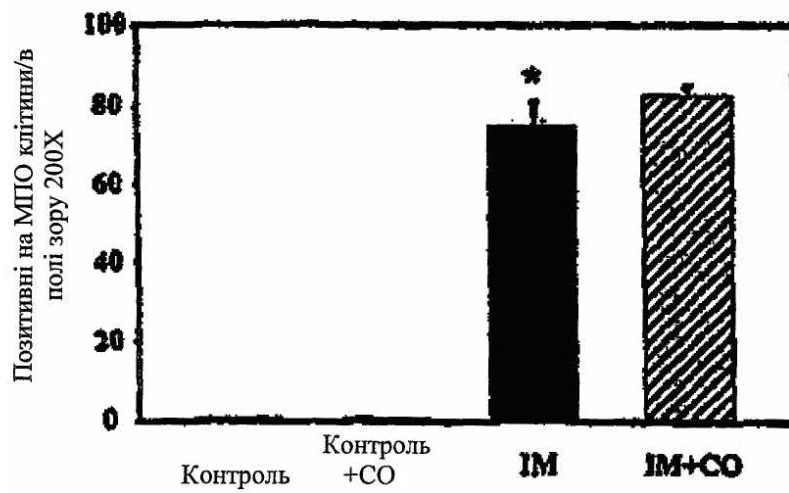
Фіг. 8С



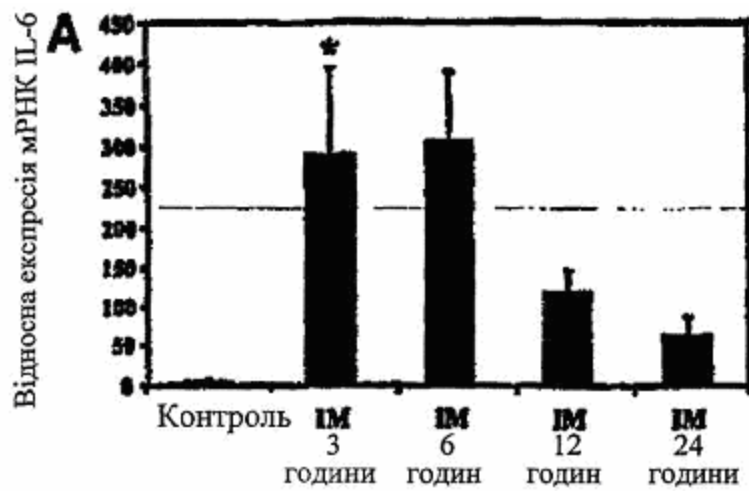
Фіг.9А.9В



Фіг. 9C



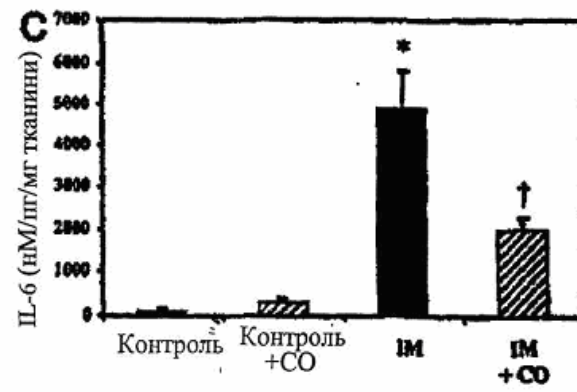
Фіг. 10



Фіг.11A

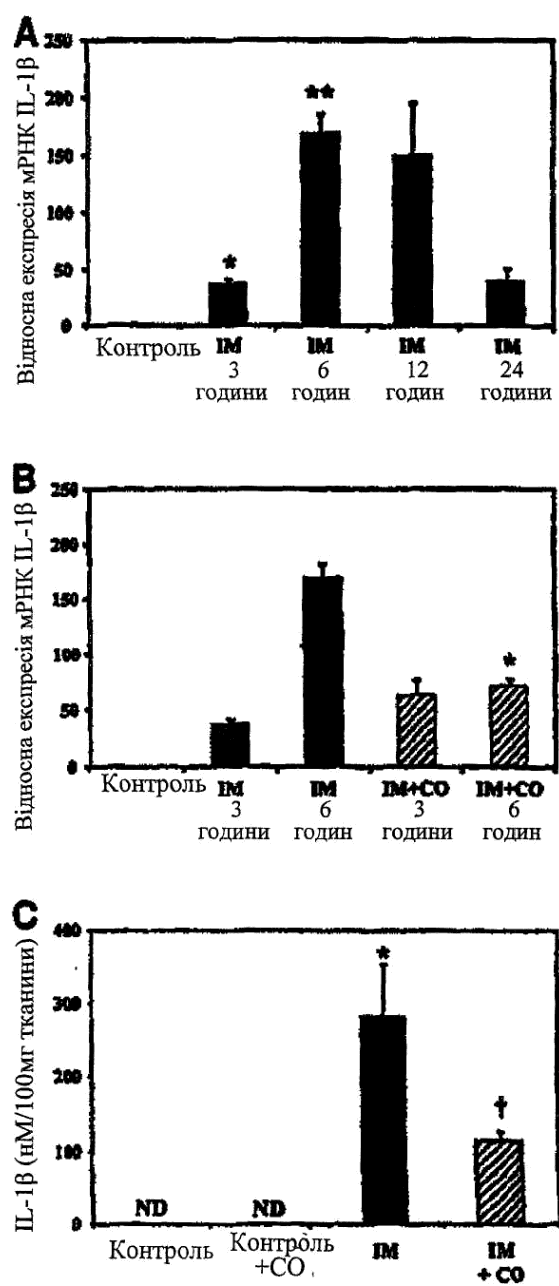


Фіг.11В

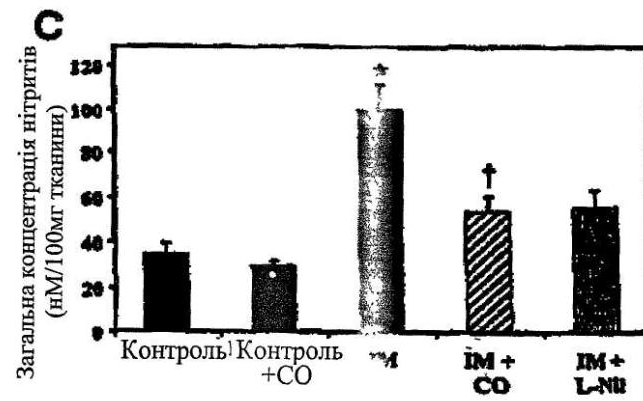
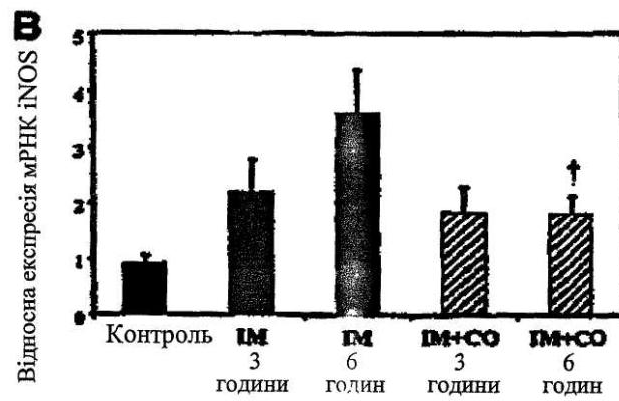
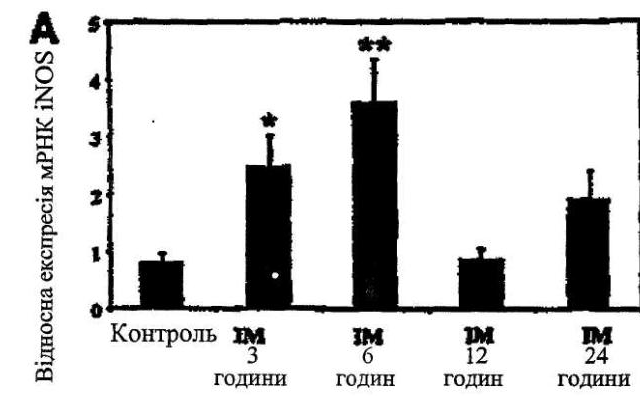


Фіг.11С

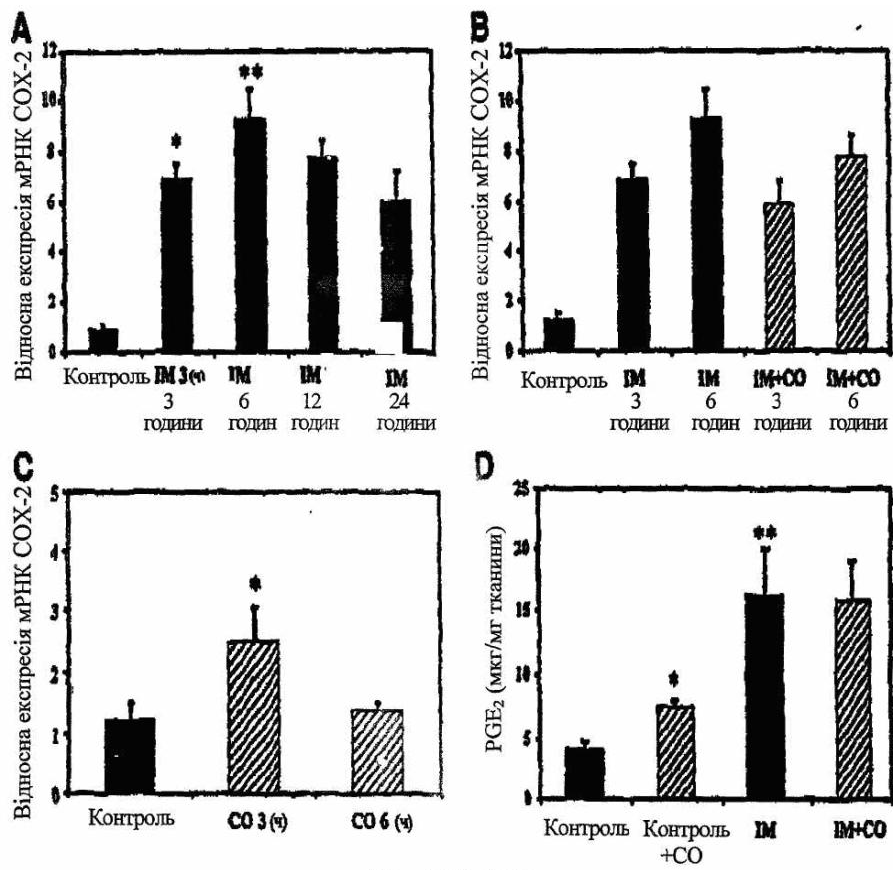




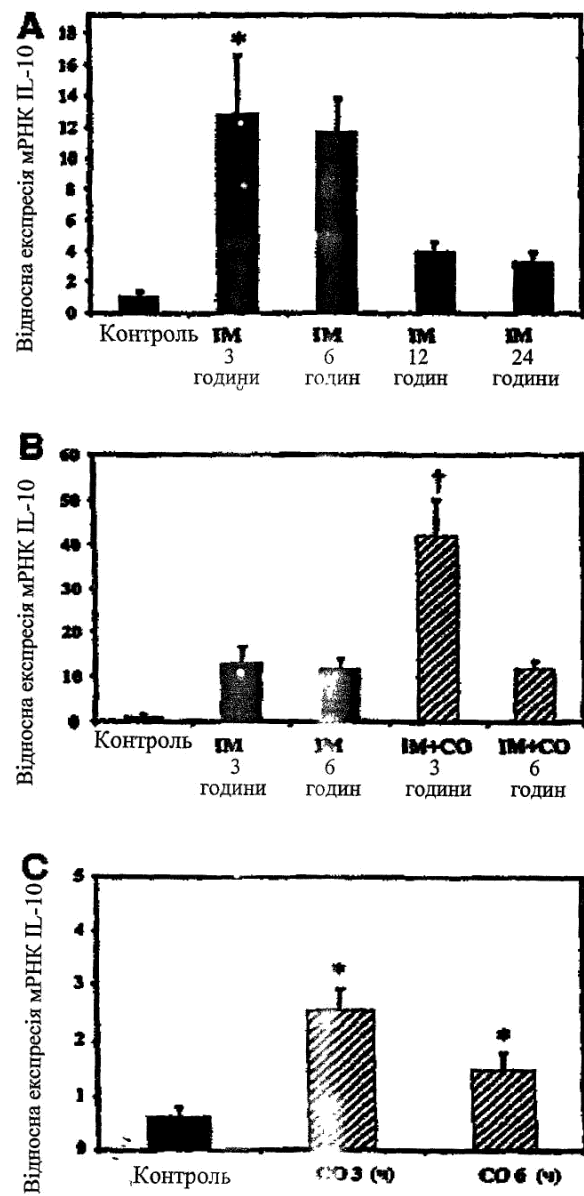
Фіг. 12A-12C



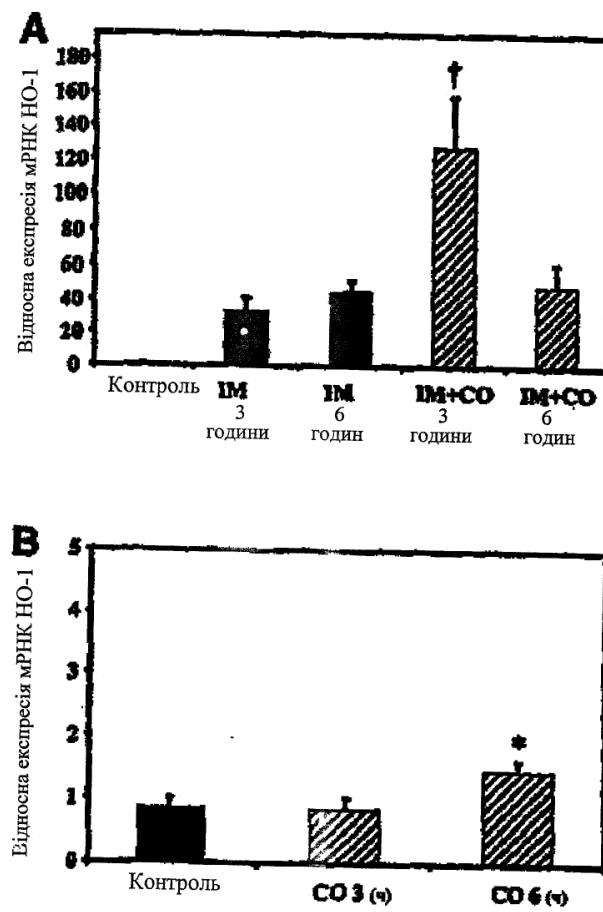
Фіг. 13A-13C



Фиг. 14A-14D



Фіг. 15A-15C



Фіг. 15A-15C