

Даний винахід був виконаний за фінансової підтримки уряду по грантах №HL55330, HL60234 і AI42365 Національних інститутів охорони здоров'я. Уряд має визначені права на даний винахід.

Даний винахід відноситься до лікування шлунково-кишкових порушень.

Визнається роль газоподібного окису вуглецю (СО) як важливої сигнальної молекули (Verma et al., Science 259:381-384, 1993). Також було висловлене припущення, що СО функціонує як нейромедіатор у мозку (Id.) і як нейроендокринний модулятор у гіпоталамусі (Pozzoli et al., Endocrinology 735:2314-2317, 1994). Подібно до окису азоту (NO) СО є релаксантом 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 СО у низьких концентраціях здійснює протизапальну дію на деяких моделях.

Некротизуючий ентероколіт (NEC) являє собою захворювання новонароджених, яке характеризується відсутністю бар'єра кишечника, некрозом кишечника, сепсисом і недостатністю органів багатьох систем (дивись, наприклад, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)).

Даний винахід частково базується на встановленні того факту, що введення СО може придушувати розвиток NEC.

Отже, винахід описує спосіб лікування, попередження або зниження ризику розвитку некротизуючого ентероколіту у пацієнта. Спосіб включає ідентифікацію пацієнта, який страждає або має ризик розвитку некротизуючого ентероколіту і введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить кількість СО, ефективну для лікування некротизуючого ентероколіту у пацієнта. Спосіб може включати додаткову стадію моніторингу стану пацієнта при NEC і/або визначення поліпшення стану пацієнта або зниження ризику розвитку NEC.

Фармацевтичну композицію можна вводити пацієнту будь-яким способом, відомим у даній галузі для введення газів, рідин і/або твердих сполук пацієнтам, наприклад, інгаляцією, інсуфляцією, інфузією, ін'єкцією і/або введенням у шлунок. В одному варіанті даного винаходу фармацевтичну композицію вводять пацієнту інгаляційно. В іншому втіленні фармацевтичну композицію вводять пацієнту перорально. У ще одному варіанті фармацевтичну композицію вводять безпосередньо у черевну порожнину пацієнта. У ще одному варіанті фармацевтичну композицію вводять за допомогою екстракорпорального пристрою з мембраною для газообміну або штучної легені.

Пацієнт може бути немовлям, наприклад, доношеним немовлям, недоношеним немовлям і/або немовлям з низькою масою при народженні. Немовля може бути новонародженим або може бути, наприклад, дитиною у віці до одного року (наприклад, у віці до шести місяців, чотирьох місяців, трьох місяців або двох місяців). Вік немовляти може бути менше шести тижнів, наприклад, менше чотирьох тижнів. Причиною NEC може бути будь-який з ряду факторів, наприклад, гіпоксія, гіпотермія, гіпотензія, висока в'язкість крові і/або ацидоз, і/або обмінна трансфузія, щонайменше, одне гіперосмолярне годування, трансфузія глобулярної маси і/або передозування антагоністів кальцію. Крім того, NEC може бути результатом ситуації, коли пацієнт страждає ішемією брижі і/або бактеріальною інфекцією стінки травного тракту (дивись, наприклад, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). Альтернативно NEC може виникнути внаслідок операції, наприклад, коли пацієнт вже піддавався їй, або буде піддаватися їй, або піддається їй. Фармацевтична композиція може бути у будь-якій формі, наприклад, газоподібній або рідкій формі.

Винахід також описує спосіб лікування або попередження некротизуючого ентероколіту у пацієнта, що включає ідентифікацію пацієнта, який страждає або має ризик розвитку некротизуючого ентероколіту, забезпечення резервуара, що містить газ, який знаходиться під тиском, що включає газоподібний СО, вивільнення газу, що знаходиться під тиском, з резервуара з утворенням атмосфери, яка містить газоподібний окис вуглецю і вплив на пацієнта атмосфери, де кількість СО в атмосфері є достатньою для лікування некротизуючого ентероколіту у пацієнта.

В іншому аспекті винахід описує спосіб проведення операції на органах черевної порожнини у пацієнта (наприклад, немовляти), що включає ідентифікацію пацієнта, для якого необхідна операція на органах черевної порожнини, де некротизуючий ентероколіт являє собою значний ризик при операції на органах черевної порожнини; проведення операції на органах черевної порожнини у пацієнта і до, під час або після неї проведення стадії інгаляційного впливу кількістю газоподібного СО, достатньою для зниження ризику розвитку некротизуючого ентероколіту у пацієнта.

Також винахід включає спосіб лікування некротизуючого ентероколіту у пацієнта, що включає: (а) ідентифікацію пацієнта, який страждає некротизуючим ентероколітом; (b) проведення операції у пацієнта з приводу резекції ураженої ділянки кишечника пацієнта і (c) введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить кількість окису вуглецю, ефективну для лікування некротизуючого ентероколіту у пацієнта після стадії (а) і перед, під час або після стадії (b).

В іншому аспекті винахід забезпечує резервуар, що містить стиснутий газоподібний СО для медичних цілей. Резервуар має мітку, яка вказує, що газ можна використовувати для лікування NEC у пацієнта, наприклад, немовляти. Газоподібний СО може знаходитися у суміші з газоподібним азотом, з окисом азоту і газоподібним азотом або з газом, що містить кисень. Газоподібний СО може знаходитися у суміші у 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 NEC у пацієнта, що включає ідентифікацію пацієнта, який страждає або має ризик розвитку NEC, і введення пацієнту, щонайменше, одного препарату у поєднанні з лікуванням СО: такого, що індукує HO-1 або феритин у пацієнта; такого, що експресує рекомбінантний HO-1 або феритин у пацієнта, і введення фармацевтичної композиції, що містить HO-1, білірубін, білівердин, феритин або апоферитин, залізо, десфероксамін або декстран-залізо пацієнту. Також включається застосування СО і одного з перерахованих вище засобів в одержанні лікарського препарату для лікування або попередження ілеусу.

Крім того, винахід забезпечує спосіб лікування NEC у пацієнта, що включає ідентифікацію пацієнта, який

страждає або має ризик розвитку NEC, і проведення, щонайменше, одного з наступних видів лікування разом з СО: внутрішньовенного живлення, внутрішньовенної гідратації, введення антибактеріальних агентів; назогастральної декомпресії у пацієнта, проведення операції у пацієнта і дренування черевної порожнини пацієнта.

Також в обсязі винаходу знаходиться застосування СО у виробництві лікарського препарату для лікування або попередження NEC. Лікарський препарат можна використовувати у способі лікування NEC у пацієнта, який страждає або має ризик розвитку NEC, відповідно до описаних способів. Лікарський препарат може бути у будь-якій формі, розкритий в описі, наприклад, рідкою або газоподібною композицією СО.

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

Деталі одного або більше варіантів винаходу наведені в описі винаходу. Інші ознаки, цілі і переваги винаходу стануть зрозумілими з опису і формули винаходу.

Опис фігур

Фіг.1 А являє собою картину Вестерн-блотингу, яка показує, що експресія HO-1 підвищується у пробах кишкового новонароджених дітей, які страждають NEC (NEC) у порівнянні з пацієнтами без NEC (контроль) (n=3).

Фіг.1В являє собою картину Вестерн-блотингу, яка показує, що рівень білка HO-1 у клубовій кишці підвищується на 4 добу у новонароджених щурів, які були піддані гіпоксії з переривами ігодуванню молочною сумішшю (NEC) у порівнянні з контрольними щурами, які знаходяться на грудному вигодовуванні (контроль) (n=4).

Фіг.2А являє собою мікрофотографію (збільшення 40X) забарвленого гематоксиліном і еозином цілісного препарату клубової кишки, яка показує вплив грудного вигодовування на новонароджених щурів. Пробу відбирали на 4 добу.

Фіг.2В являє собою мікрофотографію (збільшення 40X) забарвленого гематоксиліном і еозином цілісного препарату клубової кишки, яка показує вплив грудного вигодовування і впливу СО на новонароджених щурів. Пробу відбирали на 4 добу.

Фіг.2С являє собою мікрофотографію (збільшення 40X) забарвленого гематоксиліном і еозином цілісного препарату клубової кишки, яка показує впливгодування молочною сумішшю плюс гіпоксії на новонароджених щурів. Пробу відбирали на 4 добу. Можна спостерігати зміни структури, включаючи атрофію ворсинок і вакуолізацію клітин.

Фіг.2D являє собою мікрофотографію (збільшення 40X) забарвленого гематоксиліном і еозином цілісного препарату клубової кишки, яка показує впливгодування молочною сумішшю плюс гіпоксії і впливу СО на новонароджених щурів. Є значно менш виражені структурні зміни у порівнянні з препаратом, наведеним на Фіг.2С. Пробу відбирали на 4 добу.

Фіг.3А являє собою мікрофотографію (збільшення 60X) забарвленого TUNEL (кінцева дезоксинуклеотидилтрансферазна, опосередкована dUTP-нік мітка) цілісного препарату клубової кишки, яка показує вплив грудного вигодовування на новонароджених щурів. Пробу відбирали на 4 добу.

Фіг.3В являє собою мікрофотографію (збільшення 60X) забарвленого TUNEL цілісного препарату клубової кишки, яка показує вплив грудного вигодовування і впливу СО на новонароджених щурів. Пробу відбирали на 4 добу.

Фіг.3С являє собою мікрофотографію (збільшення 40X) забарвленого TUNEL цілісного препарату клубової кишки, яка показує впливгодування молочною сумішшю плюс гіпоксії на новонароджених щурів. Пробу відбирали на 4 добу. Клубова кишка від щурів, які були піддані гіпоксії/годуванню молочною сумішшю відрізнялася підвищеним забарвленням TUNEL у порівнянні з тваринами, які одержували грудне молоко.

Фіг.3В являє собою мікрофотографію (збільшення 40X) забарвленого TUNEL цілісного препарату клубової кишки, яка показує впливгодування молочною сумішшю; плюс гіпоксії і впливу СО на новонароджених щурів. Пробу відбирали на 4 добу. Спостерігали зниження кількості позитивно забарвлених TUNEL клітин.

Фіг.4А являє собою графік у вигляді діаграми, який показує, що обробка СО запобігає підвищенню концентрації IL-1 $\beta$  у сироватці крові у новонароджених щурів, які були піддані гіпоксії плюсгодуванню молочною сумішшю, у порівнянні з контрольними тваринами (P<0,05). Дані одержували при використанні аналізу ELISA. Чорні колонки = щурі, оброблені повітрям; сірі колонки = щурі, які були піддані впливу СО.

Фіг.4В являє собою графік у вигляді діаграми, який показує, що обробка СО запобігає підвищенню концентрації TNF- $\alpha$  у сироватці крові у новонароджених щурів, які були піддані гіпоксії ігодуванню молочною сумішшю, у порівнянні з контрольними тваринами (P<0,05). Дані одержували при використанні аналізу ELISA. Чорні колонки = щурі, оброблені повітрям; сірі колонки = щурі, оброблені СО.

Фіг.5 являє собою картину Вестерн-блотингу, яка показує, що обробка СО знижує експресію COX-2 і IL-1 $\beta$  у клубовій кишці у новонароджених щурів, які були піддані гіпоксії ігодуванню молочною сумішшю, у порівнянні з контрольними тваринами. Наявність (+) або відсутність (-) кожної обробки (грудне вигодовування (BF),годування молочною сумішшю плюс гіпоксія (FF/гіпоксія) і вплив СО (CO)) вказані внизу кожної смуги Вестерн-блоту. Блот являє собою 3-4 тварини у групі і є показовим для всіх тварин у досліді.

Фіг.6 являє собою картину Вестерн-блотингу, яка показує, що обробка СО знижує експресію і нітрування білка iNOS при експериментальному NEC у новонароджених щурів. Наявність (+) або відсутність (-) кожної обробки (грудне вигодовування (BF),годування молочною сумішшю плюс гіпоксія (FF/гіпоксія) і обробка СО (CO)) вказана внизу кожної смуги Вестерн-блоту.

Фіг.7 являє собою графік у вигляді діаграми, який показує, що вплив СО та індукція HO-1 знижують

індуковану TNF- $\alpha$ /актиноміцином D (TNF- $\alpha$ /ActD) загибель клітин IEC-6. Життєздатність оброблених TNF- $\alpha$  (TNF; 10нг/мл)/актиноміцином D (ActD; 200нг/мл) клітин IEC-6 оцінювали через 18год. за визначенням вмісту АТФ у клітинах. Обробку СО (СО; сірі колонки; 250ррт) починали за 1год. до введення TNF- $\alpha$ /ActD і продовжували протягом всього досліджу. Заштриховані колонки = клітини, що були піддані впливу кобальту-протопорфірину (CoPP) за 16год. до впливу TNF- $\alpha$ /ActD. Чорні колонки = клітини, що були піддані впливу повітря. Обидва СО і CoPP значно знижували індуковану TNF- $\alpha$ /ActD загибель клітин IEC-6 ( $P < 0,05$ ). Дані наведені у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартна похибка по 3 незалежних дослідах у трьох повтореннях.

Фіг.8А являє собою картину Вестерн-блотингу, яка показує (через 24год.), що експресія білка iNOS придушувалася у клітинах, оброблених ліпополісахаридом (LPS) і/або при гіпоксії у клітинах IEC-6. Обробку СО (250ррт) починали через 1год. перед додаванням LPS/гіпоксії і продовжували протягом досліджу. Сумісний вплив LPS (10 або 100нг/мл) плюс гіпоксія підвищував експресію білка iNOS, ця дія придушувалася СО. Наявність (+) або відсутність (-) кожної обробки (ліпополісахарид (LPS), вплив гіпоксії (гіпоксія) і вплив СО (СО)) вказана внизу кожної смуги Вестерн-блоту.

Фіг.8В являє собою графік у вигляді діаграми, який показує, що активність промотору щурячої iNOS в оброблених LPS (100нг/мл)/гіпоксією (1% кисню; LPS/гіпоксія) клітинах IEC-6 придушувалася впливом СО. Визначали активність люциферази у клітинах. Сумісний вплив LPS плюс гіпоксії приводив до 4,9 $\pm$ 0,3-разового підвищення активації транскрипції промотору iNOS ( $P < 0,05$ ). СО знижував дану активацію транскрипції до 1,7 $\pm$ 0,2-разового збільшення ( $P < 0,05$ ). Дані наведені у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартна похибка по 3 незалежних дослідах, проведених у трьох повтореннях.

Фіг.8С являє собою картину Вестерн-блотингу, яка показує, що індукована цитокінами експресія білка iNOS придушувалася у клітинах IEC-6 індукцією HO-1 або обробкою СО. Клітини IEC-6 обробляли сумішшю цитокінів (CM), яка містить TNF- $\alpha$  (10нг/мл), IL-1 $\beta$  (500Е/мл) та INF- $\gamma$  (1000Е/мл) протягом 24год. Обробку СО (250ррт) починали за 1год. до введення CM і продовжували протягом досліджу. Протопорфірин СО (CoPP) вводили за 16год. до обробки CM. CM підвищувала експресію білка iNOS у клітинах IEC-6. Обидва СО і CoPP знижували індукований цитокінами рівень білка iNOS. Наявність (+) або відсутність (-) кожної обробки (суміш цитокінів (CM), вплив СО (СО) і протопорфірину СО (CoPP)) вказана внизу кожної смуги на Вестерн-блоті.

Фіг.8D являє собою графік у вигляді діаграми, який показує, що концентрація нітритів у супернатантах клітин IL-6, що були піддані впливу CM і або СО, або CoPP, нижче у порівнянні з клітинами, обробленими CM і повітрям (за даними тесту Гріса). Стимуляція цитокінами підвищувала концентрацію нітритів до 17,2 $\pm$ 0,9мкМ у порівнянні з 1,4 $\pm$ 0,3мкМ у нестимульованих контрольних клітинах ( $P < 0,05$ ). СО і CoPP значно придушували даний ефект цитокінів, що приводить до концентрації нітритів відповідно 9,8 $\pm$ 0,7 і 10,4 $\pm$ 1,0 ( $P < 0,05$  у порівнянні зі стимульованими CM клітинами). Чорні колонки = клітини, що були піддані впливу повітря; сірі колонки = клітини, що були піддані впливу СО і заштриховані колонки = клітини, оброблені CoPP.

Термін «окис вуглецю» (або «СО») у тому значенні, в якому він використовується в описі, описує молекулярний окис вуглецю в його газоподібному стані, стиснутим у рідку форму або розчинним 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 СО, яку можна вводити пацієнту і/або в орган, уражений NEC. Фахівцям у 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» у тому значенні, в якому вони тут використовуються, відносяться до кількості або концентрації СО, що використовується протягом періоду часу (включаючи короткочасне або тривале введення, і періодичне або постійне введення), який ефективний відносно його введення для вияву призначеної дії або фізіологічного ефекту у пацієнта. Ефективні кількості СО для застосування у даному винаході включають, наприклад, кількості, які ослаблюють симптоми NEC у пацієнта або підвищують результативність лікування.

Для газів ефективні кількості СО, як правило, знаходяться у межах приблизно від 0,0000001% до приблизно 0,3% за масою, наприклад, від 0,0001% до приблизно 0,25% за масою, переважно складають, 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 у межах приблизно від 0,0001 до приблизно 0,0044г СО/100г рідини, наприклад, складають, 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 0,0042г 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. Для фахівців у даній галузі очевидно, що можна використовувати кількості, які виходять з даних меж, в залежності від застосування.

Термін «пацієнт» використовується в описі для позначення людини або тварини для якої забезпечується лікування способом 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, кроликами, морськими свинками, хом'яками, коровами, конями, котами, собаками, вівцями і козами. Термін «лікувати» («лікування») використовується тут для опису затримки розвитку, придушення або полегшення симптомів стану, наприклад NEC, у пацієнта.

Термін «некротизуючий ентероколіт» або «NEC» є загальновизнаним терміном у даній галузі, і його використовують для позначення захворювання пацієнтів, зокрема, недоношених і доношених немовлят, яке характеризується відсутністю бар'єра кишечника, некрозом кишечника, сепсисом і недостатністю органів багатьох систем (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). NEC може вражати будь-яку частину кишечника, наприклад, нижню частину тонкого кишечника (клубову кишку), ободову кишку і/або верхню частину тонкого кишечника. Ризик розвитку некротизуючого ентероколіту пов'язаний з багатьма факторами, наприклад, низькою масою при народженні, гіпоксією, гіпотермією, гіпотензією, високою

в'язкістю крові, ацидозом або наявністю вільних радикалів (Id). Інші фактори ризику включають канюлю пупкової артерії, обмінну трансфузію, гіперосмолярне годування, трансфузію глобулярної маси або передозування антагоністів кальцію (Id). Подібні фактори можуть привести до розвитку ішемії брижі, що, у свою чергу, викличе бактеріальне запалення стінки кишечника, приводячи до некрозу зараженої тканини і/або перфорації стінки кишечника і септицемії (Id). NEC також може мати місце у новонароджених після операції на шлунково-кишковому тракті або інших станах (Id).

Фахівці у даній галузі розуміють, що діагностувати пацієнта, який страждає NEC можна будь-яким методом, відомим у даній галузі, наприклад, за допомогою діагнозу лікаря (наприклад, з використанням способів візуалізації таких, як ультрасонографія, рентгенівські промені і/або аналізи крові).

Винахід особливо корисний для індивідумів з ризиком розвитку NEC, в основному тому, що профілактичне лікування можна почати до вияву ознак NEC. Індивідуми «групи ризику» включають, наприклад, недоношених і новонароджених немовлят або індивідумів, які страждають одним зі станів або мають фактори ризику, описані вище. Фахівець у даній галузі, очевидно, розуміє, що пацієнта з ризиком розвитку NEC можна визначити будь-яким методом, відомим у даній галузі, наприклад, у результаті постановки лікарем діагнозу (наприклад, при оцінці лікарем факторів ризику у пацієнта).

Одержання газоподібних композицій

Композиція на основі CO може являти собою газоподібну композицію CO. Стиснутий або такий, що знаходиться під тиском, газ, придатний у способах за винаходом, можна одержати з будь-якого промислового джерела та у резервуарі будь-якого типу, придатному для зберігання стиснутого газу. Наприклад, стиснуті або такі, що знаходяться під тиском, гази можна одержати з будь-якого джерела, що постачає стиснуті гази, такі як кисень, для медичних цілей. Термін газ «для медичних цілей» у тому значенні, в якому він використовується в описі, відноситься до газу, придатного для введення пацієнтам. Газ, що знаходиться під тиском, який включає CO, 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 знаходитися в одному резервуарі, за винятком того, що NO і O<sub>2</sub> не можуть зберігатися разом. Необов'язково способи за даним винаходом можна здійснювати з використанням декількох резервуарів, що містять окремі гази. Наприклад, може бути окремий резервуар, що містить CO 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, стиснуте 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 1ppb (частина на мільярд) або 0,001ppm (частина на мільйон) до приблизно 3000ppm) окису вуглецю. Переважно, щоб кількість азоту у газоподібній композиції складала приблизно 79% за масою, кількість кисню складала приблизно 21% за масою і кількість CO знаходилося у межах приблизно від 0,0001% до приблизно 0,25% за масою. Кількість CO переважно складає, 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 CO з концентрацією CO вище 0,3% (наприклад, 1% або більше) можна використовувати протягом короткого періоду часу (наприклад, один або декілька вдихів) в залежності від застосування.

Газоподібні композиції на основі CO можна використовувати для створення атмосфери, яка містить газоподібний CO. Атмосферу, яка містить відповідні концентрації газоподібного CO, можна створити, наприклад, забезпеченням резервуара, що містить газ, який знаходиться під тиском, що включає газоподібний CO, і вивільненням газу, що знаходиться під тиском, з резервуара у камеру або простір з утворенням атмосфери, яка містить газоподібний CO у камері або просторі. Альтернативно гази можуть знаходитися в апараті, який проходить до дихальної маски або дихальної трубки, за допомогою чого створюється атмосфера, що містить газоподібний CO у дихальній масці або дихальній трубці з гарантією того, що пацієнт є єдиною людиною у кімнаті, що піддається впливу CO у високих концентраціях.

Концентрацію CO в атмосфері можна визначити або контролювати з використанням будь-якого методу, відомого у даній галузі. Подібні методи включають електрохімічне визначення, газову хроматографію, радіоізотопний метод, інфрачервону спектрометрію, колориметрію та електрохімічні методи, що базуються на вибірних мембранах (дивись, наприклад, Sunderman 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 CO на рівні менше однієї частини на мільйон частин. Крім того, у даній галузі відомо, що концентрацію CO менше ppm можна визначити у біологічній тканині за допомогою інфрачервоного газового детектора (дивись, наприклад, Morimoto et al., Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 280: H482-H488, 2001). Детектори CO і детектувальні газові пристрої є комерційно доступними з багатьох джерел.

Одержання рідких композицій

Композиція на основі CO також може являти собою рідку композицію CO. Рідку композицію на основі CO можна одержати будь-яким методом, відомим у даній галузі для розчинення газів у рідинах. Наприклад, рідину можна помістити у так званий «CO<sub>2</sub>-інкубатор» і піддати впливу постійного потоку CO, переважно збалансованого з двоокисом вуглецю, до досягнення бажаної концентрації CO у рідині. Як інший приклад газоподібний CO можна «барботувати» безпосередньо у рідину до досягнення бажаної концентрації CO у рідині. Кількість CO, яку можна розчинити у 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 CO (наприклад, при використанні такого пристрою, як екстракорпоральний мембранний оксигенатор). CO дифундує у рідину з одержанням рідкої композиції CO.

Імовірно, подібна рідка композиція, призначена для введення живій тварині, повинна мати температуру,

що дорівнює або близько 37°C під час введення тварини.

Рідина може являти собою будь-яку рідину, відому фахівцям у даній галузі, як придатну для введення пацієнтам або для збереження і/або промивання, і/або перфузії цікавлячих органів (дивись, наприклад, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). Як правило, рідина буде водним розчином. Приклади відповідних розчинів включають забуферений фосфатом фізіологічний розчин (PBS), селсіор™, перфадекс™, розчин Колінза, цитратний розчин і розчин Університету Вісконсину (VW) (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). В одному втіленні даного винаходу рідина являє собою розчин Рінгера, наприклад, розчин Рінгера з лактатом або будь-яку іншу рідину, яку можна інфузувати пацієнту. В іншому втіленні рідина включає кров, наприклад, цільну кров.

Будь-яку придатну рідину можна наситити до потрібної концентрації CO за допомогою газового дифузора. Альтернативно можна використовувати заздалегідь приготовані розчини, які ретельно відрегульовані відносно вмісту потрібної концентрації CO для застосування. Ретельного контролю дози можна досягти шляхом вимірювань за допомогою проникної для газу, непроникної для рідини мембрани, з'єднаної з аналізатором CO. Розчини можна наситити до бажаних ефективних концентрацій і підтримувати на даному рівні.

Лікування пацієнтів композиціями на основі окису вуглецю

Пацієнта можна лікувати композицією CO будь-яким способом, відомим у даній галузі для введення газів і/або рідин пацієнту. Композиції на основі CO можна вводити пацієнту з вже поставленим діагнозом або при ризику розвитку NEC, наприклад, новонародженим або недоношеним немовлятам. Даний винахід включає системне введення рідких або газоподібних композицій CO пацієнтам (наприклад, інгаляцією і/або введенням всередину) і місцеве застосування композицій у шлунково-кишковий тракт пацієнта (наприклад, введенням всередину, інгаляцією і/або введенням у черевну порожнину).

Системна доставка окису вуглецю

Газоподібні композиції CO можна вводити пацієнту системно, наприклад, з вже поставленим діагнозом або при ризику розвитку NEC. Газоподібні композиції на основі CO, як правило, вводять інгаляційно через рот або носові проходи у легені, де CO може виявляти свою дію безпосередньо або після всмоктування у кровотік пацієнта. Концентрація активної сполуки (CO), що використовується у терапевтичній газоподібній композиції, буде залежати від швидкості всмоктування, розподілу, інактивації і виділення (як правило, через органи дихання) CO, а також інших факторів, відомих фахівцям у даній галузі. Потрібно розуміти, що для будь-якого конкретного суб'єкта, конкретні схеми введення потрібно підбирати 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 призначені для обмеження обсягу або використання заявленої композиції. Короткочасне, середнє за тривалістю і тривале введення CO входить в обсяг даного винаходу в залежності, наприклад, від тяжкості або тривалості NEC у пацієнта. CO можна вводити пацієнту протягом часу (включаючи невизначено довго), достатнього для лікування стану і вияву фармакологічної або біологічної дії, що призначається.

Наступне являє собою приклади деяких способів і пристроїв, які можна використовувати для введення газоподібних композицій окису вуглецю пацієнтам.

Вентилятори

CO для медичних цілей (концентрації можуть варіювати) можна одержати у суміші з повітрям або іншим газом, що містить кисень, у звичайному резервуарі для стиснутого газу (наприклад, 21% O<sub>2</sub>, 79% N<sub>2</sub>). Він не є реакційноздатним, і концентрації, які необхідні для здійснення способів за даним винаходом, знаходяться нижче меж займистості (10% у повітрі). У лікарні газ переважно буде доставлятися до ліжка, де він буде змішуватися з киснем або кімнатним повітрям у змішувачі до бажаної концентрації в ррт (частина на мільйон). Пацієнт буде вдихати газову суміш через вентилятор, який буде настроєний на швидкість потоку, базуючись 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 запобігання одержанню невинуватого більших кількостей CO, ніж необхідні. Можна контролювати концентрацію CO у пацієнта при визначенні (1) карбоксигемоглобіну (COHb), який можна визначати у венозній крові і (2) окису вуглецю, що видихається, зібраному з бічного отвору вентилятора. Вплив CO можна регулювати, базуючись на стані здоров'я пацієнта і на основі маркерів. Якщо необхідно CO можна видалити з організму пацієнта інгаляцією 100% O<sub>2</sub>. CO не метаболізується, і таким чином те, що надійшло при вдиху, буде повністю виділятися при видиху, за винятком дуже невеликого процента, який перетворюється у CO<sub>2</sub>. CO також можна змішати з будь-якою кількістю O<sub>2</sub> для забезпечення терапевтичної доставки CO без розвитку можливої подальшої гіпоксії.

Маски на обличчя і намети

Газоподібну суміш, що містить CO, готують, як вказано вище, для пасивної інгаляції пацієнтами з використанням масок на обличчя або наметів. Вдихувану концентрацію можна змінювати і можна просто видаляти просто доведенням до 100% O<sub>2</sub>. Потрібно проводити моніторинг концентрації CO біля маски або намету безпечним механізмом для запобігання вдиханню дуже високої концентрації CO.

Портативний інгалятор

Стиснутий CO можна помістити у портативний інгаляційний пристрій і вдихати у відмірюваній дозі, наприклад, для переривчастого лікування реципієнта, який не знаходиться у лікарні. У контейнери CO можна помістити у різних концентраціях. Пристрій може бути таким простим, як невеликий резервуар (наприклад, масою менше 5кг) з розбавленим відповідним чином CO з клапаном для вмикання-вимикання і трубою, з якої пацієнт вдихає порцію CO за стандартною схемою або як це потрібно.

Внутрішньовенна штучна легеня

Штучну легеню (катетерний пристрій для газообміну у крові), що призначається для доставки O<sub>2</sub> і видалення CO<sub>2</sub>, можна використовувати для доставки CO. Катетер після імплантації залишається в одній з великих вен і здатний доставляти CO у заданій концентрації або при системному введенні, або місцево. Введення може бути місцевим введенням CO у високій концентрації протягом короткого періоду часу у місці

проведення процедури, наприклад, безпосередньо близько до тонкого кишечника (дана висока концентрація буде швидко проникати і розбавлятися у кровотоці) або при відносно більш тривалому впливі CO у нижчій 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 CO на пацієнта загалом. Пацієнт буде знаходитися всередині герметичної камери, яку заповнюють CO (у концентрації, безпечній для пацієнта, або у 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 CO для гарантії того, що CO не залишається перед виходом пацієнта з системи впливу.

#### Системна доставка рідких композицій CO

Даний винахід додатково включає створення рідких композицій CO для системного введення пацієнту, наприклад, інфузією пацієнту. Наприклад, рідкі композиції CO такі, як насичений CO розчин Рінгера, можна вводити пацієнту, який страждає або має ризик розвитку NEC. Альтернативно або додатково можна вводити насичену CO частково і повністю цільну кров (або частково) пацієнту. Даний винахід також включає застосування засобів, здатних доставляти дози газоподібного або рідкого CO (наприклад, полімери, що вивільняють, креми, мазі або пластири).

#### Місцеве лікування шлунково-кишкового тракту окисом вуглецю

Альтернативно або додатково композиції на основі CO 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, недоношеного немовляти або новонародженого, будь-яким методом, відомим у даній галузі для вдихання газів пацієнту. Наприклад, гази, наприклад, двоокис вуглецю, часто вдихають у 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)). Для фахівців у даній галузі очевидно, що для введення композицій CO безпосередньо у шлунково-кишковий тракт пацієнта можна використовувати аналогічні методи. Передбачається, що даний винахід можна використовувати для запобігання NEC, що виникає у результаті лапароскопії і ендоскопії, наприклад, колоноскопії та езофагогастроуденоскопії.

Водні композиції CO можна також вводити місцево у шлунково-кишковий тракт пацієнта. Водні форми композицій можна вводити будь-яким методом, відомим у 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 ввести перорально, наприклад, при заковтуванні інкапсульованої або неінкапсульованої дози водної композиції CO. Як інший приклад рідини, наприклад, сольові розчини, що містять розчинений CO, можна вводити у шлунково-кишковий тракт і черевну порожнину пацієнтів відповідно під час ендоскопічної і лапароскопічної процедури. Крім того, можна провести вплив *in situ* будь-яким методом, відомим у даній галузі, наприклад, промиванням органу шлунково-кишкового тракту або його ділянки рідкою композицією CO (дивись *Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)).

#### Застосування гемоксигенази-1, інших сполук та інших видів лікування для NEC

Також передбачається включення у даний винахід індукції або експресії гемоксигенази-1 (HO-1) у поєднанні з введенням CO. Наприклад, HO-1 можна індукувати у пацієнта, який страждає або має ризик розвитку NEC. У тому значенні, в якому він використовується, термін «індукувати(ний)» відноситься до забезпечення підвищеного продукування білка, наприклад, HO-1, в ізольованих клітинах або клітинах тканини, органі або у тварини з використанням власного ендогенного (наприклад, нерекombінантного) гена клітин, який кодує білок.

HO-1 можна індукувати у пацієнта будь-яким методом, відомим у даній галузі. Наприклад, продукування HO-1 можна стимулювати геміном, протопорфіном-залізом або протопорфірином-кобальтом. Найрізноманітніші засоби, що не містять гем, включаючи важкі метали, цитокіни, гормони, NO, COCl<sub>2</sub>, ендотоксин і тепловий шок також є сильними стимуляторами експресії HO-1 (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). HO-1 також піддається індукції у 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 гіпероксію (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 HO-1» означає фармацевтичну композицію, що містить будь-який засіб, здатний індукувати HO-1 у пацієнта, наприклад, будь-який з засобів, описаних вище, наприклад, гемін, протопорфірин-залізо і/або протопорфірин-кобальт.

Експресію HO-1 у клітині можна підвищити за допомогою перенесення гена. У тому значенні, в якому він використовується тут, термін «експресувати(ний)» означає забезпечення підвищеного продукування білка, наприклад, HO-1 або феритину в ізольованих клітинах або клітинах тканини, органі або у тварини з використанням екзогенного введеного гена (наприклад, рекомбінантного гена). HO-1 або феритин переважно є того ж виду (наприклад, людини, миші, щура і т.п.), що і реципієнт для зведення до мінімуму вияву імунної реакції. Експресія може направлятися конститутивним промотором (наприклад, промоторами цитомегаловірусу) або тканиноспецифічним 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 імунodefіциту людини (HIV), малого вірусу мишей, вірусу гепатиту В, вірусу грипу, герпесвірусу-1 і лентивірусу), що кодує HO-1 або феритин, потрібно вводити пацієнту перорально, інгаляційно або ін'єкційно у стінку кишечника, просвіт кишечника або черевну порожнину. Аналогічним чином

можна вводити плазмідні вектори, що кодують HO-1 або апоферитин, наприклад, у вигляді «голої» ДНК у ліпосомах або мікрочастинках.

Крім того, екзогенний білок HO-1 можна вводити пацієнту безпосередньо будь-яким відомим у даній галузі методом. Екзогенну HO-1 можна безпосередньо вводити, на додаток до або як альтернативу, для індукції або експресії HO-1 у пацієнта, як описано вище. Білок HO-1 можна вводити пацієнту, наприклад, у ліпосомах і/або у вигляді злитого білка, наприклад, у вигляді TAT-злитого білка (дивись, наприклад, Becker-Narak et al., Methods 24:247-256, 2001).

Альтернативно або додатково будь-який з продуктів метаболізму HO-1, наприклад, білірубін, білівердин, залізо і/або феритин, можна вводити пацієнту у поєднанні з окисом вуглецю для профілактики або лікування NEC. Крім того, у даному винаході передбачається, що пацієнту можна вводити інші молекули, що зв'язують залізо, ніж феритин, наприклад, десфероксамін (DFO), декстрану-заліза і/або апоферитину. Крім того, у даному винаході передбачається, що ферменти (наприклад, білівердинредуктаза), які каталізують розщеплення будь-якого з даних продуктів, можна інгібувати з одержанням/посиленням бажаної дії. Будь-яку зі згаданих вище сполук можна вводити, наприклад, перорально, внутрішньовенно, внутрішньочеревинно або безпосереднім введенням на внутрішню або зовнішню поверхню кишечника.

У даному винаході передбачається, що сполуки, які вивільняють СО в організмі при введенні сполуки (наприклад, сполуки, що вивільняють СО, наприклад, сполуки, що вивільняються СО, які фотоактивуються), наприклад, декакарбонілдимарганець, димер трикарбонілдіхлоруртенію (II) і метилхлорид (наприклад, у дозі у межах від 400 до 600мг/кг, наприклад, приблизно 500мг/кг) також можна використовувати у способах за даним винаходом, як і замісники карбоксигемоглобіну і гемоглобіну, що вивільняє СО.

Введення будь-якої зі згаданих вище сполук пацієнту можна проводити будь-яким шляхом, наприклад, перорально, внутрішньовенно або внутрішньоартеріально. Будь-яку зі згаданих вище сполук можна вводити пацієнту місцево і/або системно та у будь-якому поєднанні.

Даний винахід додатково включає лікування NEC введенням СО пацієнту у комбінації з іншими відомими методами або сполуками для лікування NEC, наприклад, припиненням або зменшенням приймання їжі через рот, наприклад, щонайменше, протягом 1 доби, наприклад, щонайменше, 2, 3, 5 або 10 діб або більше; внутрішньовенним введенням гідратантів і/або поживних речовин; назогастральною декомпресією або антибактеріальною терапією у пацієнта; хірургічним втручанням і/або дренажуванням черевної порожнини пацієнта. Хірургічні втручання включають, наприклад, резекцію ураженої ділянки кишечника. Також даний винахід включає профілактичне лікування пацієнтів при ризику розвитку NEC введенням СО пацієнту у комбінації з будь-яким іншим відомим методом для запобігання NEC, наприклад, зміною раціону пацієнта.

Винахід частково ілюструється наступними прикладами, які у жодному випадку не призначені для обмеження винаходу.

Приклад 1. СО ослаблює розвиток NEC

Відбір проб кишечника людини

Відбирали проби кишечника людини і заморожували під час відбору при операції.

Модель некротизуючого ентероколіту на тваринах

Варітних самок щурів Sprague-Dawley стимулювали на ролі підшкірним введенням пітоцину (IE). Відразу ж після народження (0 день) новонароджених зважували і довільно розподіляли на дві основні групи. Тварин залишали або з їх матерями і, таким чином, вони знаходилися на грудному вигодовуванні, або відділяли від їх матерів, поміщали в інкубатор (Ohio Medical Products, Madison, WI), годували через шлуночковий зонд спеціальною молочною сумішшю для гризунів два рази на день і піддавали гіпоксії протягом 10хв. (5% O<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>; PraxAir, Pittsburgh, PA) перед кожним годуванням. Молочна суміш складалася з 15г Similac® 60/40 (Ross Pediatrics, Columbus, OH) в 75мл замісника собачого молока Esbilac® (Pet-Ag Inc., Hampshire, IL). Потім щурів з кожної групи довільно розділяли на таких, які не одержують додаткового лікування, або таких, які одержують протягом однієї години на день обробку СО (250 частин на мільйон; ppm, 1-3 доби). СО вводили, як описано нижче. Новонароджених щурів вбивали на 4 добу. Кишечники обстежували на наявність макроскопічних некротичних змін і кишкового пневматозу. Останні 2см клубової кишки відбирали для проведення морфологічних досліджень і відбирали зскрібки слизової для детектування білка.

Вплив СО

Вплив СО на тваринах проводили у концентрації 250ppm. Коротко, 1% СО у повітрі змішували з повітрям (21% кисню) у циліндрі для змішування з нержавіючої сталі і потім направляли у скляну камеру для впливу ємністю 3,70 футів<sup>3</sup> зі швидкістю потоку 12л/хв. Аналізатор СО (InterScan, Chats worth, CA) використовували для постійного визначення концентрації СО у камері. Протягом усього дослідного періоду концентрацію СО підтримували на рівні 250ppm. Коли було потрібно, щурів поміщали у камеру для впливу.

Морфологічні дослідження

Проби кишечника відбирали, як описано вище. Готували забарвлені гематоксиліном та еозином (H&E) препарати за стандартним протоколом і досліджували під світловим мікроскопом. Патолог «сліпим» методом визначав наявність морфологічних змін в епітелії кишечника, включаючи відділення ворсинок, набряк підслизової і відторгнення епітелію.

Визначення концентрації цитокінів у сироватці крові

Відбирали проби сироватки крові для визначення концентрації TNF- $\alpha$  і IL-1 $\beta$  у щурів з використанням набору для постановки ELISA Quantikin® (R&D systems, Mineapolis, MN), дотримуючись інструкцій виробника.

Клітинні культури

Лінію епітеліальних клітин тонкого кишечника щурів IEC-6 одержували з Американської колекції типових культур (Manassas, VA). Клітини культивували у середовищі Ігла, модифікованому за способом Дульбеко, що містить 4,5г/л глюкози (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) з додаванням 5% фетальної бичачої сироватки, 0,02мМ глутаміну (Gibco, Grand Island, NY), 0,1Е/мл інсуліну і 100Е/мл пеніциліну/100мг/мл стрептоміцину при 37°C і 10% CO<sub>2</sub>. Клітини з пасажів 3-20 використовували для дослідів.

Життєздатність

Життєздатність клітин оцінювали за визначенням концентрації АТФ (CellTiter-Glo™; Promega), дотримуючись протоколу виробника.

#### Вестерн-блотинг

Клітини IEC-6 або зскрібки слизової клубової кишки поміщали у буфер для лізису, що містить 20ммоль/л Трис-буфера з 100ммоль/л фенолметил-сульфонілфториду (Sigma), 1ммоль/л лейпептину (Sigma) і 1ммоль/л ортованадату натрію (Sigma). Кількісне визначення білка проводили методом з біцинхоніновою кислотою (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Лізати (30мкг) піддавали електрофорезу у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію.

#### Репортерний тест

Конструювали репортер промотору люциферази pGL3/2 щурячої iNOS, як описано у Beck et al., FEBS Lett 435: 35-38 (1998). Клітини IEC-6, культивовані в ямках розміром 35мм, трансфертували 4мкл ліпофектаміну 2000® (Invitrogen), 0,15мкг ДНК pGL3/2 і 0,5мкг ДНК pREP-LacZ, які використовували як контроль ефективності трансфекції. Через 24год. після трансфекції клітини обробляли протягом 6год., потім збирали лізати і проводили визначення активності люциферази (Promega) з використанням люмінометра (Berthold, Німеччина).

#### Визначення нітритів

Концентрацію нітритів (NO<sub>2</sub>) визначали у культуральному середовищі з використанням методу Гріса.

#### Статистичний аналіз

Дані виражали у вигляді середнього значення ± SEM. Відмінність між групами аналізували одностороннім варіаційним аналізом з використанням тесту Ст'юдента-Ньюмана-Кейлса для всіх парних порівнянь (SigmaStat; SPSS, Chicago, IL). Статистичну значимість приймали, коли значення Р було менше 0,05.

#### Концентрація білка HO-1 у кишечнику збільшується при NEC

Зразки кишечника людини від пацієнтів з NEC і контрольні зразки кишечника від пацієнтів з незапальним захворюванням аналізували на експресію HO-1. Було показано, що експресія HO-1 у цільних клітинних лізатах зі зразків при NEC підвищувалася у порівнянні з контролем (Фіг.1А).

Для дослідження того, чи буде збільшуватися концентрація білка HO-1 у кишечнику на моделі експериментального NEC, новонароджених щурів довільно розділяли на тих, які знаходяться на грудному вигодовуванні досхочу, або тих, які були піддані переривчастій гіпоксії, і знаходяться на молочній суміші (H/F), як описано вище. Всіх тварин вбивали на 4 добу життя і відбирали кінцеву ділянку клубової кишки та аналізували Вестерн-блотингом. Експресія білка HO-1 зростала у групі H/F у порівнянні з контрольними тваринами, які знаходяться на грудному вигодовуванні (Фіг.1В). Це узгоджується з попередніми даними про те, що різні ушкодження приводять до позитивної регуляції HO-1 у кишечнику та інших органах.

#### СО захищає від розвитку NEC

Новонароджених щурів, які знаходяться на грудному вигодовуванні і на H/F, довільно розділяли для проведення впливу СО протягом 1год. (250ppm) на добу на 1, 2 і 3 добу і без додаткової терапії. Всіх тварин вбивали на 4 добу життя. У тварин, які знаходяться на H/F, виявляли макроскопічні патологічні зміни, що включають пневматоз кишечника і некроз (дивись Таблицю 1, нижче), а також мікроскопічні зміни, характерні для експериментального NEC, у порівнянні з контрольними щурятами, які знаходяться на грудному вигодовуванні (Фіг.2А, 2В, 2С і 2Д). Обробка СО не здійснювала впливу на макроскопічні або мікроскопічні показники у тварин, які одержували грудне молоко, і достовірно захищала від розвитку експериментального NEC у щурів у групі H/F. Забарвлення TUNEL на загиблі клітини давало підвищені результати для щурят з групи H/F, однак цей показник знижувався під дією СО (Фіг.3А, 3В, 3С і 3Д).

Таблиця 1

Патологічні зміни у клубовій кишці новонароджених щурів на 4 добу життя

	Грудне вигодовування	Грудне вигодовування + СО	Годування молочною сумішшю/гіпоксія	Годування молочною сумішшю/гіпоксія + СО
Загальне число (n)	7	7	8	8
Макроскопічні зміни (n)				
Некроз стінки кишечника	0	0	5	2
Пневматоз кишечника	0	0	5	1
Мікроскопічні зміни (n)				
Атрофія ворсинок	0	0	7	8
Вакуолізація	0	1	6	3
Стромальні нейтрофіли	0	0	6	1

#### СО знижує рівень системних маркерів запалення

Під час забою збирали сироватку крові для визначення концентрацій TNF-α і IL-1β як системних маркерів запалення тканини. Концентрація як TNF-α, так і IL-1β зростала у 33,2 і 18,5 рази у групі H/F у порівнянні з контрольними щурятами, які одержували грудне молоко (Фіг.4А і 4В; P<0,05). СО достовірно знижував ці збільшення, приводячи до зростання концентрації TNF-α і IL-1β відповідно тільки у 3 і 2,5 рази (P<0,05). Дані факти показують, що екзогенний СО може ослаблювати деякі системні наслідки на даній моделі на тваринах.

#### СО знижує рівень локальних кишкових маркерів запалення

Проводили аналіз концентрації циклооксигенази-2 (COX-2) та інтерлейкіну-ірі (IL-1β), які обидва є маркерами запалення кишечника, і як було показано, пов'язані з NEC. Білкові лізати слизової клубової кишки оцінювали Вестерн-блотингом для визначення COX-2 і IL-1β. У даному дослідженні для групи H/F було



характерне збільшення концентрації білків COX-2 і IL-1 $\beta$  приблизно у половини тварин (Фіг.5). Узгоджуючись із захисною дією на основі даних мікроскопічних досліджень і за сироватковими цитокінами, обробка СО знижувала експресію обох даних білків. Так, СО знижувала експресію HO-1 у клубовій кишці на даній моделі (дані не наведені), що, ймовірно, відображає зменшення ушкодження кишечника і компенсаторні зміни, що виявляються у відповідь на ушкодження.

СО придушує утворення кишкової синтази окису азоту, що індукується (iNOS)

iNOS була підвищена у зразках кишечника від новонароджених дітей з NEC, а також у кишечнику щурів на експериментальній моделі NEC. Припускається, що індукція iNOS та утворення NO здійснюють безпосередній внесок у пошкодження тканин за допомогою утворення реакційноздатних азотвмісних молекул. Дані Вестерн-блотингу проб слизової клубової кишки у даному дослідженні показують, що H/F приводить до підвищеного рівня iNOS і нітрування білків (Фіг.6). Припускається, що нітрування або утворення нітрозотирозину викликається пероксинітридом, токсичним продуктом взаємодії NO і супероксиду. Як концентрація білка iNOS, так і нітрозотирозину була помітно нижче у тварин, оброблених СО, на основі чого можна припустити, що СО може відігравати захисну роль у кишечнику за допомогою зниження/попередження утворення NO.

HO-1/CO придушує загибель клітин IEC-6

Для дослідження того, чи придушують HO-1 або СО загибель клітин *in vitro*, використовували лінію епітеліальних клітин кишечника щурів IEC-6. Загибель клітин індукували обробкою даних клітин TNF- $\alpha$  (10нг/мл) плюс актиноміцином D (ActD; 200нг/мл). Життєздатність клітин визначали за забарвленням фіолетовим кристалічним прикріплених до субстрату клітин і рівнем клітинної АТФ. TNF- $\alpha$ /ActD знижували життєздатність клітин IEC-6 до 24 $\pm$ 2,1% у порівнянні з необробленим контролем (Фіг.7; P<0,05). СО значно придушував індуквану TNF- $\alpha$ /ActD загибель клітин, приводячи до значення життєздатності 54 $\pm$ 5,6% у порівнянні з необробленими контрольними клітинами (P<0,05). СО один не здійснював статистично значимого ефекту на життєздатність клітин IEC-6 в умовах *in vitro*. Індукція HO-1 під дією CoPP здійснювала аналогічну захисну дію.

СО попереджає позитивну регуляцію iNOS/утворення NO

Досліджували, наскільки СО може придушувати позитивну регуляцію iNOS у кишкових епітеліальних клітинах в умовах *in vitro*. Оцінювали дію LPS і/або 1% кисню (гіпоксії) на рівень білка iNOS Вестерн-блотингом. У даних дослідів було показано, що LPS/гіпоксія підвищували рівень білка iNOS у той час, як даний ефект придушувався під дією СО (Фіг.8A). Визначали дію СО на транскрипційну активність промотору щурячої iNOS у клітинах IEC-6, стимульованих LPS і гіпоксією (Фіг.8B). Сумісний вплив LPS плюс гіпоксія приводив до 4,9 $\pm$ 0,3-разового підвищення транскрипційної активності промотору iNOS при використанні тесту визначення активності люциферази (P<0,05). СО придушував дану транскрипційну активацію тільки до 1,7 $\pm$ 0,2-разового збільшення (P<0,05). Крім того, оцінювали дію СО на утворення NO у клітинах IEC-6 за визначенням рівня нітритів. Клітини IEC-6 стимулювали сумішшю цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , інтерферону- $\gamma$ ), які, як відомо, позитивно регулюють iNOS. Стимуляція цитокінами підвищувала концентрацію білка iNOS (Фіг.8C), а також нітритів до 17,2 $\pm$ 0,9мкМ у порівнянні з 1,4 $\pm$ 0,3мкМ у контролів, що не були піддані стимуляції (P<0,01; Фіг.8D). СО і CoPP значно придушували дану дію цитокінів, приводячи до концентрації нітритів відповідно 9,8 $\pm$ 0,7 і 10,4 $\pm$ 1,0 (P<0,05).

Наведені вище дані вказують, що HO-1 піддається позитивній регуляції у зразках кишечника від новонароджених дітей з NEC, а також у слизовій клубової кишки новонароджених щурів на експериментальній моделі NEC. Вплив екзогенної СО протягом 1год. на день попереджував розвиток NEC. Це пов'язано зі зменшенням системного запалення за даними рівня TNF- $\alpha$  і IL-1 $\beta$  і місцевого запалення за даними експресії IL-1 $\beta$  і COX-2 у слизовій клубової кишки. Розвиток NEC також був пов'язаний з підвищеною експресією iNOS у слизовій клубової кишки і нітруванням білків. Лікування СО зменшувало підвищення рівня iNOS і нітрозативного стресу. В умовах *in vitro* індукція HO-1 і СО здійснює захисну дію проти індукованої TNF- $\alpha$ /ActD клітинної загибелі на клітинах IEC-6. Крім того, в умовах *in vitro* СО придушувала індукцію iNOS і утворення NO.

HO-1 і його каталітичні продукти, включаючи СО, ймовірно, грають захисну роль після ушкодження кишечника. Дані, наведені вище, показують, що концентрація білка HO-1 підвищується у слизовій клубової кишки тварин з NEC, що узгоджується з результатами попередніх досліджень, які свідчать про підвищення рівня HO-1 у кишечнику на моделі ішемії/реперфузії і геморагічного шоку. Індукція HO-1, попереднім кондиціонуванням або фармакологічно, є цитопротективною після трансплантації кишечника та ішемії/реперфузії. Обробка СО, яка здійснює захисну дію відносно розвитку NEC, також попереджала позитивну регуляцію HO-1. Дане інгібування експресії HO-1 може мати місце за рахунок наявності прямої петлі по типу негативного зворотного зв'язку, однак, ймовірно, це є вторинним по відношенню до захисту від пошкодження кишечника з подальшою позитивною регуляцією HO-1.

Інгаляційна терапія СО протягом 1год. (250ppm) на день була достатньою для попередження розвитку NEC. Захисна дія СО на даній моделі NEC на тваринах, ймовірно, є багатофакторною. Дані, наведені вище, показують, що введення СО приводить до зниження апоптозу клітин кишечника за даними забарвлення TUNEL в умовах *in vivo* і придушення індукованої TNF- $\alpha$ /ActD загибелі клітин IEC-6 в умовах *in vitro*. Лікування СО було також пов'язане зі зниженим продукуванням як системних, так і місцевих медіаторів запалення.

iNOS/NO пов'язані з ушкодженням слизової і порушенням бар'єра кишечника при запальному захворюванні кишечника, експериментальному ілеусі, ендотоксичному шоку і NEC. Наведені вище дані показують, що СО знижує позитивну регуляцію iNOS в умовах *in vitro* та *in vivo* на додаток до зменшення утворення нітрозотирозину *in vivo*. Пероксинітрид, який, як вважають, є реакційноздатною азотвмісною сполукою, що відповідає за ентероцитарну токсичність і апоптоз, взаємодіє з білками нітрування залишків тирозину. Вважають, що дана сполука утворюється при взаємодії NO і супероксиду. Опосередковуваний СО ентероцитарний захист може опосередковуватися придушенням позитивної регуляції iNOS, зниженням подальшого утворення NO і пероксинітриду.

Попередження розвитку NEC під дією СО може включати підтримку рухливості шлунково-кишкового тракту і профілактику невідповідної колонізації бактерій. Відомо, що змінена колонізація кишечника здійснює свій внесок у розвиток NEC.

На закінчення, у даному прикладі показано, що лікування СО протягом 1год. на день може захистити новонароджених щурят, які знаходяться на годуванні молочною сумішшю/в умовах гіпоксії, від розвитку експериментального NEC. Механізм включає придушення експресії iNOS і нітрування білків.

#### Приклад 2. Протокол лікування NEC

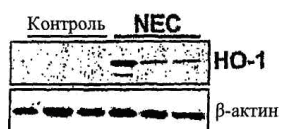
У наступному прикладі будуть наведені протоколи для застосування з метою лікування пацієнта, який страждає або має ризик розвитку NEC. У прикладі також наведені протоколи лікування пацієнтів до, під час і/або після хірургічних операцій, наприклад, хірургічної операції з приводу лікування NEC, наприклад, операції, в якій проводять резекцію частини кишечника. Фахівець у даній галузі, очевидно, розуміє, що будь-який протокол, описаний тут, можна адаптувати, базуючись на індивідуальних потребах пацієнта, і можна адаптувати для використання у поєднанні з будь-яким видом лікування NEC.

Лікування пацієнта СО можна починати у день встановлення діагнозу у пацієнта, як такого, який страждає NEC або станом, пов'язаним з NEC, або має будь-який фактор ризику, пов'язаний з підвищеною ймовірністю розвитку у пацієнта NEC. Пацієнти можуть піддаватися інгаляційному впливу СО у концентраціях у 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 переривом або постійно. СО можна вводити протягом приблизно 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 або 20 діб або більше діб, наприклад, протягом 1, 2, 3, 5 або 6 місяців, доки у пацієнта не будуть відсутніми симптоми NEC або доки не буде встановлено, що у пацієнта відсутній ризик розвитку NEC. У визначений день СО можна вводити постійно протягом всього дня або з переривом, наприклад, один вдих СО на день (коли використовують високу концентрацію) або протягом 23год. на день, наприклад, до 20, 15, 12, 10, 6, 3 або 2год. на день, або до 1год. на день.

Відносно введення СО у поєднанні з хірургічними втручаннями з приводу лікування NEC, то СО можна вводити системно або місцево пацієнту до, під час і/або після проведення хірургічної операції. Пацієнти можуть піддаватися інгаляційному впливу СО у концентраціях у 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 переривом або постійно протягом приблизно 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12; 14, 18 або 20 діб або більше діб перед операцією. Альтернативно або додатково СО можна вводити пацієнту під час операції, наприклад, інгаляцією і/або місцево. Альтернативно або додатково СО можна вводити пацієнту після операції, наприклад, починаючи відразу ж після закінчення операції і продовжувати 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 доки пацієнт більше не страждає, або відсутній ризик розвитку NEC після закінчення операції.

Описаний ряд варіантів винаходу. Проте, потрібно розуміти, що можуть бути зроблені різні модифікації, не відступаючи від суті і обсягу винаходу. Отже, інші варіанти знаходяться в обсязі наступної формули винаходу.

A.



B.

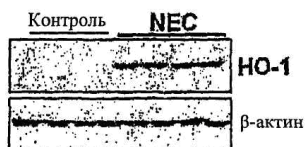


Fig. 1A-1B



Fig.2A-2D

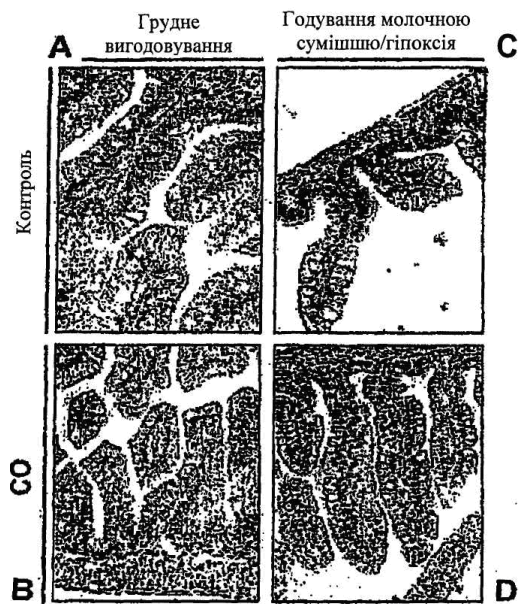


Fig.3A-3D

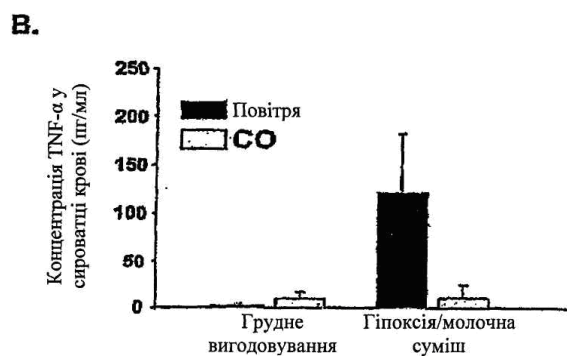
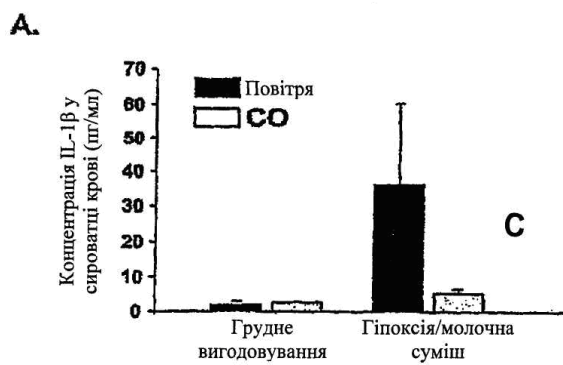
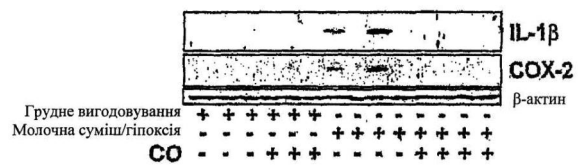
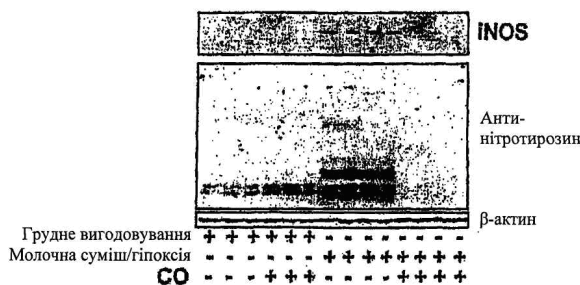


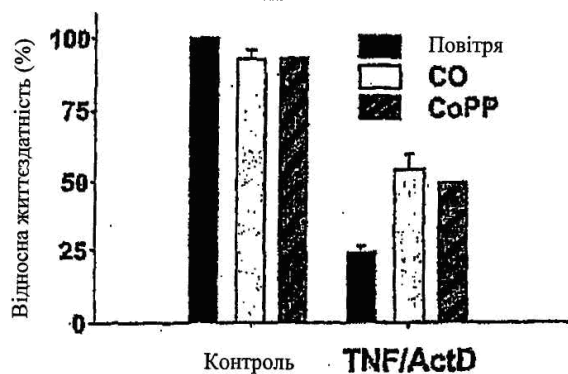
Fig.4A-4B



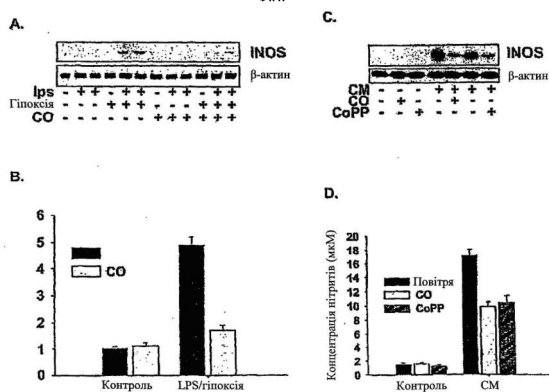
Фиг.5



Фиг.6



Фиг.7



Фиг.8A-D