

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.06.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.06.2001 29.11.2001
07.12.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/300289 2001/334340
2001/337974**
(33) Země priority: **US US US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 5/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/019687**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/000114**

(21) Číslo dokumentu:

2003-3448

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
A 61 K 33/08

(71) Přihlašovatel:

BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER,
INC., Boston, MA, US
YALE UNIVERSITY, New Haven, CT, US
GOSE Jeanne, Manchester-by-the-Sea, MA, US

(72) Původce:

Bach Fritz H., Manchester-by-the-Sea, MA, US
Tobiasch Edda M., Bonn, DE
Soares Miguel P., Lisboa, PT
Otterbein Leo E., New Kensington, PA, US
Gose Jeanne, Manchester-by-the-Sea, MA, US

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutická kompozice pro zlepšení
přežívání nebo funkce orgánů po transplantaci**

(57) Anotace:

Řešení se týká transplantací orgánů, tkání a individuálních buněk. Poskytuje kompozice pro uchování buněk in vitro a pro zlepšení přežití a/nebo funkce buněk po transplantaci. Podstatou je kompozice obsahující oxid uhelnatý, který je podáván v množství dostatečném ke zlepšení přežití a/nebo funkce buněk. Oxid uhelnatý zlepšuje přežívání tkání a orgánů po transplantaci a potlačuje apoptózu.

CZ 2003 - 3448 A3

2803-3448
12.03.04

07-3448

182 005/HK

- 1 -

Farmaceutická kompozice pro zlepšení přežívání nebo funkce orgánů po transplantaci

Tento vynález byl vytvořen s podporou Národních zdravotních ústavů (NIH) USA , a sice grantu č. HL 58688. Vláda má proto určitá práva vůči tomuto vynálezu.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká oblasti zlepšování přežívání buněk, konkrétně přežívání orgánů při transplantaci.

Dosavadní stav techniky

Oxid uhelnatý (CO) je plyn, který je ve vysokých koncentracích jedovatý. Nicméně nedávno byla objevena jeho funkce jakožto důležité signalizační molekuly (Verma et al., Science 259: 381-384, 1993). Také se předpokládá, že oxid uhelnatý působí jako neuronová signální molekula („posel“) v mozku a také jako neuroendokrinní modulátor v hypothalamu (Pozzoli et al., Endocrinology 735: 2314-2317, 1994). Podobně jako například oxid dusnatý (NO) je i oxid uhelnatý relaxans hladkého svalstva (Utzet al., Biochem Pharmacol. 47: 195-201, 1991, Christodoulides et al., Circulation 97: 2306-9, 1995) a inhibuje agregaci destiček (Mansouri et al., Thromb Haemost. 48: 286-8, 1982). Bylo ukázáno, že inhalace nízkých hladin CO mají protizánětlivé účinky u některých modelů.

Transplantace buněk (Langerhansových) ostrůvků je vhodná léčba ke zlepšení stavu při diabetu typu I (Lacy et al., Annu. Rev. Immunol., 2: 183-98, 1984, Weir et al., J. Am. Optom.

Assoc. 69: 727-32, 2000, Berney et al., Langenbechs Arch. Surg. 385: 378-8, 2000, Shapiro et al., NEngl. J. Med., 343: 230-8, 2000). Nicméně, postupy klinické transplantace ostrůvků jsou obtížné vzhledem k mnoha faktorům. Jedním z faktorů je primární nefunkčnost (PNF) štěpu. Dalším faktorem je potřeba vysokého počtu dárcovských ostrůvků, které jsou potřebné pro úspěšné překonání diabetu (Shapiro et al., N Engl. J. Med., 343: 230-8, 2000). Obě situace reflektují stejnou patofyziologii: podstatná ztráta buněk štěpu v první týdnech po transplantaci. Po transplantaci ostrůvky trpí celou řadou stresových faktorů, jako je například hypoxie předtím, než dojde k sekundární vaskularizaci (Carlsson et al., Diabetes 47: 1027-32, 1998), a působení pro-zánětlivým cytokinů, a také volných radikálů uvolňovaných z makrofágů v mikroprostředí transplantátu (Rabinovitch et al., Diabetes 48: 1223-9, 1999, Kaufman et al., J Exp Med. 772: 291-302, 1990, Corbett et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 1731-5, 1993) a makrofágů usazených v ostrůvkách (Mandrup-Poulsen et al., J. Immunol. 739: 4077-82, 1987, Arnush et al., J. Clin Invest. 702: 516-26, 1998). Toxické účinky imunosupresivních léků a také rejekce (Weir et al., Diabetes 46: 1247-56, 1997) přispívají též ke ztrátě buněk z ostrůvků. Existence PNF po experimentální syngenní transplantaci ostrůvků (Nagata et al., Transplant Proc. 22: 855-6, 1990, Arita et al., Transplantation 65: 1429-33, 1998) ukazuje, že nespecifický zánět hraje hlavní úlohu v tomto scénáři.

Má se za to, že přežití transplantovaného orgánu je hlavně závislé na úspěchu imunosuprese, ve smyslu zablokování imunitní reakce, která vede k rejekci štěpu. Nicméně, již dříve bylo ukázáno, že transplantované orgány se mohou chránit před vaskulárním poškozením vedoucím k rejekci prostřednictvím exprese "protektivních genů" (viz např. Bach et al., Nature

Med. 3: 196-202, 1997, and Soares et al., Nature Med. 4: 1073-1077, 1998). Jeden takový gen, hemoxygenáza-1 (HO-1), přeměňuje hem na biliverdin, volné železo a CO (Tenhunen et al., Proc Natl Acad Sci USA 61: 748-755, 1968).

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je zčásti založen na pozorování, že CO podporuje přežívání a/nebo funkce individuálních transplantátů (štěpů), ať jsou to orgány, tkáně nebo buňky.

V souladu s tím se jeden aspekt předkládaného vynálezu týká způsobu, kdy se podává dárci transplantátu farmaceutická kompozice, která obsahuje oxid uhelnatý, získá se orgán, tkáň nebo buňky od dárce a orgán, tkáň nebo buňky se transplantují příjemci, přičemž množství oxidu uhelnatého podané dárci je dostatečné k tomu, aby zlepšilo přežití nebo funkce orgánu, tkáně nebo buněk po transplantaci do příjemce.

Farmaceutická kompozice může být podávána živému dárci, dárci po klinické smrti nebo dárci před a následně po klinické smrti.

Volitelně, orgán může být podroben působení farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý *in situ* v dárci a/nebo *ex vivo* (mimo dárce).

Způsob podle vynálezu může také nebo alternativně zahrnovat krok podávání příjemci druhé farmaceutické kompozice, která obsahuje oxid uhelnatý, před a/nebo během a/nebo po kroku transplantace orgánu nebo tkáně do příjemce.

V tomto nebo kterémkoliv dalším způsobu popsaném

v předkládané přihlášce orgán nebo tkáň mohou být kterýkoliv orgán nebo tkáň, které mohou být transplantovány, jako jsou např. játra, ledvina, srdce, slinivka, plíce, tenké střevo, a/nebo kůže, přičemž dárce může být odlišný biologický druh než příjemce nebo dárce a příjemce mohou být stejného biologického druhu. Dárce a příjemce mohou oba být zvířata s výjimkou lidí nebo lidé. Jinak dárce může být např. zvíře s výjimkou člověka, jako například prase, a příjemce může být člověk.

V dalším aspektu vynález poskytuje způsob transplantace orgánu, tkáně nebo buňky, který zahrnuje kroky poskytnutí orgánu, tkáně nebo buňky dárce, podávání *ex vivo* nebo *in situ* farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý do orgánu, tkáně nebo buňkám a transplantaci orgánu, tkáně nebo buněk do příjemce, přičemž množství oxidu uhelnatého je dostatečné ke zlepšení přežití nebo funkce orgánu, tkáně nebo buněk v příjemci. V jednom provedení je farmaceutická kompozice podáván tím, že se perfunduje orgán nebo tkáň *in situ*, přičemž orgán nebo tkáň je v dárce.

Volitelně, způsob může zahrnovat krok podávání příjemci druhé farmaceutické kompozice obsahujícího oxid uhelnatý předtím a/nebo během a/nebo po transplantaci orgánu nebo tkáně do příjemce.

V dalším aspektu vynález poskytuje způsob transplantace orgánu, tkáně nebo buněk, který zahrnuje kroky, kdy se poskytne orgán, tkáň nebo buňky dárce, transplantuje se orgán, tkáň nebo buňky do příjemce a předtím a/nebo během a/nebo po kroku transplantace orgánu, tkáně nebo buňky do příjemce, se podává příjemci množství farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý dostatečné ke zlepšení přežití a/nebo funkce transplantovaného orgánu, tkáně nebo buněk v příjemci.

V jednom provedení farmaceutická kompozice může být podávána příjemci během 0 až 20 dnů, např. během 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 nebo 20 dnů po té, co byl orgán transplantován do příjemce. V dalším provedení je farmaceutická kompozice podávána příjemci alespoň jednou, např. mnohokrát nebo nepřetržitě, od okamžiku, který začíná 21 dnů po kroku transplantace orgánu nebo tkáně do příjemce po tak dlouho, dokud je to potřeba pro zajištění přežití štěpu. Farmaceutická kompozice může být podávána příjemci po zjištění toho, že transplantovaný orgán nebo tkáň je odvrhován nebo se chystá odvržení (rejekce), tj. jde např. o chronickou rejekci nebo akutní rejekci.

Volitelně způsob může dále zahrnovat krok podávání dárce druhé farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý předtím, než získá orgán, tkáň nebo buňky od dárce. Druhá farmaceutická kompozice může být podávána živému dárce nebo dárce se stanovenou klinickou smrtí.

Způsob může zahrnovat krok podávání do orgánu druhé farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý *in situ* v dárce a/nebo *ex vivo*.

V dalším aspektu vynález poskytuje způsob zlepšení přežití a/nebo funkce orgánu, tkáně nebo buněk dárce, který zahrnuje poskytnutí orgánu, tkáně nebo buněk od mezního dárce a vystavení orgánu, tkáně nebo buněk působení množství farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý dostatečného ke zlepšení přežití a/nebo funkce orgánu, tkáně nebo buněk dárce.

V dalším aspektu vynález poskytuje způsob uchovávání živočišných buněk *in vitro*, který zahrnuje poskytnutí nádoby obsahující tlakový plyn, který obsahuje plynný oxid uhelnatý, poskytnutí izolovaných buněk *in vitro*, kde buňka je primární

buňka nebo kmenová buňka, uvolňování tlakového plynu z nádoby za vzniku atmosféry, která obsahuje oxid uhelnatý, a uchování živočišných buněk *in vitro* v přítomnosti atmosféry, která obsahuje oxid uhelnatý.

Je-li to potřeba, buňky pak mohou být transplantovány do příjemce. Buňky mohou být získány z dárce, který není příjemcem, nebo mohou být získány z příjemce. A dále kompozice obsahující oxid uhelnatý může být podávána příjemci před, a/nebo během, a/nebo po transplantačním kroku. Tato kompozice je typicky ve formě inhalovaného plynu.

V dalším provedení vynálezu jsou živočišné buňky získány od dárce způsobem, který zahrnuje podávání kompozice obsahující oxid uhelnatý dárci a získání buněk nebo tkáně z dárce.

Vynález také poskytuje způsob *in vitro* uchovávání živočišných buněk, který zahrnuje poskytnutí kultivačního média obsahujícího účinné množství oxid uhelnatého, například alespoň 0,0001 g CO/100 g média, a uchování izolovaných buněk v médiu. Médium může obsahovat například alespoň 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, 0,0042 nebo 0,0044 g CO/100 g média.

Dále vynález poskytuje způsob zlepšení přežívání živočišných buněk po vyjmutí z těla dárce, který zahrnuje krok, kdy se podává živému dárci nebo dárci s prokázanou klinickou smrtí farmaceutická kompozice obsahující oxid uhelnatý a krok získání izolovaných buněk z dárce. Farmaceutická kompozice může být například podávána ve formě tlakového plynu vhodného k inhalaci dárcem.

Způsob může dále zahrnovat krok uchovávání buněk *in vitro*

v přítomnosti druhé kompozice obsahující oxid uhelnatý.

Buňky mohou být *in vitro* uchovávány v kapalném médiu. V takovém případě krok, kdy jsou buňky vystaveny působení druhé kompozice obsahující oxid uhelnatý, může být prováděn tak, že se poskytne zdroj tlakového plynného oxidu uhelnatého a kapalně médium se přivede do kontaktu s oxidem uhelnatým uvolňovaným ze zdroje. Kapalně médium samotné může také být poskytnuto ve formě kompozice obsahující oxid uhelnatý, tj. média s oxidem uhelnatým v něm rozpuštěným.

Dále vynález poskytuje způsob transplantace živočišných buněk, který zahrnuje kroky podávání živému dárci nebo dárci s prokázanou klinickou smrtí farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý, získání izolovaných buněk z dárce a transplantování buněk do příjemce. Živočišné buňky mohou být získány z dárce, který není příjemcem, nebo mohou být získány z příjemce. Je-li to třeba, kompozice obsahující oxid uhelnatý může být podávána příjemci před a/nebo během a/nebo po kroku transplantace.

Vynález také poskytuje způsob zlepšení přežití nebo funkce živočišné buňky transplantované do příjemce, který zahrnuje kroky transplantování živočišné buňky do příjemce a předtím, během, a/nebo po transplantaci krok, kdy se přiměje příjemce, aby inhaloval množství plynného oxidu uhelnatého, které je dostatečné ke zlepšení přežití nebo funkce transplantované buňky v příjemci. Oxid uhelnatý může být podáván ve formě nádoby obsahující tlakový plyn, který obsahuje oxid uhelnatý. V jednom provedení jsou buňky uchovávány *in vitro* v atmosféře obsahující oxid uhelnatý před transplantačním krokem. Například živočišné buňky mohou být uchovávány v kapalném médiu, které obsahuje alespoň 0,0001 g oxidu uhelnatého/100 g média (např. alespoň přibližně 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, 0,0042 nebo 0,0044 g CO/100 g média).

Způsob může volitelně zahrnovat krok ex vivo vystavení buněk působení kompozice obsahující oxid uhelnatý, a to před transplantačním krokem.

Oxid uhelnatý může být podáván příjemci před a/nebo během a/nebo po transplantačním kroku. Živočišné buňky mohou být získány z dárce, který není příjemcem, nebo mohou být získány z příjemce. Farmaceutická kompozice obsahující oxid uhelnatý může být podávána dárce před a/nebo během odebrání buněk z dárce.

V dalším aspektu vynález poskytuje způsob zlepšení přežití transplantované buňky v příjemci, který zahrnuje podávání příjemci, a sice před a/nebo během a/nebo po transplantaci buňky příjemci, účinného množství farmaceutické kompozice obsahující plynný oxid uhelnatý.

Ve kterémkoliv výše popsaném způsobu podle vynálezu může být účinek na přežívání zesílen indukcí enzymu hemoxxygenázy-1 (HO-1) u dárce nebo příjemce, např. indukcí hemem, těžkými kovy, cytokiny, hormony, oxidem dusičným, endotoxiny, UV zářením nebo depletory glutathionu, nebo prostřednictvím tepelného šoku. U dárce může dojít k takové indukci před nebo během odstranění orgánu, tkáně nebo buněk. U příjemce může dojít k takové indukci před, během nebo následně po transplantaci. Jinak může být enzym indukován v orgánu, tkáni nebo buňkách ex vivo, před transplantací do příjemce.

Vynález dále poskytuje výrobek, který obsahuje nádobu obsahující tlakový plyn, který obsahuje alespoň 0,001 ppm, např. alespoň přibližně 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 2000, 5000, 10 000, 100 000, 200 000, 300 000, 400

000, 500 000 a více, až do 1 000 000 ppm oxidu uhelnatého, a štítek (nálepku nebo jiné označení) popisující použití plynu ke zlepšení přežívání izolovaných živočišných buněk, tkáně nebo ostrůvků před, během nebo po transplantaci buněk, tkáně nebo ostrůvků do pacienta.

Do rozsahu vynálezu dále spadá sterilní médium pro buňky, které obsahuje živiny vhodné pro uchovávání živočišných buněk v kultuře a alespoň přibližně 0,0001 g oxidu uhelnatého/100 g média, např. alespoň 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, 0,0042 nebo 0,0044 g CO/100 g média. Médium může také obsahovat živočišné buňky.

Vynález poskytuje také způsob uchovávání živočišných buněk *in vitro* a jejich následné transplantace. Způsob zahrnuje kroky, kdy se poskytne nádoba obsahující tlakový plyn obsahující oxid uhelnatý, poskytnou se izolované živočišné buňky *in vitro*, přičemž buňky jsou umístěny v médiu, které obsahuje rozpuštěný oxid uhelnatý, uvolňování tlakového plynu z nádoby, čímž vzniká atmosféra obsahující oxid uhelnatý, udržování buněk v přítomnosti této atmosféry a transplantování buněk do příjemce.

V kterémkoliv z výše popsaných aspektů nebo provedení vynálezu buňky mohou být jakékoliv buňky. Například buňky mohou být živočišné buňky jako například primární nebo sekundární buňky nebo buňky z buněčné linie. Dalším příkladem buňky mohou být buňky tvořící pankreatické ostrůvky, např. β -buňky. Buňky mohou také být např. jaterní buňky, fibroblasty, buňky kostní dřeně, nervové buňky, myocyty, lymfocyty nebo kmenové buňky. V každém ze způsobů *ex vivo* podle vynálezu tkáň je výhodně jiná tkáň než krev a obsahuje

jen málo plné krve, pokud vůbec nějakou, a buňky jsou výhodně jiné buňky než červené krvinky, a nejsou ani doprovázeny významným množstvím červených krvinek.

Není-li výslovně uvedeno jinak, pak všechny technické a vědecké termíny použité v tomto textu mají stejný význam, jak mu obecně rozumí průměrný odborník z oblasti, do které předkládaný vynález spadá.

Ačkoli způsoby a materiály podobné nebo ekvivalentní těm, které byly popsány v předkládaném textu, mohou být použity při realizaci nebo testování předkládaného vynálezu, výhodné způsoby a materiály jsou popsány níže. Všechny publikace, patentové přihlášky, patenty a další literární odkazy uvedené v tomto textu jsou tímto v plném znění zahrnuty formou odkazu. V případě konfliktu je rozhodný předložený popis, včetně definic. Materiály, způsoby a příklady jsou pouze ilustrativní a rozsah vynálezu nijak neomezuje.

Další rysy a výhody vynálezu budou objasněny pomocí následujícího podrobného popisu s připojenými obrázky a patentovými nároky.

Popis obrázků

Obr. 1A je sloupcový graf (histogram), který ukazuje účinek působení zvyšující se koncentrace TNF- α na β TC3 buňky.

Obr. 1B je graf ilustrující FACScan analýzu fragmentace DNA v β TC3 buňkách po ošetření TNF- α .

Obr. 1C je sloupcový graf, který ukazuje účinek kotransfekce β TC3 vektorem (pcDNA3/ β -gal) exprimujícím β -gal

a kontrolním vektorem (pcDNA3), a ošetření buďto inhibitorem kaspázy-3 Z-DEVD-FMK (C3-i) nebo inhibitorem kaspázy-8 IETD-CHO (C8-i). Šedé sloupce představují neošetřené β -buňky černé sloupce představují β -buňky podrobené působení TNF- α po dobu 24 hodin. Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraná z jednoho ze tří opakování experimentu.

Obr. 2A je sloupcový graf (histogram) ukazující, že exogenní oxid uhelnatý může nahradit HO-1 (hemoxxygenázu-1), když je HO-1 aktivita zablokována. Šedé sloupky představují neošetřené buňky a černé sloupky představují β -buňky podrobené působení TNF- α nebo etoposidu nebo podrobené sérové deprivaci. Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybrané z jednoho ze tří opakování experimentu.

Obr. 2B je grafickou reprezentací FACScan analýzy DNA fragmentace v β TC3 buňkách po 24 hodinách podávání oxidu uhelnatého po ošetření TNF- α .

Obr. 2C je sloupcový graf ilustrující, že exogenní oxid uhelnatý chrání β -buňky před apoptózou v nepřítomnosti HO-1. β TC3 buňky byly transfekované vektory exprimujícími β -gal a byly vystaveny působení exogenního oxidu uhelnatého. Šedé sloupce představují neošetřené β -buňky a černé sloupce představují β -buňky podrobené působení TNF- α nebo etoposidu nebo podrobené sérové deprivaci, jak je uvedeno. Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraných z jednoho ze tří opakování experimentu.

Obr. 3 je FACScan analýza DNA fragmentace, která ukazuje, že exogenní oxid uhelnatý chrání myší Langerhansovy ostrůvky od apoptózy. CHX = cykloheximid.

Obr. 4A je sloupcový graf ilustrující, že anti-apoptotický účinek exogenního oxidu uhelnatého je zprostředkován aktivací guanylátcyklázy. ODQ = inhibitor guanylylcyklázy ODQ.

Obr. 4B je sloupcový graf ilustrující, že cGMP analog může náhradit oxid uhelnatý při ochraně buněk před apoptózou. 8-Br-cGMP = cGMP analog 8-Br-cGMP.

Obr. 4C je sloupcový graf ilustrující, že cGMP-závislá proteinkináza (cGK) zprostředkovává anti-apoptotický účinek oxidu uhelnatého. β TC3 buňky byly kotransfekovány vektorem exprimujícím β -gal. Pro Obr. 4A-C šedé sloupce představují neošetřené β -buňky a černé sloupce představují β -buňky podrobené působení TNF- α . Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraných z jednoho ze tří opakování experimentu. KT = inhibitor proteinkinázy G KT5823.

Obr. 5A sloupcový graf ukazující, že expozice oxidu uhelnatému v délce jedné hodiny je dostatečná pro zabránění apoptózy.

Obr. 5B je sloupcový graf ukazující, že který oxid uhelnatý chrání β -buňky po indukci apoptózy.

Obr. 5C sloupcový graf ukazující, že preinkubace s oxidem uhelnatým zabraňuje apoptóze β -buněk. Pro obr. 5A-C šedé sloupce představují neošetřené β -buňky a černé sloupce představují β -buňky podrobené působení TNF- α . Výsledky jsou

ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraných z jednoho ze tří opakování experimentu.

Obr. 6A je čárový graf ukazující, že expozice myších Langerhansových ostrůvků oxidu uhelnatému zlepšuje přežití a funkci po transplantaci.

Obr. 6B je čárový graf ukazující pravděpodobnost zotavení (glykémie nižší než 200 mg/dl) u zvířat, která dostala Langerhansovy ostrůvky pre-exponované oxidu uhelnatému nebo dostala kontrolní ostrůvky. *P = 0,001 proti kontrole.

Obr. 7 je sloupcový graf, který ukazuje expresi HO-1 v myší srdcích transplantovaných do laboratorních potkanů, kterým byl podán CVF plus CsA. Myší srdce byla transplantována do laboratorní potkanů podrobených působení faktoru kobřího jedu (CVF) v okamžiku transplantace a po transplantaci dennímu podávání cyklosporinu A (CsA). Exprese mRNA HO-1 a β -aktinu byla detekována pomocí RT-PCR. Symbol -/- označuje RNA z HO-1 -/- myšího srdce použitou jako negativní kontrola. Sloupce představují relativní hladiny exprimované mRNA HO-1 normalizované vzhledem k expresi mRNA β -aktinu.

Obr. 8 je soubor sloupcových grafů ilustrující, že SnPPIX inhibuje *in vivo* enzymatickou aktivitu HO-1. Myší srdce byla transplantována do neošetřených laboratorních potkanů (II) nebo do laboratorních potkanů podrobených působení CVF a CsA (III) plus FePPIX (IV) nebo SnPPIX (V). Celková HO aktivita srdce dárce a srdce příjemce byla měřena 2 dny po transplantaci a srovnána s bazální HO aktivitou srdce normální

myši a laboratorního potkana, v daném pořadí (I). Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka (SD) ze tří zvířat analyzovaných pro každou léčbu. Statistické rozborů byly provedeny s použitím nepárového Welshova t-testu.

Obr. 9 je soubor čárových grafů ilustrující, že SnPPIX a FePPIX neinterferují s vytvářením protilátek (Ab) proti štěpu. Myší srdce byla transplantována do laboratorní potkana podrobeného působení CVF a CsA, jak bylo popsáno výše. Sérové hladiny protištěpových IgM Abs byly vyhodnoceny ELISA testem s celými buňkami (buněčná ELISA). Vazba složky komplementu C3 laboratorního potkana na myší endotelové buňky byla vyhodnocena ELISA testem s buňkami. Hemolytická aktivita komplementu (CH50) byl vyhodnocena standardním hemolytickým testem. Výsledky jsou ukázány jako průměr $\pm$ SD ($n = 3$).

Obr. 10A je soubor sloupcových grafů ilustrujících, že exogenní CO neovlivňuje schopnost SnPPIX potlačovat enzymatickou aktivitu HO-1. Myší srdce byla transplantována do laboratorních potkanů podrobených působení CVF a CsA s SnPPIX (II) nebo SNPPIX a CO(III). Celková HO aktivita byla měřena v srdci dárce a příjemce a také v játrech příjemce 2 dny po transplantaci. HO aktivita v různých vzorcích byla srovnána s bazální HO aktivitou v srdcích normálních myší (I), srdcích (I) nebo játrech (I) laboratorního potkana, podle toho, jaký vzorek byl analyzován. Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\pm$ SD ze tří zvířat analyzovaných pro každou léčbu. Statistické rozborů byly provedeny s použitím nepárového Welshova t-testu.

Obr. 10B je sloupcový graf, který ukazuje, že exogenní CO neovlivňuje schopnost SnPPIX potlačovat HO-1 aktivitu. Zvířata

použitá v pokusech pro získání dat na Obr. 10 A byla analyzována na obsah karboxyhemoglobinu 2 dny po transplantaci. Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\pm$ SD (N = 3).

Obr 11 je čárový graf ilustrující, že up-regulace HO-1 v endotelových buňkách inhibuje aktivaci destiček. Myši 2F-2B endotelové buňky byly ponechány neošetřené (NT) nebo byly podrobeny působení CoPPIX (50 μ M, 16 hodin) pro up-regulaci HO-1 aktivity, SnPPIX pro potlačení HO-1 aktivity (50 μ M, 16 hodin) nebo CoPPIX (50 μ M, 12 hodin) společně s SnPPIX (50 μ M, 4 hodiny) pro kontrolu specifity CoPPIX v up-regulaci HO-1 aktivity. Krevní destičky laboratorních potkanů byly izolovány, převrstveny přes myši endotelové buňky na 5 minut a testována na agregaci po stimulaci 2 μ M adenosindifosfátem (ADP).

Obr. 12 je sloupcový grafo ilustrující, že oxid uhelnatý potlačuje apoptózu endotelových buněk. Šedé sloupce představují buňky podrobené působení ActD samotného, černé sloupečky představují buňky podroben působení ActD společně s TNF- α . Kde je to označeno, endotelové buňky byly podrobeny působení SnPPIX (50 μ M 50) a exponovány exogennímu CO (10000 ppm).

Podrobný popis

Termín "oxid uhelnatý " (nebo "CO"), jak se v tomto textu používá, označuje molekulární oxid uhelnatý v plynném stavu, oxid uhelnatý stlačený do kapalné formy nebo rozpuštěný ve vodném roztoku.

Termíny "kompozice obsahující oxid uhelnatý" a

"farmaceutická kompozice obsahující oxid uhelnatý" jsou použity v tomto textu tak, že označují plynou, kapalnou, tuhou nebo polotuhou kompozici nebo přípravek obsahující oxid uhelnatý, které mohou být podávány pacientovi-dárce, kadaveru (mrtvole) nebo zvířeti, do orgánu nebo do části orgánu, např. tkáně z orgánu nebo individuálních buněk nebo buňky, které tvoří orgán, jako jsou např. neurony, hepatocyty, myocyty, celé ostrůvky nebo buňky ostrůvků jako například pankreatické β -bunky. Odborník snadno rozpozná, která forma farmaceutické kompozice (přípravku), např. plyná, kapalná nebo společně plyná a kapalná forma, je vhodná pro podávání při konkrétní aplikaci.

Termíny "účinné množství" a "účinné pro léčení", jak jsou použity v tomto textu, se týkají množství nebo koncentrace oxidu uhelnatého, které se podává po určitou dobu (včetně akutního nebo chronického podávání a periodického nebo kontinuálního podávání), přičemž je účinné v kontextu tohoto podávání pro způsobení zamýšleného účinku nebo fyziologického výsledku. Účinné množství oxidu uhelnatého pro použití podle předkládaného vynálezu zahrnuje například taková množství, která jsou účinná pro zlepšení přežití a/nebo zlepšení funkce orgánů nebo buněk *in vivo* a/nebo *in vitro*.

V kontextu transplantace individuálních buněk nebo shluků buněk, např. transplantačního dárce a/nebo příjemce, účinné množství oxidu uhelnatého je množství, které se podává transplantačnímu dárci a/nebo příjemci a je dostatečné ke zlepšení přežití buněk nebo shluků buněk, např. tím, že snižuje ztráty buněk nebo shluků buněk a/nebo zlepšuje funkční výkony transplantovaných buněk nebo shluků buněk. V kontextu ošetřování buněk vně organismu, např. buněk ostrůvků, které se mají kultivovat a/nebo použít pro transplantaci, účinné

množství oxidu uhelnatého je množství, se kterým jsou buňky inkubovány nebo uchovávány, aby se zlepšila konzervace buněk a/nebo snížily ztráty buněk, např. ztráty způsobené apoptózou, a/nebo zlepšily funkce buněk. V kontextu transplantace orgánů a tkání, např. transplantačního dárce a/nebo příjemce, účinné množství oxidu uhelnatého je množství, které se podává transplantačnímu dárci a/nebo příjemci a je dostatečné ke zlepšení přežití orgánu, tkání nebo buněk, např. snížením ztrát buněk, ze kterých je orgán nebo tkáň složen, a/nebo zlepšením funkčního výkonu orgánu. V kontextu ošetření orgánů, tkání nebo buněk ex vivo, které mají být uchovány nebo použity pro transplantaci, účinné množství oxidu uhelnatého je množství dostatečné ke zlepšení přežití a/nebo funkce orgánu nebo tkání.

Termín "inhibice", jak se v tomto textu používá, zahrnuje zpoždění nástupu či počátku, redukci, prevenci nebo zeslabení biologického procesu, např. apoptózy.

Pro plyny, účinné množství oxidu uhelnatého obecně spadá do rozsahu přibližně 0,0000001 % až přibližně 0,3 % (hmotn.), např. 0,0001 % až 0,25 % (hmotn.), výhodně alespoň přibližně 0,001 %, např., alespoň 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 % nebo 0,24 % (hmotn.) oxidu uhelnatého.

Výhodný rozsah oxidu uhelnatého zahrnuje přibližně 0,001 % až přibližně 0,24 %, přibližně 0,005 % až přibližně 0,22 %, přibližně 0,01 % až přibližně 0,20 % a přibližně 0,01 % až přibližně 0,1 % (hmotn.). Další výhodné rozsahy zahrnují přibližně 0,005 % až přibližně 0,24 %, přibližně 0,01 % až přibližně 0,22 %, přibližně 0,015 % až přibližně 0,20 % a přibližně 0,025 % až přibližně 0,1 % (hmotn.).

Pro kapalně roztoky CO účinné množství obecně spadá do

rozsahu přibližně 0,0001 až přibližně 0,0044 g CO/100 g kapaliny, např. alespoň 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 nebo 0,0042 g CO/100 g vodného roztoku. Výhodné rozsahy zahrnují např. přibližně 0,0010 až přibližně 0,0030 g CO/100 g kapaliny, přibližně 0,0015 až přibližně 0,0026 g CO/100 g kapaliny, nebo přibližně 0,0018 až přibližně 0,0024 g CO/100 g kapaliny. Odborníkovi je zřejmé, že i množství mimo uvedené rozsahy mohou být použita, a sice v závislosti na aplikaci.

Termín "pacient" je použit v předkládaném popisu k označení zvířete s výjimkou člověka nebo člověka, na kterého je aplikován přípravek podle vynálezu, případně jsou užity způsoby podle vynálezu. Veterinární aplikace jsou jasně předvídaný podle předkládaného vynálezu. Termín tudíž zahrnuje, avšak tento výčet není omezující, ptáky, plazy, obojživelníky a savce, např. lidi, další primáty, prasata, hlodavce jako například myši a laboratorní potkany, králíky, morčata, křečky, krávy, koně, kočky, psy, ovce a kozy.

Termín "dárce" nebo "pacient-dárce", jak se v tomto textu používá, se týká živočicha (člověka nebo jiného než člověka), ze kterého mohou být získány orgány, tkáně nebo individuální buňky pro účely uchování a/nebo transplantace do příjemce (pacienta-příjemce). Termín "příjemce" nebo "pacient-příjemce" se týká živočicha (člověka nebo jiného než člověka), do kterého mohou být přeneseny orgán, tkáň nebo shluk buněk nebo individuální buňky.

Termín "diabetes" je obecný termín označující diabetické chorobné stavy jak jsou známy v oboru, např. *diabetes mellitus*. *Diabetes mellitus* je charakterizován neschopností

regulovat hladinu glykémie. Dva nejběžnější typy diabetu jsou známy jako diabetes typu I a typu II. U diabetu typu I neboli diabetu závislého na inzulinu (IDDM), slinivka tvoří málo inzulinu nebo netvoří žádný inzulin, protože beta buňky tvořící inzulin byly zničeny. U typu II neboli diabetu nezávislém na inzulinu (NIDDM), slinivka tvoří inzulin, ale tento inzulin není účinný. Termín také zahrnuje celou řadu sekundárních chorobných stavů způsobených diabetem, jak akutních tak i chronických, jako jsou např. diabetické komplikace, např. hypoglykémie a hyperglykémie, retinopatie, angiopatie, neuropatie a nefropatie.

Termíny "buňka" nebo "živočišná buňka" nebo „buňka zvířete“, jak se v tomto textu používají, se týkají kterýkoliv typů živočišných buněk, včetně živočišných buněk vhodných pro transplantaci. Buňky jsou typicky primární buňky získané od živočišného dárce, ale mohou to být sekundární buňky nebo ekvivalentní buňky ze stabilní buněčné linie. Buňky mohou být případně transfekovány ex vivo expresním vektorem, který změní jejich funkci jistým způsobem. Buňky zahrnují, aniž by tento výčet byl omezující, např. buňky ostrůvků, např. buňky, které jsou částí pankreatických ostrůvků, jaterní buňky, fibroblasty, buňky kostní dřeně, myocyty a kmenové buňky a buňky (např. neurony) centrálního nervového systému včetně míchy. Termín "buňky ostrůvků" je použit v tomto textu jako obecný termín označující shluky buněk v pankreatu (slinivce) známé jako ostrůvky, např. Langerhansovy ostrůvky. Langerhansovy ostrůvky obsahují několik typů buněk, např. β -uňky (které tvoří inzulin), α -buňky (které tvoří glukagony), γ -buňky (které tvoří somatostatin), F-buňky (které tvoří pankreatický polypeptid), enterochromaffinní buňky (které tvoří serotonin), PP buňky a D1 buňky. Termín "kmenová buňka" je v oboru znám jako termín, který označuje buňky mající schopnost

se dělit po nekonečné období v kultuře, ze kterých pak vznikají specializované buňky. Tento termín zahrnuje například totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní kmenové buňky, např. nervové, jaterní, svalové a hemopoetické kmenové buňky.

Termín "izolovaná buňka" označuje buňku, která byla je odstraněna z tkáně nebo orgánu, kde se buňka (nebo její předchůdce) přirozeně vyskytuje. Buňky mohou být jen částečně purifikovány ze svého přírodního prostředí a být přitom považovány za "izolované". Například neporušený (intaktní) Langerhansův ostrůvek se považuje za ostrůvek tvořený "izolovanými" buňkami, jakmile je jednou Langerhansův ostrůvek vyjmut ze slinivky a může být fyzicky oddělen od dalších ostrůvků. Buňky neporušeného orgánu jako například ledviny nebo srdce nebo části orgánu, jako například krevní konzerva, nejsou považovány za "izolované buňky" dokud jsou stále částmi orgánů.

Termín "orgán" je použit v tomto textu jako obecný termín označující kteroukoliv anatomickou část nebo element mající specifickou funkci v těle zvířete. Dále tento termín zahrnuje podstatné části orgánů, např. pojivové tkáně získané z orgánu. Takové orgány zahrnují, aniž by výčet byl omezující, ledviny, játra, srdce, střevo, např. tlusté nebo tenké střevo, slinivku a plíce. Dále jsou zahrnuty v této definici kosti a krevní cévy, např. aortální transplantáty.

Termín "transplantace" je použit v předkládaném popisu jako obecný termín označující postup implantování orgánu, tkáně, shluku buněk nebo individuálních buněk do pacienta. Termín "transplantace" je definován v oboru jako přenos živých tkání nebo buněk od dárce do příjemce, s cílem udržet funkční integritu transplantované tkáně nebo buněk v příjemci (viz

např., The Merck Manual, Berkow, Fletcher, and Beers, Eds., Merck Research Laboratories, Rahway, N. J., 1992). Termín "buněčná transplantace" je použit v předkládaném popisu jako obecný termín označující postup přenesení alespoň jedné buňky, např. buňky ostrůvků, pacientovi. Například taková transplantace může být provedena tak, že se vyjmou β -buňky (nebo neporušené ostrůvky) ze slinivky dárce a vloží se do těla pacienta-příjemce, jehož slinivka nemůže produkovat dostatek inzulínu. Termíny zahrnují všechny kategorie transplantací známé v oboru, kromě transfúzí. Transplantace jsou roztrženy podle místa a genetického vztahu mezi dárce a příjemcem. Termín tedy zahrnuje např. autotransplantace (odebrání a přenos buněk nebo tkáně z jednoho místa do stejného nebo jiného místa téhož pacienta), allotransplantace (transplantace mezi členy stejného biologického druhu) a xenotransplantace (transplantace mezi členy různých biologických druhů).

Termíny "reakce orgánu" nebo "transplantační reakce" nebo jen "reakce", případně „odvržení“ nebo „odvržení orgánu“ a příslušné ekvivalenty jsou v oboru známy a jsou použity v předkládaném popisu jako obecný termín označující proces reakce/odvržení orgánu, tkáně nebo buňky u pacienta-příjemce. Zahrnuté podle definice jsou například tři hlavní typy reakce, které jsou obvykle identifikovány v klinické praxi: hyperakutní reakce, akutní reakce a chronická reakce (viz např., Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994).

Termíny "marginální dárce" a "marginální orgán" (případně "hraniční dárce" a "hraniční orgán") jsou použity v tomto textu jako obecný termín označující dárce nebo orgán s problémy, pro které jejich využití v transplantaci je horší

než optimální. Například hraniční dárce může být dárce, který je starší než 50 roků nebo který je postižen chronickým onemocněním, které může ovlivnit funkci štěpu, např. dárce trpící diabetem, HTA nebo abúzem alkoholu. Hraniční orgán je například (1) orgán z takového, tj. výše popsaného, dárce nebo (2) orgán, který prošel dlouhou dobou tepelné nebo chladové ischémie, nebo (3) orgán, který trpí anatomickou abnormalitou (např. malé a mnohočetné cévy, např. v ledvině), která může zkomplikovat vaskulární anastomózy (spojky), nebo orgán s výskytem aterosklerotických plátů v cévách.

Příprava plyných kompozic

Kompozice obsahující oxid uhelnatý může být plynná kompozice obsahující oxid uhelnatý. Stlačený nebo tlakový plyn užitečný ve způsobech podle vynálezu může být získán z kteréhokoliv komerční zdroje a ve kterémkoliv typu nádoby vhodné pro uchovávání kompozice ve formě stlačeného plynu. Například stlačené nebo tlakové (natlakované) plyny mohou být získány z kteréhokoliv zdroje, který dodává stlačené plyny, jako například kyslík, pro lékařské použití. Tlakový plyn včetně oxidu uhelnatého pro použití ve způsobech podle předkládaného vynálezu může být poskytnut tak, že všechny plyny požadované pro dosažení výsledné kompozice (např., CO a O₂ a volitelně N₂, He a/nebo CO₂) jsou smíchány v jedné společné nádobě. Je-li to třeba, způsoby podle předkládaného vynálezu mohou být prováděny s použitím většího počtu nádob obsahujících jednotlivé plyny. Například může být poskytnuta jedna nádoba, která obsahuje oxid uhelnatý, buďto s dalšími nebo bez dalších plynů, jejíž obsah může být podle potřeby míchán se vzduchem místnosti nebo s obsahem dalších nádob, např. nádob, které obsahují kyslík, dusík, oxid uhličitý,

stlačený vzduch nebo kterýkoliv další vhodný plyn nebo jejich směsi.

Plynné kompozice podávané pacientovi podle předkládaného vynálezu typicky obsahují 0 % až přibližně 79 % (hmotn.) dusíku, přibližně 21 % až přibližně 100 % (hmotn.) kyslíku a přibližně 0,0000001 % až přibližně 0,3 % (hmotn.) (což odpovídá přibližně 0,001 ppm (tj. 1 ppb) až přibližně 3 000 ppm) oxidu uhelnatého. Výhodně, množství dusíku v plynném přípravku je přibližně 79 % (hmotn.), množství kyslíku je přibližně 21 % (hmotn.) a množství oxidu uhelnatého je přibližně 0,0001 % až přibližně 0,25 % (hmotn.). Množství oxidu uhelnatého je výhodně alespoň přibližně 0,001 %, např. alespoň přibližně 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,08 %, 0,10 %, 0,15 %, 0,20 %, 0,22 % nebo 0,24 % hmotnostních. Výhodné rozsahy oxidu uhelnatého zahrnují přibližně 0,001 % až přibližně 0,24 %, přibližně 0,005 % až přibližně 0,22 %, přibližně 0,010 % až přibližně 0,20 % a přibližně 0,015 % až přibližně 0,1 % hmotnostních. Bylo zjištěno, že kompozice obsahující plynný oxid uhelnatý mající koncentraci oxidu uhelnatého vyšší než 0,3 % (jako například 1 % nebo větší) mohou být použity po krátkou dobu (jako je např. jeden nebo několik dechů), v závislosti na aplikaci. Jsou zejména užitečné pro ex vivo aplikace, kdy není riziko otravy oxidem uhelnatým. Když se plyn používá pro přípravu atmosféry pro kultivaci buněk in vitro, plyn může obsahovat také oxid uhličitý, což napomůže udržovat pH média. Oxid uhličitý může být přítomen např. v množství 1 % až 10 %, obecně 5 % hmotnostních.

Plynná kompozice obsahující oxid uhelnatý může být použita pro vytvoření atmosféry, která obsahuje plynný oxid uhelnatý. Atmosféra, která obsahuje vhodnou hladinu plynného oxidu

uhelnatého může být vytvořena například tak, že se poskytne nádoba obsahující tlakový plyn obsahující plynný oxid uhelnatý a uvolňuje se tlakový plyn z nádoby do komory nebo prostoru, a uvnitř této komory nebo prostoru vzniká atmosféra, která obsahuje plynný oxid uhelnatý. Jinak plyny mohou být uvolňovány do zařízení, které ústí do respirátoru nebo dýchací trubice, a které vytváří v respirátoru nebo dýchací trubici atmosféru obsahující plynný oxid uhelnatý, čímž je zajištěno, že pouze pacient je jediná osoba v místnosti, která ke vystavena významně vyšší hladině oxidu uhelnatého.

Hladiny oxidu uhelnatého v atmosféře nebo ve ventilačním (dýchacím) obvodu mohou být měřeny nebo sledovány s použitím jakéhokoli způsobu známého v oboru. Takové způsoby zahrnují elektrochemickou detekci, plynovou chromatografii, čítání pulzů radioizotopů, infračervenou absorpci, kolorimetrické a elektrochemické metody založené na selektivních membránách (viz např., Sunderman et al., Clin. Chem. 28: 2026-2032, 1982, Ingi et al., Neuron 16: 835-842, 1996). Koncentrace oxidu uhelnatého nižší než řádu ppm (milióntiny) mohou být detekovány např. užitím plynové chromatografie a detekce radioizotopů.

Dále je v oboru známo, že hladiny oxidu uhelnatého nižší než v rozsahu ppm mohou být měřeny v biologických tkáních miniaturním infračerveným senzorem plynu („midinfrared gas sensor“, viz např., Morimoto et al., Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol 280: H482-H488, 2001). Senzory pro detekci plynného oxidu uhelnatého a jiná zařízení pro detekci plynů jsou běžně dostupná z mnoha komerčních zdrojů.

Příprava tekutých kompozic

Kompozice obsahující oxid uhelnatý může také být kapalná

kompozice obsahující oxid uhelnatý. Kapalina může být přeměna na kompozici obsahující oxid uhelnatý kterýmkoliv způsobem známým v oboru pro to, aby byly plyny rozpuštěny v kapalinách. Tak například kapalina může být umístěna v tzv. "CO₂ inkubátoru" a vystavena kontinuálnímu průtoku oxid uhelnatého až do té doby, kdy je dosažena požadovaná koncentrace oxidu uhelnatého v kapalině. Dalším příkladem může být postup, kdy je plynný oxid uhelnatý "probubláván" přímo kapalinou až do té doby, kdy je dosažena požadovaná koncentrace oxidu uhelnatého v kapalině. Množství oxidu uhelnatého, které může být rozpuštěno v daném vodném roztok se zvyšuje s klesající teplotou. Ještě dalším příkladem je postup, kdy vhodná kapalina prochází trubičkami nebo hadičkami, které umožňují difúzi plynu, kdy trubičky nebo hadičky procházejí prostředím obsahujícím oxid uhelnatý (např. při použití zařízení jako je například mimotělní membránové okysličovací zařízení). Oxid uhelnatý tak difunduje do kapaliny a vytváří kapalnou kompozici obsahující oxid uhelnatý.

Kapalina může být jakákoliv kapalina odborníkům známá, která je vhodná pro podávání pacientům (viz například Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994) nebo pro uchovávání orgánů, tkání nebo buněk ex vivo. Obecně kapalina je vodný roztok. K příkladům vhodných vodných roztoků patří fyziologický roztok pufrovaný fosfáty (PBS), roztok Celsior™, roztok Perfadex™, Collinsův roztok, citrátový roztok a roztok podle Wisconsinské Univerzity (UW roztok) (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994). Kapalně kompozice mohou obsahovat oxid uhelnatý v koncentraci v rozsahu přibližně 0,0001 až přibližně 0,0044 g CO/100 g kapaliny, např. alespoň 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 nebo 0,0042 g CO/100 g vodného roztoku. Výhodné rozsahy zahrnují např. přibližně 0,0010 až přibližně 0,0030 g CO/100 g kapaliny, přibližně 0,0015 až přibližně 0,0026 g CO/100 g kapaliny nebo přibližně 0,0018 až přibližně 0,0024 g CO/100 g kapaliny. Pro vodu při 0 °C je saturační koncentrace přibližně 0,0044 g CO/100 g média.

Kterákoliv vhodná kapalina může být saturována na nastavenou koncentraci oxidu uhelnatého prostřednictvím plynových difuzérů. Jinak mohou být použity předem připravené roztoky, které prošly kontrolou kvality pokud jde o nastavenou hladinu oxidu uhelnatého. Přesná kontrola dávky může být prováděna prostřednictvím měření pomocí membrány, která je propustná pro plyn a nepropustná pro kapalinu, a která je připojena k analyzátoru oxidu uhelnatého. Roztoky mohou být saturovány až na požadované účinné koncentrace a udržovány na této hladině. Jak u kapalných tak i plyných kompozic přimísení inertního plynu hélia může zlepšit podání oxidu uhelnatého do tkání/orgánu.

Léčení pacientů pomocí kompozice obsahují oxid uhelnatý

Předkládaný vynález předpokládá použití kompozice obsahující oxid uhelnatý k ošetřování dárců a příjemců a k ošetřování orgánů, tkání, shluků buněk a/nebo individuálních buněk ve kterémkoliv z kroků z celého postupu odebírání, uchovávání a transplantování. Orgán, tkáň, shluk buněk nebo individuální buňky mohou být odebrány od dárce, podrobeny ex vivo působení kompozice s oxidem uhelnatým podle předkládaného vynálezu a transplantovány do příjemce. Alternativně nebo kromě toho, orgán, tkáň, shluk buněk nebo individuální buňky mohou být podrobeny takovému působení

in situ, zatímco jsou přítomny ještě v dárce. Volitelně kompozice obsahující oxid uhelnatý může být podávána příjemci před, během, a/nebo po chirurgickém výkonu, např. po té, co je orgán reperfundován příjemcovou krví. Kompozice obsahující oxid uhelnatý může také být podávána dárce před nebo během postupu odebírání orgánu, tkáně, shluku buněk nebo individuálních buněk.

Orgány, tkáně, shluky buněk a/nebo izolované buňky mohou být odebrány z dárce a transplantovány kterýmikoliv metodami, které jsou odborníkům známy (viz například Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994). Odborníkovi je jasné, že metody odebírání a transplantace mohou být různé v závislosti na mnoha okolnostech, jako například na typu orgánu, tkáně nebo buněk a typu dárce.

Dále se předpokládá, že způsoby podle předkládaného vynálezu, které jsou popsány v tomto textu, mohou být použity pro orgány, tkáně, shluky buněk nebo izolované buňky *ex vivo*, např. pro tzv. bioartificiální orgány, jako jsou například bioartificiální játra, ledvina nebo slinivka (viz např. Sambanis et al, Cytotechnology 15:351- 363, 1994). Orgány, tkáně nebo buňky (nebo shluky buněk) mohou být podrobeny působení oxidu uhelnatého buďto předtím, než jsou vloženy do zařízení, nebo v průběhu používání v zařízení, nebo lze užít obě zmíněné možnosti. Alternativně nebo kromě toho, dárce může být podáván oxid uhelnatý před odstraněním orgánu, tkání, shluku buněk nebo individuálních buněk pro použití ve zmíněném zařízení.

Alternativně nebo kromě toho buňky mohou být kultivovány, jak bude ještě dále popsáno, a transplantovány do příjemce.

Pacient může být podroben působení kompozice obsahující

oxid uhelnatý kterýmkoliv způsobem známým v oboru podávání plynů a/nebo kapaliny pacientům. Předkládaný vynález předpokládá systémové podávání kapalných nebo plynných kompozic obsahujících oxid uhelnatý pacientům (např. inhalací a/nebo polykáním) a topické podávání kompozic *in situ* do pacientových orgánů nebo tkání (např. polykáním, insuflací a/nebo zavedením do břišní dutiny).

Systémová aplikace oxid uhelnatého

Plynné kompozice obsahující oxid uhelnatý mohou být podávány systémově pacientovi, např. pacientovi, který právě podstupuje a nebo potřebuje podstoupit transplantaci. Plynné kompozice obsahující oxid uhelnatý jsou typicky podávány inhalací přes hrdlo nebo nosní dutinu do plic, kde oxid uhelnatý je snadno absorbován do pacientova krevního oběhu. Koncentrace účinné sloučeniny (tj. CO) použitá v terapeutické plynné kompozici závisí na rychlosti absorpce, distribuce, inaktivace a vylučování (obecně prostřednictvím dýchání) oxidu uhelnatého a také na dalších faktorech, které jsou známy odborníkům. Je třeba dále rozumět, že pro kteréhokoli konkrétního pacienta je třeba upravit specifické dávkovací schéma v průběhu léčení podle individuální potřeby, na základě odborného názoru osoby podávající přípravek nebo dohlízející na podávání přípravku, přičemž rozsahy koncentrací uvedené v předkládané přihlášce jsou uvedeny pouze jako příklady a nijak neomezují rozsah ani realizaci předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález počítá také s akutním, subakutním a chronickým podáváním oxidu uhelnatého, závislosti na závažnosti nebo vytrvalosti chorobného stavu u pacienta. Oxid uhelnatý může být podáván pacientovi po dobu (včetně neomezené doby), která je dostatečná k léčení a dosažení zamýšleného

farmakologického nebo biologického účinku.

Dále jsou uvedeny příklady některých metod a zařízení, která mohou být použita k podávání plyných kompozic obsahujících oxid uhelnatý pacientům.

Ventilační zařízení

Oxid uhelnatý (koncentrace se může měnit) může být zakoupen jako směs se vzduchem nebo jiným plynem obsahujícím kyslík ve standardních nádobách pro stlačený plyn (např. 21 % O_2 , 79 % N_2). Je nereaktivní a koncentrace, které jsou vyžadované pro způsoby podle předkládaného vynálezu jsou hodně pod limitem hořlavosti (10 % ve vzduchu). Při nemocničním uspořádání, plyn bude pravděpodobně dopraven na místo u nemocničního lůžka, kde bude pomocí směšovacího zařízení míchán s kyslíkem nebo vzduchem z místnosti na požadovanou koncentraci. Pacient bude inhalovat směs plynů přes ventilační zařízení, které bude nastaveno tak, aby to odpovídalo pacientovým potřebám a byly splněny požadavky přiměřeného komfortu. To je určen plicní grafikou (tzn. respirační rychlostí, respiračním objemem apod.). Mechanismy, zabezpečené proti selhání, které zajišťují, aby pacient zbytečně nedostával větší než požadované množství oxidu uhelnatého, mohou být zařazeny do aplikačního systému. Hladina oxidu uhelnatého pacienta může být monitorována tím, že se sleduje (1) karboxyhemoglobin (COHb), který může být měřen v žilní krvi a (2) vydechovaný oxid uhelnatý odebíraný z vedlejší větve ventilačního zařízení. Expozice pacienta oxidu uhelnatému může být upravena na základě pacientova zdravotního stavu a na základě uvedených ukazatelů. Pokud je to třeba, oxid uhelnatý může být odstraněn z pacienta tím, že se přepne na inhalaci 100% O_2 . Oxid uhelnatý není metabolizován, takže

jakékoliv množství bylo inhalováno, takové bude nakonec vydycháno, kromě velmi malého procenta, které je přeměněno na CO_2 . Oxid uhelnatý může být také míchán s jakýmkoliv množstvím O_2 pro účely terapeutické podávání oxidu uhelnatého bez následného hypoxického stavu.

Obličejová maska a stan

Směsi plynů obsahující oxid uhelnatý se připraví stejně, jak bylo uvedeno výše, aby byla umožněna inhalace pacientem při použití obličejové masky nebo stanu. Inhalovaná koncentrace může být měněna a veškerý oxid uhelnatý může být odstraněn tím, že se prostě přejde na 100 % O_2 . Bylo by vhodné monitorování hladiny oxidu uhelnatého přímo v masce a nebo v blízkosti masky nebo stanu užitím spolehlivého mechanismu, který by zabránil, aby nebyla inhalována příliš vysoká koncentrace oxidu uhelnatého.

Přenosný inhalátor

Stlačený oxid uhelnatý může být také vložen do přenosného inhalačního zařízení (inhalátoru) a inhalován v odměřených dávkách, aby bylo možné například přerušované podávání příjemci, který není hospitalizován v nemocničním zařízení. Ve vhodných nádobách mohou být poskytnuty různé koncentrace oxidu uhelnatého. Zařízení může být tak jednoduché, jako např. malá nádoba (např. pod 5 kg) s přiměřeně naředěným CO a jednoduchým ventilem (typu otevřeno/zavřeno) a trubicí/hadicí, ze které pacient vdechne CO podle standardního režimu nebo podle potřeby.

Intravenózní umělá plíce

Umělá plíce (zařízení typu katétru pro výměnu plynů v krvi) určená pro podávání O_2 a odstraňování CO_2 může být užita pro aplikaci oxid uhelnatého. Katétr, když je zaveden, je lokalizován v jedné z velkých vén a je schopen podávat oxid uhelnatý v požadované koncentraci buďto pro systémovou aplikaci nebo lokální aplikaci na konkrétní místo. Aplikace může tedy být lokální aplikace vysoké koncentrace oxidu uhelnatého po krátké časové období na specifické místo (tato vysoká koncentrace je pak rychle naředěna v krevním oběhu) nebo relativně delší systémová expozice k nižší koncentraci oxidu uhelnatého (viz např. Hattler et al., *Artif. Organs* 18(11):806-812, 1994 a Golob et al., *ASAIO J.* 47(5):432-437, 2001).

Normobarická komora

V určitý případech by bylo žádoucí vystavit celkově pacienta oxidu uhelnatému. Pacient v akovém případě může být uvnitř vzduchotěsné komory, která je pak naplněna oxidem uhelnatým (v koncentraci, která nepředstavuje pro pacienta žádné ohrožení nebo v koncentraci, která představuje pro pacienta přijatelné riziko, avšak bez rizika nechtěné expozice nezúčastněných osob). Po ukončení požadované expozice může být komora zaplněna vzduchem (např. 21 % O_2 , 79 % N_2) a vzorky mohou být analyzovány užitím analyzátorů oxidu uhelnatého, aby se zajistilo, že nepřetrvávají žádné zbytky oxidu uhelnatého před tím, než je dovoleno pacientovi vystoupit ze zařízení, kde byl exponován.

Vodné roztoky

Předkládaný vynález dále předpokládá, že pro systémové aplikace pacientovi mohou být připraveny vodné roztoky obsahující oxid uhelnatý, např. pro perorální aplikace a/nebo aplikace injekcí do organismu, např. intravenózní, intraarteriální, intraperitoneální a/nebo subkutánní injekcí.

Konzervační pufry a kultivační média mohou být saturována na nastavenou koncentraci oxidu uhelnatého prostřednictvím zařízení pro difúzi plynů (difuzérů) nebo předem připravených zásobních roztoků, u kterých kontrola kvality zabezpečuje, že obsahují dané hladiny oxidu uhelnatého. Přesná kontrola dávky může být dosažena měřením prostřednictvím membrány, která je propustná pro plyn a nepropustná pro kapalinu, a která je připojena k analyzátoru oxidu uhelnatého. Pufry a roztoky mohou být saturovány na požadovanou účinnou koncentraci a udržovány na této hladině. Pro postupy, kdy je vyžadována perfúze celého orgánu, tkáně nebo buněčného preparátu, předem připravené saturované roztoky mohou být snadno k dispozici pro udržení hladiny oxidu uhelnatého. Jestliže hladina oxidu uhelnatého poklesne, čerstvý roztok může být přidán, aby nahradil se nahradil oxid uhelnatý, o který koncentrace poklesla. Jakmile je jednou provedena příprava orgánu, tkáně nebo buňky, tyto mohou být pro transport udržovány v roztoku ve vzduchotěsném obalu. Přítomnost inertního plynu, hélia, způsobuje účinnější příjem oxidu uhelnatého.

Topické ošetřování *in situ* a *ex vivo* orgánů, tkání a izolovaných buněk oxidem uhelnatým

Předkládaný vynález poskytuje způsoby transplantace orgánu nebo orgánů, tkáně nebo tkání, shluků buněk a/nebo izolovaných buněk. Způsoby zahrnují krok, kdy jsou před transplantací

orgány, tkáně, shluky buněk a/nebo izolované buňky exponovány působení kompozice obsahující oxid uhelnatý. Takové expozice se mohou uskutečnit *in situ* a/nebo *ex vivo*. Orgány, tkáně a/nebo izolované buňky mohou být exponovány atmosféře obsahující plyný oxid uhelnatý, nebo tekutému přípravku obsahujícímu oxid uhelnatý, jako je např. tekutina pro perfúzi, roztok pro uchovávání nebo roztok pro proplachování obsahující rozpuštěný oxid uhelnatý, nebo lze užít obě možnosti.

Expozice orgánu nebo tkáně tekuté kompozci obsahující oxid uhelnatý mohou být prováděny *ex vivo* a/nebo *in situ* kterýmkoliv způsobem známým v oboru. Tak například expozice může být prováděna *ex vivo* v jakékoliv komoře nebo prostoru, který má dostatečný objem, aby mohly být orgány nebo tkáně, kompletně nebo částečně ponořeny, do kompozice/přípravku obsahujícího oxid uhelnatý. Jako další příklad lze uvést, že orgán může být exponován přípravku obsahujícímu oxid uhelnatý tak, že se orgán vloží do jakékoliv vhodné nádoby a přípravek obsahující oxid uhelnatý se nechá „proplachovat“ nádobou s orgánem, takže orgán je vystaven kontinuálnímu průtoku přípravku obsahujícího oxid uhelnatý.

Alternativně orgán může být perfundován přípravkem obsahujícím oxid uhelnatý. Termín "perfúze" a termíny odvozené jsou v oboru známy a uznávány a týkají se průchodu tekutiny, např. přípravku obsahujícího oxid uhelnatý, krevními cévami orgánu nebo tkáně. Metody pro perfundování orgánů *ex vivo* a *in situ* jsou v oboru dobře známy. Orgány mohou být perfundovány přípravkem obsahujícím oxid uhelnatý *ex vivo*, například pomocí zařízení pro kontinuální hypotermní perfúzi (viz Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994). Volitelně při *in situ* nebo

ex vivo perfúzi orgány mohou být perfundovány promývacím roztokem, např. UW roztokem bez oxidu uhelnatého, před perfúzi přípravkem obsahujícím oxid uhelnatý, aby se odstranila dárceva krev z orgánu. Takový postup by mohl být použit, aby se zabránilo kompetici o oxid uhelnatý hemoglobinem dárce. Další volbou může případně být použití přípravku obsahujícího oxid uhelnatý jakožto proplachovacího roztoku. Vhodná kapalina může procházet trubičkami nebo hadičkami, které umožňují difúzi plynu, tyto trubičky nebo hadičky procházejí atmosférou obsahující oxid uhelnatý (např. přes komoru, jako například v případě mimotělního membránového okysličovacího zařízení), aby se vytvořil tekutý přípravek obsahující oxid uhelnatý, který pak může být podáván do orgánu (např. perfundovat do orgánu tím, že se trubičky nebo hadičky napojí na orgán) .

Orgán nebo tkáň mohou být umístěny, např. tak, že se ponoří, do média nebo roztoku, který neobsahuje oxid uhelnatý, a takto pak umístěny do komory, kde je médium nebo roztok vystaven atmosféře obsahující oxid uhelnatý. Jinak nebo kromě toho, oxid uhelnatý může být probubláván do média nebo roztoku. Expozice *in situ* mohou být prováděny jakýmkoliv způsobem známým v oboru, např. *in situ* zaplavením nebo perfundováním orgánu tekutým přípravkem obsahujícím oxid uhelnatý (viz Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994) .

Předkládaný vynález také předpokládá, že kterékoliv z metod nebo všechny výše popsané metody pro vystavování orgánů nebo tkání tekutému přípravku obsahujícímu oxid uhelnatý, jako je např. promytí, ponoření nebo perfundování, mohou být použity v určitých transplantačních postupech.

Předkládaný vynález dále počítá s tím, že může být připravena i tuhá nebo polotuhá kompozice obsahující oxid

uhelnatý. Například tekutina, která je tekutou kompozicí obsahující oxid uhelnatý, jak byla popsán výše, může být přeměněna na tuhou nebo polotuhou kompozici, kterou pak orgán nebo tkáň mohou být pokryty nebo převrstveny nebo do ní zality. Alternativně polotuhá kompozice obsahující oxid uhelnatý může být vnesena do orgánu infúzí. Pevné nebo polotuhé kompozice mohou být vytvořeny například přidáním ztužujícího činidla, jako je například gelatinační činidlo (např. kolagen nebo alginát), do tekutiny.

Tkáňové kultury

Předkládaný vynález poskytuje také způsob uchovávání nebo kultivace živočišných buněk *in vitro*. Způsob zahrnuje kroky, kdy se poskytne nádoba obsahující tlakový plyn obsahující plynný oxid uhelnatý, poskytnou se živočišné buňky *in vitro* a tlakový plyn se uvolní do nádoby, kde vznikne atmosféra, která obsahuje plynný oxid uhelnatý. Živočišné buňky jsou pak kultivovány nebo jen udržovány v přítomnosti atmosféry obsahující plynný oxid uhelnatý.

Způsob může být realizován v jakékoliv komoře nebo v prostoru vhodném pro vytvoření atmosféry, která obsahuje vhodné hladiny oxidu uhelnatého. Takové komory nebo prostory zahrnují např. inkubátory, směšovací nádoby a jakékoliv jiné nádoby vhodné pro kultivaci nebo uchování buněk, jako jsou například kultivační láhve pro rotační kultivační zařízení (rolery), kultivační láhve pro tkáňové kultury, Petriho misky a zkumavky. Například může být použit CO₂ inkubátor, kam je plynný oxid uhelnatý dodáván při kontinuálním průtoku z nádoby, která obsahuje plyn. Jako další příklad může být použita kultivační láhev pro roler, která obsahuje atmosféru obsahující oxid uhelnatý uvnitř lahve.

Odborníkovi je zřejmé, že kultivační podmínky, např. teplota, mohou být zvoleny a/nebo změněny v závislosti na typu buněk, které mají být kultivovány (viz například Cells: A Laboratory Manual, Spector and Leinwand, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1997). Například myší inzulinomová buněčná linie β TC3 (DSMZ, Braunschweig, Německo) může být inkubována ve zvlhčované atmosféře 5% CO₂/95% vzduch při 37 °C.

Živočišné buňky mohou být vneseny, např. resuspendovány nebo vnořeny do tekutého média. Médium může být kterékoliv médium známé odborníkům, které je vhodné pro kultivaci, konzervaci nebo promytí požadovaných buněk (viz například Cells: A Laboratory Manual, Spector and Leinwand, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1997). K médiu takového typu patří, ale bez omezení, různé pufry, Eagleovo minimální esenciální médium (MEM), Dulbeccem/Vogtem modifikované Eagleovo minimální esenciální médium (DMEM) nebo médium Roswell (Roswell Park Memorial Institute) institutu (RPMI). Taková média mohou také obsahovat vhodné doplňky, např. fetální bovinní sérum (FBS), individuální aminokyseliny, antibiotika a/nebo vitamíny. Například médium může být RPMI médium 1640 (Life Technologies, Grand Island, New York) doplněné 2 mM L-glutaminem, 100 U/ml penicilinu G, 100 U/ml streptomycinu a 10 % fetálním telecím sérem (FCS) (Life Technologies). V takových provedeních předkládaného vynálezu, kde buňky jsou v tekutém médiu, buňky mohou být exponovány kompozici obsahující oxid uhelnatý kontaktem tekutého média s tlakovým plynem obsahujícím oxid uhelnatý, např. s plynným oxidem uhelnatým uvolňovaným ze zdroje tlakového plynu způsobem podle vynálezu.

V dalším provedení předkládaného vynálezu je tekutým

médium samotná kompozice obsahující oxid uhelnatý, připravená způsobem, jak je zde popsáno. Médium může být nasyceno oxidem uhelnatým před nebo po přidání buněk do média.

Předkládaný vynález dále zahrnuje možnost, že může být připraveno tuhé nebo polotuhé médium, kde toto tuhé nebo polotuhé médium je kompozicí obsahující oxid uhelnatý. Například tekuté médium, které je kompozicí obsahující oxid uhelnatý, jak bylo popsáno výše, může být přeměněno na tuhé nebo polotuhé médium, kterým mohou být buňky pokryty nebo převrstveny nebo do něho zality. Takový postup může být proveden například tím, že se do média přidá gelatinační činidlo jako je například kolagen, alginát nebo agar.

Použití hemoxygenázy-1, sloučeniny asociované s hemoxygenázou-1 a další sloučeniny při léčení

Předkládaný vynález dále zahrnuje indukci nebo expresi hemoxygenázy-1 (HO-1) ve spojení s podáváním oxidu uhelnatého. HO-1 může být poskytnuta pacientovi prostřednictvím indukce nebo exprese HO-1 u pacienta nebo podáváním exogenní HO-1 přímo pacientovi. Termín "indukovat", jak se v tomto textu používá, znamená způsobit zvýšenou produkci proteinu, např. HO-1, v izolovaných buňkách nebo buňkách tkáně, orgánu nebo živočichovi, a sice s využitím buňce vlastního endogenního (tedy nikoliv rekombinantního) genu, který kóduje protein.

HO-1 může být indukována u pacienta, např. dárce a/nebo příjemce, kterýmkoliv způsobem, který je znám v oboru. Například produkce HO-1 mohou být indukována heminem, protoporfyrinem s železem nebo kobaltem. Celá řada dalších činidel kromě hemu, jako jsou např. těžké kovy, cytokiny, hormony, oxid dusnatý, COCl_2 , endotoxin a tepelný šok, jsou také silnými induktory HO-1 exprese (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; and Tenhunen et al., J. Lab. Clin. Med 75:410-421, 1970). HO-1 je také silně indukována celou řadou činidel a podmínek, které způsobují oxidační stres, včetně např. peroxidu vodíku, depletorů glutathionu, UV záření a hyperoxie (Choi et al., Am. J. Respir. Cell Mot. Biol. 15: 9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37:517-554, 1997; and Keyse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:99-103, 1989). Termín "farmaceutický přípravek obsahující induktor HO-1" označuje podle vynálezu farmaceutický přípravek obsahující kterékoliv činidlo schopné indukovat HO-1 u pacienta, např. kterékoliv z činidel výše popsaných, např. hemin, protoporfyrin s železem a/ nebo kobaltem.

Exprese HO-1 v buňce může být zvýšena prostřednictvím přenosu genu. Termín "exprimovat", jak se v tomto textu používá, znamená přivodit zvýšení produkce proteinu, např. HO 1 nebo ferritinu, v izolovaných buňkách nebo buňkách tkáně, orgánu nebo zvířete tím, že se využije exogenně dodaný gen (např. rekombinantní gen). HO-1 nebo ferritin je výhodně stejného biologického druhu (např. člověka, myši, laboratorního potkana apod.) jako transplantační příjemce, aby byla minimalizována jakákoliv imunitní reakce. Exprese může být řízena konstitutivním promotorem (např. promotorem z cytomegaloviru) nebo tkáňově specifickým promotorem (např. promotor genu pro mléčný protein pro buňky prsní žlázy nebo promotor genu pro albumin pro jaterní buňky). Vhodný vektor pro genovou terapii (např. retrovirus, adenovirus, adenoasociovaný virus (AAV), poxvirus (virus vakcínie), virus humánní imunodeficiencie (HIV), malý virus myši, virus hepatitidy B, chřipkový virus, Herpes Simplex virus 1

a lentiviry) kódující HO-1 nebo ferritin může být podáván pacientovi perorálně, inhalací nebo injekcí do vhodného místa pro léčení rejekce transplantátu. Zejména výhodné je lokální podávání přímo do dárcovského orgánu, tkáně nebo k buňkám, které mají být transplantovány, nebo do místo transplantace v příjemci. Podobně také mohou být podávány plazmidové vektory kódující HO-1 nebo apo-ferritin, např. jako holá DNA nebo DNA v lipozomech nebo v mikročásticích.

Dále může být exogenní HO-1 protein přímo podáván pacientovi jakýmkoliv způsobem známým v oboru. Exogenní HO-1 může být přímo podávána kromě, nebo jako alternativa, indukce nebo exprese HO-1 u pacienta, jak bylo popsáno výše. HO-1 protein může být podáván pacientovi například v lipozomech a/nebo jako fúzní protein, např. jako TAT-fúzní protein (viz např. Becker-Hapak et al., Methods 24:247-256, 2001).

Alternativně nebo kromě toho, kterýkoliv z produktů metabolismu HO-1, např. bilirubin, biliverdin, železo, a/nebo ferritin, může být podáván pacientovi ve spojitosti, s oxidem uhelnatým nebo místo něho, aby se zabránilo nebo se léčil chorobný stav. Dále předkládaný vynález také předpokládá, že také molekuly vázající železo jiné než ferritin, např. desferoxamin (DFO), dextran železa a/ nebo apoferritin, mohou být podávány pacientovi. Kterékoliv z výše uvedených sloučenin mohou být podávány pacientovi topicky a/ nebo systémově.

Také podle předkládaného vynálezu přichází do úvahy podávání oxid dusnatého (NO) pacientovi nebo do orgánů, tkání a/ nebo izolovaných buněk, ve spojitosti s podáváním oxid uhelnatého, HO-1 a/nebo sloučenin asociovaných s HO-1. Tento postup zahrnuje poskytnutí NO dárci, příjemci nebo nebo orgánu, tkáni nebo buňkám ex vivo, ve spojitosti s podáváním HO-1 a nebo kteréhokoliv z produktů nebo všech produktů

degradace hemu, např. CO, biliverdinu, bilirubinu, železa a ferritinu.

Termín "oxid dusnatý" (nebo "NO"), jak se v tomto textu používá, označuje molekulární oxid dusnatý v plynném stavu nebo rozpuštěný ve vodném roztoku. Plynné kompozice/přípravky obsahující NO jsou typicky podávány inhalací hrtanem nebo nosem do plic, kde NO může uplatnit účinek přímo nebo je snadno absorbován do pacientova krevního oběhu. Stlačený nebo lakový plyn, např. NO (a/nebo CO, jak bylo popsáno podrobněji výše), použitelný ve způsobech podle vynálezu, může být získán z kteréhokoli komerčního zdroje a v jakémkoliv typu nádoby, který je vhodný pro uchovávání stlačeného plynu. Je-li to potřeba, způsoby podle předkládaného vynálezu mohou být prováděny s použitím více nádob obsahujících individuální plyny. Alternativně, CO a NO mohou být smíchány v jedné nádobě a naředěny, je-li to třeba, inertním plynem.

NO pro inhalační podávání je dostupný komerčně (např. INOmax™, INO Therapeutics, Inc., Clinton, NJ). Plyn může být získán od komerčního dodavatele typicky jako směs 200 až - 800 ppm NO v čistém N₂. Zdrojem NO může být v podstatě 100% NO nebo NO naředěný N₂ nebo kterýmkoliv jiným inertním plynem (např. hélium) na jakoukoliv požadovanou koncentraci. Zásadní je, aby byl NO uchováván jako směs bez jakéhokoliv kontaminujícího O₂ nebo vyšších oxidů dusíku, protože tyto vyšší oxidy dusíku (které mohou vznikat reakcí O₂ s NO) jsou potenciálně škodlivé pro plicní tkáň. Je-li to třeba, čistota NO může být prokázána chemiluminescenční analýzou, s použitím známé metody, před podáváním pacientovi. Chemiluminescenční analyzátoři pro NO-NO_x jsou komerčně dostupné (např. Model 14A, Thermo Environmental Instruments, Franklin, MA). směsi NO-N₂ smějí být míchány s plynem obsahujícím O₂ (např. 100% O₂ nebo

vzduchem) těsně před inhalací pacientem, s použitím například kalibrovaného rotametu, který byl předtím ověřen pomocí spirometru. Konečná koncentrace NO ve směsi pro dýchání může být ověřena chemickými nebo chemiluminescenčními postupy, které jsou odborníkům dobře známy (např. Fontijin et al., Anal Chem 42:575, 1970). Alternativně koncentrace NO a NO₂ mohou být monitorovány pomocí elektrochemických analyzátorů. Jakékoliv nečistoty, jako je například NO₂, mohou být odstraněny expozicí k roztokům NaOH nebo směsi hydroxidu barnatého a oxidu vápenatého nebo směsi hydroxidu sodného a oxidu vápenatého. Jako konečná kontrola směsi plynů může být vyhodnocována i koncentrace FiO₂.

Farmaceutické kompozice/přípravky obsahující NO mohou být podávány jakýmkoliv způsobem, který je odborníkům znám pro podávání plynů (plynných přípravků) pacientům. Bezpečné a účinné způsoby podávání NO inhalací jsou popsány např. patentech US č. 5 570 683 a č. 5 904 938 a publikaci Frostell et al., Circulation 83:2038-2047, 1991: Některé příklady způsobů pro podávání plynů (jako například CO) pacientům byly popsány podrobněji výše a mohou být použit k podávání NO. Příklady metod a zařízení, která mohou být použita k podávání plynných farmaceutických přípravků obsahujících NO pacientům zahrnují dýchací přístroje, obličejové masky a stany, přenosné inhalátory, intravenózní umělé plíce (viz např., Hattler et al., Artif. Organs 18(11):806-812, 1994 a Golob et al., ASAIO J., 47(5):432-437, 2001) a normobarické komory. Nicméně, vlastnosti NO dovolují/vyžadují některé modifikace těchto metod. V nemocnici nebo nouzové polní situaci, podávání plynného NO může být uskutečněno například tím, že se připojí nádrž stlačeného plynu obsahující NO v dusíkové atmosféře a druhá nádrž obsahující kyslík nebo směs kyslík/N₂ (jako například vzduch), k inhalátoru určenému pro vytváření směsi

plynů ze dvou zdrojů. Tím, že se řídí průtok plynu z každého zdroj, může být koncentrace NO inhalovaná pacientem udržována na optimální hladině. NO může také být míchán se vzduchem z místnosti, s použitím standardních nízkoprůtokových směšovacích zařízení (např. Bird Blender, Palm Springs, CA). NO může být tvořen z N_2 a O_2 (tj. vzduchu) s použitím elektrického generátoru NO. Vhodný NO generátor je popsán v patentu US 5 396 882. Kromě toho NO může být přerušované poskytován z inhalátoru vybaveného zdrojem NO, jako stlačený NO nebo elektrický generátor NO. Použití inhalátorů může být zvláště výhodné, jestliže je ve spojení s NO podávána, perorálně nebo inhalací, druhá sloučenina (např. inhibitor fosfodiesterázy, jak je popsáno podrobněji dále).

Výhodně je ve farmaceutické kompozici obsahující plyný NO koncentrace NO v době inhalace přibližně 0,1 ppm až přibližně 300 ppm, např. 0,5 ppm až 290 ppm, 1,0 ppm až 280 ppm, 5 ppm až 250 ppm, 10 ppm až 200 ppm nebo 10 ppm až 100 ppm, ve vzduchu, v čistém kyslíku nebo jiném vhodném plynu nebo směsi plynů. Vhodná počáteční dávka pro NO podávané inhalací může být 20 ppm (viz např. příbalová informace u přípravku INOmax™) a dávka se může měnit např. od 0,1 ppm do 100 ppm, v závislosti na věku a stavu pacienta, onemocnění nebo chorobném stavu, které mají být léčeny, a dalších faktorech, které ošetřující lékař považuje za relevantní. Akutní, subakutní a chronické podávání NO jsou předpokládány podle předkládaného vynálezu. NO může být podáván pacientovi po nějakou dobu (včetně neomezené) dostatečnou k léčení daného stavu a dosažení zamýšleného farmakologického nebo biologického účinku. Koncentrace může být přechodně zvýšena po krátkou dobu, např. 5 minut, na 200 ppm NO. To může být provedeno, když je očekáván okamžitý účinek. Výhodné doby expozice pacienta k NO zahrnují alespoň jednu hodinu, např. alespoň

šest hodin, alespoň jeden den, alespoň jeden týden, dva týdny, čtyři týdny, šest týdnů, osm týdnů, deset nebo dvanáct týdnů, alespoň jeden rok, alespoň dva roky a alespoň pět roků. Pacient může být exponován k takové atmosféře nepřetržitě nebo přerušovaně během takových období. Podávání farmaceutických kompozic obsahujících NO (a/nebo CO) se může provádět prostřednictvím spontánní nebo nucené (mechanické) ventilace.

Když je podáván NO pro inhalaci, je třeba, aby byly monitorovány účinky inhalace NO. Takové monitorování může být využito, zejména u konkrétního jedince, k ověření požadovaných účinků a rozpoznání nežádoucích vedlejších účinků, které by mohly nastat. Takový monitorování je také užitečné pro nastavení vhodných dávek, doby a frekvence podávání inhalací NO danému jedinci.

Plynný NO může být rozpuštěn ve vodném roztok a použit v této formě. Například takový roztok může být použit jako lázeň pro orgán, tkáň nebo buňky *ex vivo* nebo může být použit k perfundování orgánu nebo tkání *in situ*. Roztok může obsahovat další účinné látky jako například CO, HO-1, hem, biliverdin a/nebo bilirubin.

Může být potřebné prodloužit prospěšné účinky inhalování NO u pacienta. Pro určení toho, jak prodloužit prospěšné účinky inhalování NO, je užitečné zvážit, že jeden z účinků NO *in vivo* je aktivace rozpustné guanylátcyklázy, což stimuluje produkci cGMP. Alespoň některý z prospěšných účinků NO může být výsledkem stimulace biosyntézy cGMP. Takže inhibitor fosfodiesterázy může být podáván ve spojení s inhalací NO, aby inhiboval rozklad cGMP působením endogenní fosfodiesterázy.

Inhibitor fosfodiesterázy může být podán pacientovi jakýmkoliv vhodným způsobem, včetně cesty perorální, přes sliznici, intravenózní, intramuskulární subkutánní nebo

intraperitoneální. Alternativně inhibitor může být také inhalován pacientem. Pro inhalaci je inhibitor fosfodiesterázy výhodně připraven jako suchý prášek nebo jako roztok pro aerosol nebo nebulizátor mající částice nebo kapičky velikosti menší 10 μm pro optimální usazení v alveolech, a případně může být inhalován v plynu obsahujícím NO.

Vhodným inhibitorem fosfodiesterázy je např. Zaprinast (M&B 22948, 2-o-propoxyfenyl-8-azapurin-6-on, Rhone-Poulenc Rorer, Dagenham Essex, UK). Zaprinast selektivně inhibuje hydrolýzu cGMP s minimálními účinky na rozklad ení z cyklického adenosinmonofosfátu v buňkách hladkého svalstva cév (Trapani et al, J Pharmacol Exp Ther 258:269, 1991; Harris et al, J Pharmacol Exp Ther 249:394, 1989; Lugnier et al., Biochem Pharmacol 35:1743, 1986; Souness et al., Br J Pharmacol 98:725, 1989). Když se použije Zaprinast (Zaprinast™) v souladu s předkládaným vynálezem, výhodnou cestou je intravenózní nebo perorální podávání. Rozsah vhodných dávek může být snadno určen odborníkem. Zásobní roztok Zaprinastu může být připraven v 0,05 N NaOH. Roztok se pak ředí Ringerovým laktátovým roztokem na požadovanou konečnou koncentraci Zaprinastu, těsně před použitím.

Předkládaný vynález může být realizován také užitím jiných inhibitorů fosfodiesterázy. Různé inhibitory fosfodiesterázy jsou v oboru znám, včetně např. Viagry® (citrát sildenafilu), dipyridamolu a teofylinu. Vhodný způsob podávání a vhodné rozsahy dávek mohou být určeny odborníkem.

Podávání NO s inhibitorem fosfodiesterázy může být prováděno následujícím způsobem. NO je podáván v koncentraci 20 ppm ve vzduchu po dobu 45 minut. Na začátku 45 minutového intervalu je podáván 4 minuty intravenózní infúzí Zaprinast, v dávce 1,0 mg na kg tělesné hmotnosti, po té následuje

kontinuální infúze 0,004 mg/kg/minuta po celou dobu zbávající do 45 minut. Alternativně je na začátku 45 minutového intervalu podáván po 4 minuty dipyridamol, v dávce 0,15 mg na kg tělesné hmotnosti, a poté následuje kontinuální infúze 0,004 mg/kg/minuta po zbytek 45 minutového intervalu. Zaprínast nebo dipyridamol je podáván jako roztok ve fyziologickém roztoku.

V kontextu transplantací předkládaný vynález dále předpokládá, že další postupy známé v oboru pro zlepšení přežívání/funkce štěpu mohou být použity spolu s postupy popsány v předkládané přihlášce. K takovým postupům patří, ale bez omezení, imunosupresivní léčba a dárcovsky specifické transfúze (DST). Například DST mohou být podávány příjemci před, během a/nebo po podávání CO, HO-1, dalších s hemem asociovaných produktů a nebo NO příjemci. Takové podávání, např. podávání DST spolu s léčebným postupem popsáním v předkládané přihlášce, může být prováděno před, během a/nebo po transplantaci.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Oxid uhelnatý chrání pankreatické β -buňky před apoptózou a zlepšuje funkce/přežití ostrvků po transplantaci

Buněčné kultury

Myší nesidiomová buněčná linie β TC3 (DSMZ, Braunschweig, SRN) byla kultivována v Dulbeccově modifikovaném Eagleho médiu

(DMEM) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) doplněném 2mM L-glutaminem, 100 U/ml penicilinu G, 100 U/ml streptomycinu a 10 % fetálního telecího séra (FCS) (Life Technologies) a inkubována ve zvlhčované směsi 5 % CO₂/95 % vzduchu ve 37 °C. Tato myší linie β-buněk, pocházející z transgenní myši nesoucí hybrid inzulin - promotor nádorového antigenu opičího viru 40, je známá tím, že si zachovává vlastnosti diferencovaných β-buněk po přibližně 50 pasážích v kultuře. Buňky produkují zralý inzulin z proinzulinu I a II způsobem srovnatelným s β-buňkami *in vivo* a jsou indukovatelné až na třicetinásobek glukózou (Efiat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9037-41, 1988). Ve srovnání s jinou často používanou transformovanou linií β-buněk, jako například RIN-m5F nebo HIT, hladiny sekretovaného inzulinu jsou bližší normálním β-buňkám buněčné linie βTC3. Takže tyto buňky jsou užitečné pro výzkum regulace a genové exprese β-buněk (D'Ambra et al., Endocrinology 726:2815-22, 1990).

Pankreatická Langerhansovy ostrůvky myší C57BL/6 byly dodány z centrální laboratoře pro izolaci ostrůvků Joslinova diabetologického centra.

Vitální barvení krystalovou violetí

βTC3 buňky byly vysety v množství 2 x 10⁵ buněk (Nunc, Marsh Products, Rochester, NY, USA). Buňky byly promyty jednou 500 μl PBS a obarveny pomocí 200 μl 0,05% krystalové violeti ve 20% ethanol po dobu 10 minut při teplotě místnosti. Krystalová violet pak byla opláchnuta. K eluci barviva z buněk bylo přidáno do každé jamky 100 μl 50% kyseliny octové. 50 μl pak bylo přeneseno do 96 jamkové mikrotitrační destičky a vyhodnoceno na čtecím zařízení pro mikrotitrační destičky (EL 340 Biokinetics Reader, Bio-Tek Instruments) na absorbanci

při 562 nm.

Expresní plazmidy

β -galaktosidázový expresní vektor (Clontech Laboratories, Palo Alto, California) byl klonován do vektoru pcDNA3 (Solo et al., J. Immunol. 166:4185-4194, 2001) (Invitrogen, Carlsbad, California). XhoI-HindIII fragment velikosti 1,0 kbp kódující kompletní HO-1 cDNA laboratorního potkana byl vyštěpen z vektoru prHO-1 (Shibahara et al., J. Biochem. 113:214-218, 1993) a subklonován do vektoru pcDNA3.

Přechodná transfekce

β TC3 byly vysety v množství 3×10^5 buněk do 16mm jamek a transfekovány za 15 až 20 hodin s použitím činidla Lipofectamin Plus™ (Life Technologies) podle instrukcí výrobce. Celková DNA byl udržována konstantní s použitím prázdného vektoru pcDNA3. Procento životaschopných buněk bylo hodnoceno tak, že se normalizovalo procento životaschopných buněk z každé DNA preparace k počtu kontrolně transfekovaných buněk bez apoptotického podnětu (100% životaschopnost) (Snares et al., Nature Med. 4:1073-1077, 1998; Sato et al., J. Immunol. 166:4185-4194, 2001).

Průtoková cytometrie

β TC3 buňky kultury byly inkubovány s rekombinantním TNF- α (500 nebo 1000 U/ml (R&D Systems) po dobu 24 hodin a kultury ostrůvků byly stimulovány TNF- α (5000 U/ml (R&D Systems) a cyklohexamidem (CHX) (50 μ g/ml) po dobu 48 hodin. β TC3 buňky nebo ostrůvky byly získány, dispergovány, fixovány v 70%

ethanolu a suspendovány v DNA značicím pufru (PBS, pH 7,4, obsahující 0,1% Triton X-100, 0,1 mM EDTA, 50 µg/ml propidiumjodid a 50 mg/ml Rnase A). Obsah DNA byl analyzován na FACSCAN™ analyzátoru vybaveném softwarem Cell Quest™ (Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Buňky s normálním obsahem DNA (2N) byly hodnoceny jako životaschopné, zatímco buňky s hypoploidním DNA obsah (<2N, označeno A⁰) byly hodnoceny jako apoptotické. Aby byl vyřazen debris a apoptotické bezbuněčné fragmenty, všechny signály s FL-2 profilem pod hodnotou odpovídající jádrům kuřecích erytrocytů byly vyloučeny z analýzy.

Ošetření buněk a činidla

Myší rekombinantní TNF-α (R&D Systems) byl rozpuštěn v PBS s 1% bovinním sérovým albuminem a přidán ke kultivačnímu médiu (17,5 ng/ml = 500 U) 24 hodin po transfekci. Inhibitor kaspázy-3 Z-DEVD-FMK a inhibitor kaspázy-8 IETD-CHO (Calbiochem, San Diego, California) byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO, Sigma) a přidány ke kultivačnímu médiu (10 µM a 1 µM v daném pořadí) dvě hodiny před ošetřením s TNF-α. Protoporfyrin s cínem (SnPPIX) (Porphyrin Products, Logan, Utah) byl rozpuštěn (10 µM) v 100 mM NaOH a přidán 6 hodin po transfekci ke kultivačnímu médiu (50 µM). Inhibitor guanylylcyklázy 1H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-α]chinoxalin-1 (ODQ, Calbiochem) byl rozpuštěn v DMSO a přidán ke kultivačnímu médiu (100 µM) 6 hodin po transfekci. CGMP analog 8-bromguanosin-3'-5'-cyklický-monofosfát (8-Br-cGMP) (Sigma) byl rozpuštěn ve vodě a přidán ke kultivačnímu médiu (10 µM) 30 minut před indukcí apoptózy. Inhibitor proteinkinázy G KT5823 (Calbiochem) byl rozpuštěn v DMSO a přidán ke kultivačnímu médiu (1,6 µM) 6 hodin po transfekci.

CO expozice

Buňky a ostrůvky byly vystaveny 1% oxidu uhelnatému ve stlačeném vzduchu doplněném 5% CO₂, jak bylo popsáno jinde (viz např. Otterbeia et al., Nature Med. 6:422-428, 2000). Ostrůvky byly inkubovány v RPMI médiu pre-saturovaném oxid uhelnatým (4 °C přes noc, 1% CO, 5% CO₂) po dvě hodiny ve 37 °C, zatímco pokračovalo ošetření 1% CO, 5% CO₂.

Myši a indukce diabetu

Samci C57BL/6 byly zakoupeni od firmy Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts) a chováni v souladu se směrnicemi NIH. Experimenty byly schváleny ústavní etickou komisí pro experimenty se zvířaty (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)). Příjemcovské myši (8 týdnů staré) byly změněny na diabetické jednou intraperitoneální injekcí (220 mg/kg) přípravku Streptozotocin™ (Sigma) rozpuštěného v citrátovém pufru. Myši dostaly transplantát, jestliže ze vzorku plné krve bez hladovění byly získány 2 po sobě jdoucí glykémie vyšší než 350 mg/dl.

Izolace ostrůvků

Pankreatické Langerhansovy ostrůvky (C57BL/6 myši) byly dodány z centrální laboratoře pro izolaci ostrůvků JDRF centra pro transplantaci ostrůvků Harvard Medical School, jak bylo popsáno dříve (Gotoh et al., Transplantation 40:437-438, 1985).

Transplantace syngenních ostrůvků marginální hmoty

250 ostrůvků 150 až 250 μm v průměru bylo ručně odebráno s použitím preparačního mikroskopu. Ostrůvky byly transplantovány do ledvinného pouzdra, jak bylo popsáno dříve (Kaufman et al., J. Exp. Med. 172:291-302, 1990). Z každého preparátu ostrůvků byl transplantován stejný počet kontrolních a léčených zvířat.

Analýza funkce štěpu

Funkce štěpu byla definována jako bod (okamžik), kdy byl dosaženo prvního ze tří po sobě nepřetržitě jdoucích dnů, kdy glykémie bez hladovění byla $<200 \mu\text{g/dl}$. Primární výsledek experimentu byl definován jako doba k dosažení normální glykémie.

Statistická analýza

Glykemická data byla shrnuta jakožto průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka pro soubory myší dostávajících neošetřené nebo ošetřené ostrůvky. Doba k obnově funkce ostrůvků byla vypočtena s použitím Kaplan-Meierových tabulek přežití a rozdíly mezi skupinami byly testovány s použitím log-rank testu, kdy tři preparace ostrůvků byly považovány za jednu samostatnou vrstvu v analýze, a je uvedena hodnota mediánu doby k obnově s 95% intervalem spolehlivosti.

TNF- α indukuje apoptózu v buňkách βTC3

Byl zkoumán účinek TNF- α na βTC3 buňky. Následující postupy byly použity k získání údajů uvedených na obr. 1A-C.

Obr. 1A: Buňky βTC3 byly podrobeny působení zvyšující se

koncentrace $\text{TNF-}\alpha$. Životaschopné buňky byly obarveny 24 hodin po aktivaci krystalovou violetí. Extinkce byla měřena při 562 nm a hodnota byla normalizována vzhledem k neošetřeným buňkám.

Obr. 1B: Buňky βTC3 byly podroben působení $\text{TNF-}\alpha$, obarven propidiumjodidem o 24 hodin později a analyzovány na fragmentaci DNA (FACScan[™]).

Obr. 1C: Buňky βTC3 byly kotransfekovány vektorem exprimujícím $\beta\text{-gal}$ (pcDNA3/ $\beta\text{-gal}$) plus kontrolním vektorem (pcDNA3). Jak je ukázáno, buňky byly podrobeny působení inhibitoru kaspázy-3 Z-DEVD-FMK (C3-i) nebo inhibitoru kaspázy-8 IETD-CHO (C8-i). Šedé sloupce představují neošetřené buňky a černé sloupce představují β -buňky podrobené působení $\text{TNF-}\alpha$ po dobu 24 hodin. Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraná z jednoho ze tří opakování experimentu.

$\text{TNF-}\alpha$ indukoval vysokou míru buněčné smrt u nesidiomové buněčné linie βTC3 , a sice způsobem závislým na dávce (Stefens et al., Endocrinology 140:3219-3227, 1999) (viz Obr. 1A). Fragmentace DNA, prokázaná pomocí propidiumjodidového (PI) značení (viz Obr.1B), vede k předpokladu, že $\text{TNF-}\alpha$ indukuje smrt β -buněk prostřednictvím apoptózy. $\text{TNF-}\alpha$ zprostředkovaná apoptóza byla přísně závislá na aktivaci kaspázy-8 a částečně závislá na aktivaci kaspázy-3, jak je ilustrováno zjištěním, že blokáda kaspázy-8 specifickým inhibitorem kaspázy-8 (IETD-CHO) zabránila apoptóze (96% inhibice), zatímco blokáda kaspázy-3 specifickým inhibitorem kaspázy-3 (Z-DEVD-FMK) zabránila apoptóze pouze částečně (53% inhibice) (viz Obr. 1C).

Oxid uhelnatý chrání buňky β TC3

Bylo zkoumáno, zda exogenní oxid uhelnatý může ochraňovat β -buňky před apoptózou (Obr. 2A-C). Pro získání dat uvedených na obr. 2A-C byly použity následující postupy.

Obr. 2A: ukazuje, že exogenní oxid uhelnatý může nahradit HO-1 (hemoxygenázu-1), když je HO-1 aktivita zablokována. Buňky β TC3 byly kotransfekovány vektorem exprimujícím β -gal plus kontrolním vektorem exprimujícím HO-1 (Brouard et al., 1. Exp. Med. 192:1015-1026, 2000). Když je to uvedeno, enzymatická aktivita HO-1 byla inhibována Sn-protoporfyrinem (SnPP). A kde je to uvedeno, β -buňky byly exponovány exogennímu oxidu uhelnatému (1%), jak bylo popsáno dříve (Oiterbeia et al., Nature Med. 6:422-428, 2000).,

Šedé sloupky představují neošetřené β -buňky a černé sloupky představují β -buňky podrobené působení TNF- α . Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraná z jednoho ze tří opakování experimentu.

Obr. 2B: Ukazuje pomocí DNA fragmentační analýzy, že exogenní oxid uhelnatý chrání β -buňky před apoptózou. Buňky β TC3 byly podrobeny působení TNF- α . Přímě po stimulaci byly β TC3 exponovány exogennímu oxidu uhelnatému po dobu 24 hodin. Kontrolní β TC3 byly ošetřeny stejným způsobem, ale bez exponování oxidu uhelnatému. Po 24 hodinách byly buňky obarveny propidiumjodidem a analyzovány na fragmentaci DNA pomocí FACScan™.

Obr. 2C ukazuje, že exogenní oxid uhelnatý chrání β -buňky před apoptózou v nepřítomnosti HO-1. β TC3 buňky byly transfekovány vektory exprimujícími β -gal a byly vystaveny působení exogenního oxidu uhelnatého (Stefens et al,

Endocrinology 740:3219-27, 1999). Šedé sloupce představují neošetřené β -buňky a černé sloupce představují β -buňky podrobené působení TNF- α nebo etoposidu nebo vystaveny nedostatku séra (sérové deprivaci), jak je uvedeno. Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraných z jednoho ze tří opakování experimentu.

Pro hodnocení toho, zda exprese HO-1 chrání β -buňky před apoptózou zprostředkovanou TNF- α , byly buňky β TC3 přechodně transfekovány expresním vektorem HO-1 a testovány na jejich schopnost přežít, když jsou vystaveny působení TNF- α . Exprese („overexprese“) HO-1 chrání β TC3 před apoptózou zprostředkovanou TNF- α (Pileggi et al., Diabetes 50:1983-1991, 2001) (87% přežití proti 33% v kontrolním vzorku) (viz Obr. 2A). Když byla HO-1 aktivita blokována protoporfyrinem IX s cínem (SnPPiX) (Kappas et al., Hepatology 4:336-341, 1994), anti-apoptotický účinek byl inhibován (viz obr. 2A), což vede k předpokladu, že vytvoření pomocí HO-1 alespoň jednoho z koncových produktů hemového katabolismu, tj. železa, bilirubin a/nebo CO, je vyžadováno její anti-apoptotickou funkcí.

Na základě hypotézy, že anti-apoptotický účinek HO-1 je zprostředkován oxidem uhelnatým, bylo zkoumáno, zda expozice exogennímu oxidu uhelnatému by mohla nahradit HO-1 při ochraně β -buněk před apoptózou. Když byla aktivita HO-1 inhibována SnPPDC, expozice oxidu uhelnatému inhibovala TNF- α zprostředkovanou apoptózu v podobném rozsahu jako HO-1 (viz obr. 2A). Expozice exogennímu oxidu uhelnatému sama měla ochranný účinek (11,7 % apoptotických buněk proti 20,3 % v kontrole, která nebyla exponována k CO), jak bylo prokázáno DNA fragmentační analýzou (viz obr. 2B). Podobně apoptóza

β -buněk indukovaná etoposidem nebo deficitem séra byla inhibována expozicí oxidu uhelnatému (viz obr. 2C).

Indukce HO-1 u dárců a příjemců vedla k delšímu přežívání štěpů ostrůvků

Bylo zkoumáno, zda indukce HO-1 v dárcích a příjemcích ochraňuje buňky ve štěpech ostrůvků. Pro získání dat znázorněných v tabulce 1 byly užity následující postupy.

Pro experimenty byl jako model použity myši. Dárci buněk ostrůvků byli podrobeni působení protoporfyrinu s kobaltem (CoPP) (20 mg/kg) jednou za den před izolací buněk ostrůvků. Příjemci štěpů ostrůvků byly podrobeni působení CoPP (20 mg/kg) jednou za den ve dnech 1, 3, 5, 7 nebo CoPP (10 mg/kg) jednou na den ve dnech 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 a 17. Podávání CoPP indukovalo expresi hemoxygenázy-1 (HO-1).

Tabulka I

Indukce HO-1 u dárců a příjemců vede k delšímu přežívání štěpů ostrůvků

Léčení	Počet ostrůvků	Den rejekce	Průměr $\pm$ SD	Rejekce /celkem
CoPP 20 mg/kg x 5	350 - 400	17, 33, 33, 48, > 58x2, > 67x1	44,85 $\pm$ 17,81	4/7
CoPP 10 mg/kg x 10	350 - 400	30, 30, > 51x2	40,5 $\pm$ 12,12	2/4
Kontrola	350 - 400	8, 8, 15, 15, 16, 22, 26	15,71 $\pm$ 6,65	7/7

Údaj „den rejekce“ uvádí dny, které ostrůvky přežily. Například hodnota "> 51 x 2" znamená, že ostrůvky u 2 příjemců přežívaly ještě po 51 dnech. Průměrná počet dnů rejekce je ukázán ve čtvrtém sloupci. Tato data ukazují, že indukce HO-1 vede k delšímu přežívání ostrůvků po transplantaci.

Exogenní oxid uhelnatý chrání myší buňky ostrůvků před apoptózou

Bylo také zkoumáno, zda exogenní oxid uhelnatý chrání myší buňky ostrůvků před apoptózou (viz obr. 3). Pro získání údajů znázorněných na obr. 3 byly užity následující postupy.

Apoptóza byl indukována u čerstvě izolovaných myších ostrůvků (C57BL/6) tím, že byly stimulovány TNF- α a cykloheximidem (CHX). Přímou po stimulaci byly ostrůvky vystaveny působení exogenního oxid uhelnatého po dobu 24 hodin. Kontrolní ostrůvky byly ošetřeny stejným způsobem, ale nebyly exponovány oxidu uhelnatému. Po 48 hodinách byly buňky analyzovány pomocí FACScan™ na fragmentaci DNA. Tento experimentální byl proveden dvakrát s naprosto shodnými výsledky.

Expozice k oxidu uhelnatému po dobu 24 hodin chránila izolované myší (C57/BL6) ostrůvky před apoptózou zprostředkovanou TNF- α plus cykloheximidem (CHX) (11,7 % apoptotických buňky proti 20,3 % v kontrole bez expozice CO), jak bylo zjištěno pomocí DNA fragmentační analýzy (viz obr. 3).

Anti-apoptotický účinek exogenního oxidu uhelnatého je zprostředkovaný aktivací guanylátcyklázy a signály přes cGMP-závislé proteinkinázy (cGK)

Bylo zkoumáno, zda anti-apoptotický účinek oxidu uhelnatého působí prostřednictvím aktivace rozpustné guanylátcyklázy (sGC) a vytváření cGMP (viz obr. 4A-C). Pro získání datový znázorněných na obr. 4A-C byly použity následující postupy.

Obr. 4A: Antiapoptotický účinek exogenního oxidu uhelnatého je zprostředkován aktivací guanylátcyklázy. Buňky β TC3 byly transfekovány vektory exprimujícími β -gal a exponovány k exogennímu oxidu uhelnatému (1%). Kde je uvedeno, β TC3 byly podrobeny působení inhibitoru guanylylcyklázy ODQ.

Obr. 4B: Analog cGMP může nahradit oxid uhelnatý v chránící funkci před apoptózou. Buňky β TC3 byly transfekovány vektory exprimujícími β -gal a exponovány k exogennímu oxidu uhelnatému. Kde je uvedeno, β TC3 byly podrobeny působení cGMP analogu 8-Br-cGMP, ale nebyly vystaveny působení oxidu uhelnatého.

Obr. 4C: Proteinkinázy závislé na cGMP (cGK) zprostředkovávají anti-apoptotický účinek oxidu uhelnatého. Buňky β TC3 byly kotransfekovány vektorem exprimujícím β -gal a exponovány k exogennímu oxidu uhelnatému. Kde je to uvedeno, buňky byly podroben působení inhibitoru proteinkinázy G KT5823 (KT). Šedé sloupčky v grafu představují neošetřené β TC3 buňky a černé sloupčky představují β TC3 buňky podrobené působení TNF- α . Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraných z jednoho ze tří opakování experimentu.

Bylo také zkoumáno, zda anti-apoptotický účinek oxidu

uhelnatého působí prostřednictvím aktivace rozpustné guanylátcyklázy a tvorby cGMP, jak bylo popsáno pro fibroblasty (Petrache et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 278: L312-319, 2000). Inhibice aktivity sGC u oxadiazolochinoxalinem (ODQ) potlačila anti-apoptotický účinek CO, což vede k domněnce, že rozpustná guanylátcykláza je hlavní mediátor pro oxid uhelnatý v tomto experimentálním systému (viz obr. 4A). CGK aktivátor/analog cGMP, 8-Br-cGMP, potlačil apoptózu β TC3 buněk v rozsahu podobném tomu, jaký byl pozorován pro oxid uhelnatý (viz obr. 4B). Také inhibice cGMP-závislé proteinkinázy specifickým inhibitorem KT5823 potlačila anti-apoptotický účinek exogenního oxid uhelnatý (viz obr. 4C), což vede k představě, že antiapoptotický účinek oxidu uhelnatého je zprostředkován aktivací jedné nebo několika cGMP-závislých proteinkináz.

Exogenní oxid uhelnatý poskytuje anti-apoptotickou ochranu při různých postupech

Byla také zkoumána schopnost oxid uhelnatého chránit β -buňky po indukci apoptózy (viz obr. 5A-C). Pro získání údajů uvedených na obr. 5A-C byly použity následující postupy.

Obr. 5A: Jednohodinová expozice oxidu uhelnatému je dostatečná k tomu, aby zabránila apoptóze. β TC3 byly transfekovány vektory exprimujícími β -gal. Apoptóza β -buněk byla indukována TNF- α . Ihned po aktivaci TNF- α byly buňky byly exponovány 1% oxidu uhelnatému po různě dlouhou dobu (0 až 24 hodin). Kontrolní β TC3 byly podrobeny stejnému ošetření, ale nebyly exponovány oxid uhelnatému. Přežívání buněk bylo určováno 24 hodin po aplikaci TNF- α .

Obr. 5B: Oxid uhelnatý chrání β -buňky po indukci apoptózy. β TC3 byly transfekovány vektory exprimujícími β -gal. Apoptóza

β -buněk byla indukována TNF- α . Po různé době (0,5 až 12 hodin, jak je ukázáno) byl β TC3 vystaveny působení 1% oxidu uhelnatého (Otterbein et al., Nat. Med, 6: 422-428, 2000). Kontrolní β TC3 byly ošetřeny stejně, ale nebyly exponovány oxidu uhelnatému. Přežívání buněk bylo určováno 24 hodin po podání TNF- α .

Obr. 5C: Preinkubace s oxidem uhelnatým zabraňuje apoptóze β -buněk. β TC3 byly transfekovány vektory exprimujícími β -gal. Apoptóza β -buněk byla indukována TNF- α . β TC3 byly pre-exponovány 1% oxidu uhelnatému po jednu hodinu. Kontrolní β TC3 byly ošetřeny stejně, ale nebyly vystaveny působení oxidu uhelnatého. 1 až 6 hodin po ukončení preexpozice byla apoptóza indukována aplikací TNF- α . Šedé sloupce v grafu představují neošetřené β -buňky a černé sloupčky představují β -buňky podroben působení TNF- α . Výsledky jsou ukázány jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka z hodnot pro dvě jamky vybraných z jednoho ze tří opakování experimentu.

β TC3 byly vystaveny působení oxidu uhelnatého po různou dobu (1 až 24 hodin) ihned po přidání TNF- α abyly vyhodnocovány na apoptózu o 24 hodin později. Jedna hodina expozice oxidu uhelnatému byl dostatečná k tomu, aby zabránila apoptóze β -buněk (viz obr. 5A).

Ke zjištění toho, zda expozice oxidu uhelnatému může blokovat probíhající apoptózu, byly β -buňky na jednu hodinu vystaveny působení CO, a to 0,5 až 12 hodin po indukce apoptózy podáním TNF- α . Dokonce i když byly exponovány až dvě hodiny po TNF- α stimulaci, oxid uhelnatý byl ještě schopen potlačit apoptózu β -buněk (viz obr. 5B).

Pro zjištění, zda preinkubace s oxide uhelnatým chrání β -buňky před apoptózou, byly β TC3 vystaveny působení oxidu uhelnatého po dobu 0,5 až 3 hodiny před indukci apoptózy.

Jedn hodinová preinkubace v přítomnosti oxidu uhelnatého byla dostatečná pro prevenci apoptózy β -buněk (data nejsou ukázána). K vyhodnocení toho, jak dlouho by tento účinek trval, když by se doba mezi preinkubací a apoptotickým podnětem prodlužovala, byly β -buňky preexponovány jednu hodinu CO, a sice jednu až šest hodin před indukcí apoptózy aplikací TNF- α (viz obr. 5C). Jedna hodina preinkubace s oxidem uhelnatým inhibovala apoptózu β -buněk stimulovanou TNF- α dokonce dvě až tři hodiny po ukončení jedn hodinové expozice oxidu uhelnatému.

Tato data ukazují, že relativně krátké ošetření oxidem uhelnatým může působit antiapoptotickým způsobem, a že toto anti-apoptotické působení bude přetrvávat po dlouhou dobu.

Vystavení myších ostrůvků působení oxidu uhelnatého zlepšuje přežívání/funkci ostrůvků po transplantaci

Pro zjištění, zda by oxid uhelnatý mohl také zlepšit funkci štěpů ostrůvků *in vivo*, marginální hmota 250 ručně vytríděných ostrůvků byla transplantována do syngenního systému, model pro primární nefunkčnost (Berney et al., Transplantation 71: 125-32, 2001, Kaufman et al., Diabetes 43: 778-83, 1994). Transplantace marginálního (např. suboptimálního) množství ostrůvků ("marginální hmota") do diabetického syngenního příjemce způsobí zdržení v návratu k normoglykémii, aniž by způsobila rejekci nebo vypuknutí autoimunního onemocnění. Pro určení toho, jaká by byla marginální hmota ostrůvků v syngenním systému C57/BL6, byl pozorováno, že transplantace 500 odebraných ostrůvků do ledviného pouzdra příjemce vedla k rychlému návratu k normoglykémii ($1,5 \pm 0,5$ dne ($n=4$)), zatímco transplantace 250 ostrůvků vedla k významnému zpoždění ($14,2 \pm 2,94$ dne

(n=9)). Takže 250 ostrůvků bylo definováno jako marginální hmota. Užití marginální hmoty tímto způsobem nezahrnuje rejekci ani opakování autoimunitního onemocnění (Berneyet al., Transplantation 71: 125-132, 2000).

Bylo také zkoumáno, zda preinkubace štěpů ostrůvků s oxidem uhelnatým před transplantací vede k lepší funkci *in vivo* (viz obr. 6A-B). Pro získání dat znázorněných na obr. 6A-B byly použity následující postupy.

Obr. 6A: Dvě stě padesát čerstvě izolovaných a vytríděných ostrůvků z myši C57BL/6 bylo inkubováno v médiu presaturovaném 1% oxidem uhelnatým po dvě hodiny při 37 °C. Kontrolní ostrůvky byly ošetřeny stejně, ale nebyly exponovány k oxidu uhelnatému. Ostrůvky byly transplantovány pod ledvinné pouzdro diabetických syngenních příjemců, jak bylo popsáno dříve. Po transplantaci byla denně sledována hladina krevní glukózy. Celkově bylo transplantováno 16 zvířat (8 s pre-exponovanými ostrůvky, 8 kontrolních). Jedno zvíře, které dostalo pre-exponované ostrůvky uhynulo 3. den bez epozice z technických důvodů a bylo zahrnuto ve statistickém rozboru jako zvíře se zkrácenou životností. Primárním koncovým bodem těchto experimentů byl první den normoglykémie. Data jsou ukázána jak průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka.

Obr. 6B ukazuje pravděpodobnost zotavení (glykémie nižší 200 mg/dl) pro zvířata, která dostala ostrůvky pre-exponované oxidu uhelnatému nebo kontrolní ostrůvky. *P = 0,001 proti kontrole.

Na základě pozorování, že účinky působené oxidu uhelnatého přetrvávají po dlouhou dobu (viz obr. 5A a B) a že relativně krátká pre-expozice oxidu uhelnatému (před tím, než je aplikován apoptotický podnět) má anti-apoptotický účinek (viz obr. 5C), bylo vyhodnocováno, zda pre-expozice ostrůvků

působené oxidu uhelnatého může zlepšit přežití a/nebo funkce ostrůvků po transplantaci. Marginální hmota ostrůvků byla transplantována pod ledvinné pouzdro diabetických syngenních příjemců. Doba potřebná k dosažení normoglykémie byla zkrácena vysoce významným způsobem ($P = 0,0011$), když byly ostrůvky preinkubovány po dvě hodiny v médium pre-saturovaném oxidem uhelnatým (7 dnů, 95% interval spolehlivosti: 6-8 dnů), ve srovnání s kontrolními ostrůvky, které nebyly pre-exponovány oxidu uhelnatému (14 dnů, 95% interval spolehlivosti 12-18 dnů) (viz obr. 6). Celkově byly použity tři různé preparáty ostrůvků pro tyto experimenty. Nebyl žádný statisticky významný rozdíl v době dosažení normoglykémie pro tyto tři různé preparáty ($P > 0,25$).

Expozice oxidu uhelnatému

Pro experimenty s tkáňovými kulturami byl 5% CO_2 použit pro pufrování. CO v 1% koncentraci (tj. 10000 ppm) ve stlačeném vzduchu byl před aplikací do expoziční komory míchán se stlačeným vzduchem buďto s nebo bez CO_2 ve směšovací nádobě z nerezové oceli. Průtok do komory pro zvířata o objemu $0,105 \text{ m}^3$ (3,70 krychlové stopy) z plexiskla byl udržován na hodnotě 12 l/minuta a do komory pro tkáňové kultury o objemu $0,034 \text{ m}^3$ (1,2 krychlové stopy) na průtoku 2 l/minuta. Komora pro tkáňové kultury byla zvlhčována a udržována na teplotě 37°C . CO analyzátor (Interscan, Chatsworth, CA) byl použit pro kontinuální měření CO hladiny v komorách. Vzorky plynu byly odebírány analyzátozem otvorem ve víku komory rychlostí 1 l/minuta a analyzovány elektrochemickým detektorem s citlivostí 10-600 ppm. Koncentrace byly měřeny jedenkrát za hodinu. Jakmile byly jednou komory ekvilibrovány (přibližně za 5 minut), nebyly již žádné fluktuace v koncentracích CO .

Zvířata byla vystavena směsi obsahující $> 98\%$ O_2 nebo 98% $O_2 + CO$ při průtoku rychlostí 12 l/minuta v komoře o objemu $0,034\text{ m}^3$ (1,2 krychlové stopy) z plexiskla. Zvířatům byla podávána potrava a voda v průběhu expozice. CO v 1% koncentraci (10000 ppm) ve stlačeném vzduchu byl míchán s $> 98\%$ O_2 ve směšovací nádobě z nerezové oceli před tím, než vstoupil do expoziční komory. Koncentrace dodávaná do expoziční komory byly řízeny regulováním tím, že se měnila průtoková rychlost CO do směšovací nádoby. Protože průtoková rychlost byla primárně určena průtokem O_2 , pouze průtok CO byl měněn, aby se připravily různé koncentrace podávané do expoziční komory. Koncentrace O_2 v komoře byla měřena pomocí plynového spektrometru.

Postup izolace buněk

Následující příklad ukazuje postup/protokol použitý pro izolaci buněk ostrůvků z laboratorních potkanů nebo myší. Jedna ampulka přípravku Liberase™ z laboratorního potkana (od firmy Boehringer Mannheim/Roche, katalog. č. 1815032) byla rozpuštěna ve 4 ml sterilního HBSS, ochlazená na ledu po dobu 30 minut, rozdělena do alikvotů po 0,5 ml a uložena do $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Ke každému 0,5 ml alikvotu pak bylo přidáno 33 ml média, např. M199, HBSS nebo RPMI 1640 bez telecího séra.

Laboratorní potkani byly předávkování anestetikem (Nembutol i.p., 0,1 plus 0,1 ml/100 g tělesné hmotnosti). Pro myši byly připraveny 3 ml injekční stříkačky se 2 ml roztoku Liberase s jehlou velikosti 27 ohnutou v úhlu 90° . Pro chirurgický výkon byly použity 2 nůžky, jedny velké pro nastřížení břicha a jedny malé pro odříznutí žlučovéhoodu. Dvě pinzety byly použity pro excizi slinivky. Jeden hemostat byl použit pro zasvorkování žlučovéhoodu.

Břišní dutina byla otevřena a slinivka byla maximálně exponována tím, že byl proveden ze spodu břicha řez tvaru v. Vývod slinivky byl zasvorkován (hemostatem u laboratorního potkana nebo malou „bulldog“ svorkou u myši) v místě vyústění do dvanáctníku, s ohledem na to, aby nebyla poškozena okolní pankreatická tkáň. Žlučovod byl izolován na proximálním konci. Tuk byl odstraněn před tím, než byla vsunuta kanyla, opatrně tak, aby nedšlo k propíchnutí vrátnice (portální žíly). Vývod byl nastřižen malými nůžkami v jedné třetině napříč a kanyla byla vložena do vývodu. Kanyla byla přidržována ve vývodu lehkým stisknutím pinzety. Roztok Liberase byl injikován rychle. Slinivka vypadala, že je nafouklá a plně rozšířena po injikování 6 ml tekutiny. U myši byla do vývodu vsunuta jehla co nejvíce to bylo možné proximálně k játrům, a roztok Liberase byl injikován. Laboratorní potkan nebo myš pak byl utracen tak, že jim byla prostřižena bránice a srdce nebo aorta.

Po infiltraci Liberase byla slinivka odstraněna, počínaje oddělením od střev, pak žaludku a nakonec sleziny. Když byla slinivka spojena pouze žlučovodem, byla odříznuta a vyjmuta z laboratorního potkana. Slinivka pak byla vložena do 50 ml konické zkumavky a umístěna do vodní lázni s 37 °C na dobu 30 minut. Po inkubaci bylo do každé zkumavky přidáno 20 ml média + NCS. Zbytek izolace byl dokončen na ledu. Zkumavky byly třepány ručně důkladně po dobu 5 až 10 vteřin, aby došlo k rozpadu tkání. Ostrůvky byly několikrát promyty, aby se odstranila Liberase v klinické centrifuze při 800 rpm (přibližně 180 x g) po dobu 120 vteřin nebo při 1200 rpm (přibližně 200 x g) po dobu 90 vteřin, aby se odstranila Liberase. Supernatant byl slit pryč a bylo přidáno 25 až 35 ml média a jemně protřepáno na vortexu (přibližně 1/2 maxima). Krok centrifugace se opakoval, následován promytím, 2 až

3krát. Tkáň byla resuspendována ve 20 ml média a suspenze byl filtrována přes drátěnou sítku s průměrem 400 μm (Thomass Scientific, mesh 35, katalog. č. 8321-M22), aby se odstranila zbylá nerozvolněná tkáň, tuk a lymfa. Dalších 5 až 10 ml bylo přidáno do zkumavky na odmytí jakýchkoliv zbývajících ostrůvků provedelo se filtrování sítkou.

Buňky byly peletovány centrifugací při 1200 rpm po dobu 90 vteřin. Supernatant byl odstraněn, přitom bylo ponecháno jen tak málo média, jak to bylo možné.

Pro přípravu gradientu byl pelet resuspendován v 10 až 15 ml Histopaque 10770™ (Sigma, katalog. č. H 1077) a vortexován, až bylo dosaženo homogenní suspenze (stejně jako při oplachování). 10 ml média bylo převrstveno, bez NCS, ale opatrně, aby bylo zachováno ostré rozhraní mezi Histopaque a médiem. Médium bylo přidávání pomalým pipetováním po stěně zkumavky. Gradient byl stočen po dobu 20 minut při 2400 rpm (900 g) v 10 °C, s velmi pomalým zrychlením a žádným brzděním.

Po centrifugaci byla vrstva ostrůvků odebrána z rozhraní 10 ml serologickou pipetou (Falcon) pro jedno použití a přenesena do 50 ml konických zkumavek. Ostrůvky byly promyty několikrát přidáním 25 až 35 ml média + NCS, aby se odstranil Histopaque. Počáteční centrifugace byl prováděna při 1200 rpm po dobu 2 minut, ale další centrifugace byly prováděna po dobu 90 vteřin. Po 3 promytích byly ostrůvky resuspendovány pomocí pipetování nahoru a dolů. 7 až 10 ml z každého vzorku bylo nanášeno na 60 mm sterilní kultivační misky, aby mohl být proveden výběr. Výběr ostrůvků se prováděl pomocí 100 μl sterilní pipety pod mikroskopem. Každý ostrůvek byl vybrán individuálně a byla věnována péče tomu, aby se přitom vyhnulo jakékoliv další tkáni. Byly vybrány pouze ty ostrůvky, které měly průměr mezi 50 a 225 μm a měly hladký kulatý nebo oválný

tvár.

Příklad 2

Oxid uhelnatý inhibuje rejekci při transplantacích srdce z myši do potkana

Zvířata

Srdce myši BALB/C byla použita jako dárcovské orgány pro transplantaci do inbredních dospělých samců laboratorního potkana Lewis (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN). Zvířata byla chována podle směrnice Americké asociace pro péči o laboratorní zvířata a všechny výzkumné protokoly byly schváleny výbory pro péči o zvířata a užití zvířat Beth Israel Deaconess Medical Center.

Chirurgický model

Zvířatům byla podána anestéze kombinací inhalace methoxyfluranu (Pitman-Moore, Mundelain, IL) a i. p. pentobarbitalu (Abbott, Sever Chicago, IL) v dávce 30 až 50 mg/kg v průběhu všech postupů. Heterotopické srdeční transplantace byly prováděny, jak bylo již dříve popsáno (Berk et al., *Physiol Rev.* 8: 999-1030, 2001, Petkova et al., *J Biol. Chem.* 276: 7932-7936, 2001). Přežívání štěpu bylo hodnoceno denně palpací. Rejekce byla diagnostikována zastavením komorových stahů a potvrzena histologickým vyšetřením.

Experimentální činidla

Faktor kobřího jedu (CVF, který blokuje aktivaci komplementu) (Quidel, San Diego, CA) byl podáván i. p. v den -1 (60 U/kg) a v den 0 (20 U/kg) vzhledem ke dni transplantace (den 0). Cyklosporin A (CsA, Novartis, Basilej, Švýcarsko), který blokuje aktivaci T lymfocytů, byl podáván i. m. 15 mg/kg) počínaje dnem 0 a pak denně až do konce každého experimentu. Protoporfyrin s cínem (SnPPIX), potoporfyrin s kobaltem (CoPPIX) a potoporfyrin s železem (FePPIX) (Porphyrin Products, Logan, UT) byly naředěny ve 100 mM NaOH na 50 mM zásobní roztok a až do použití uchovávány při -70 °C. Expozici světlu bylo co možná nejlépe zabráněno. Jak SnPPIX tak FePPIX byly podávány i. p. (30 µM/kg) v PBS. FePPIX a SnPPIX byly podány dárce v dny -2 a -1 (30 µM/kg) a příjemci v den transplantace (den 0) a pak denně (30 µM/kg).

CO expozice

Stručně, CO v 1% koncentraci (10000 ppm) ve stlačeném vzduchu byl míchán s vyváženým vzduchem (21 % kyslíku) ve směšovací nádobě z nerezové oceli před tím, než byl přiveden do expoziční komory. Koncentrace CO byly řízeny měnicím se průtokem CO ve směšovacím válci před aplikací do komory. Protože průtoková rychlost je primárně určena průtokem O₂, byl měněn pouze průtok CO, aby byla připravena konečná koncentrace CO dodávaná do expoziční komory. CO analyzátor (Interscan Corporation, Chatsworth, CA) byl použit ke kontinuálnímu měření CO hladiny v komoře. Dárce štěpu byli umístěni v CO expoziční komoře 2 dny před transplantací. Příjemci štěpu byli umístěni v expoziční komoře ihned po transplantaci a byly udržovány v expoziční komoře po dobu 14 (n = 3) nebo 16 (n = 3) dnů. CO koncentrace byla udržována na 250 až 400 ppm

pro všechna zvířata. Zvířata byla denně vyjímána z komory, aby bylo možné zhodnotit přežití štěp a podávat CsA, SnPPIX nebo FePPIX, jak bylo popsáno výše.

Enzymatická aktivita HO

Enzymatická aktivita HO byl měřena jako tvorba bilirubinu v mikrosomech srdce a jater. Zvířata byly utracena a játra a srdce byly propláchnuty ledově chladným PBS a zmraženy v -70°C až do doby, než byly použity. Orgány byly homogenizovány ve čtyřech objemech sacharóзовého (250 mM) Tris-HCl (10 mM/l) pufru (pH 7,4) na ledu a stočeny (28000 rpm 3 x, 20 minut, 4°C). Supernatant byl stočen (105000 RPM 3 x 60 minut, 4°C) a mikrozomální pelet byl resuspendován v pufru MgCl_2 (2mM) - fosforečnan draselný (100 mM) (pH 7,4) a sonikován na ledu. Vzorky (1 mg proteinu) byly přidány do reakční směsi (400 μl) obsahující cytosol jater laboratorního potkana (2 mg proteinu), hemin (50 μM), glukózo-6-fosfát (2 mM), glukózo-6-fosfátdehydrogenázu (0,25 U) a NADPH (0,8 mM) po dobu 60 minut při 37°C ve tmě. Vytvořený bilirubin byl extrahován chloroformem a byla měřena optická denzita, OD, při 464 až 530 nm (extinkční koeficient, 40 mM/cm pro bilirubin). Enzymová aktivita je vyjádřena v pikomolech vzniklého bilirubinu vytvořeného na 1 miligram proteinu za 60 minut (pmol/mg/h). Koncentrace proteinu byl určena pomocí proteinového testu s bicinchoninovou kyselinou (Pierce, Georgetown). Bazální hodnota (pozadí) byla přibližně 5 pmol/mg/h. Všechna činidla použitá v tomto testu byla koupena od firmy Sigma (St. Louis, MO), není-li uvedeno jinak. Karboxyhemoglobin byl měřen 2 dny po transplantaci s použitím analyzátoru krevních plynů Corning 865 (Clinical Chemistry, Massachusetts General Hospital, Boston, MA).

Histomorfometrická analýza

Štěpy byly odebrány 3 dny po transplantaci, vloženy do parafínu, fixovány ve formalínu a sériově nařezány (5 μ m) *in toto* od apexu k bázi. Deset řezů bylo umístěno na jedno sklíčko, celkem asi 20 až 25 sklíček. Každé páté sklíčko bylo obarveno hematoxylinem a eosinem (H&E) pro histomorfometrickou analýzu. Dva obrázky pro každé sklíčko byly provedeny s použitím mikroskopu Nikon Eclipse E6000™ (Nikon, Melville, NY) spojeného s barevnou Hitachi 3-CCD kamerou (model HV-C20, Hitachi, Tokyo, Japan) a počítačem Power Macintosh™ 7300/200 (Apple Computer, Cupertino, CA) vybaveným softwarem IPLAB Spectrum pro digitální zobrazování (Signal Analytics Corporation, Vienna, VA). Přibližně 50 obrazů bylo porvedeno pro každé transplantované srdce ze dvou až třech zvířat z každé skupiny. Obrazy byly analyzovány ruční segmentací, vyhledáváním infarktových a neinfarktových oblastí v pravé a levé komoře na každém řezu. Oblasti odpovídající infarktové a neinfarktové tkáni byly vyhodnoceny softwarem pro digitální zobrazování jako počet pixelů odpovídající těmto oblastem. Infarktové a neinfarktové oblasti pak byly vyjádřeny jako procento celkové oblasti. Sloučená data pro každou skupinu, vyjádřená jako oblast v pixelech nebo jako procento infarktové tkáně (infarktu), byla analyzována s použitím statistiky ANOVA. Výsledky získané ytímto způsobem byly podobné, ať už s použitím pixelů nebo procenta infarktu a proto jsou ukázány pouze výsledky používající procento infarktu (viz tabulka II). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota $\pm$ směrodatná odchylka (SD).

Imunohistologie

Štěpy byly odebrány 3 dny po transplantaci, bleskově zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy v -80°C . Řezy získané na kryostatu byly fixovány a obarveny, jak bylo popsáno dříve (Soares et al, Nature Med. 4: 1073, 1998). Populace leukocytů laboratorního potkana byly analyzovány s použitím anti-potkaních monoklonálních protilátek (mAb) proti obecného leukocytárnímu antigenu (Ag) (LCA, CD45, OX-1), βTCR (TCR β -řetězce, R73), B lymfocytům (CD45RB, OX-33), NK buňkám (NKR-P1, 3.2.3) a makrofágům (CD68, ED-1) (vše od firmy Serotec, Harlan Bioproducts for Science, Indianapolis, IN). Detekce fibrinu/fibrinogenu byla prováděna pomocí králičí anti-humánní fibrin/fibrinogen polyklonální protilátky (Dako, Carpinteria, CA). Aktivace komplementu ve štěpu byl detekována s použitím anti-potkaní Clq (The Binding Site, Birmigham, U. K.), C3 (ED11, Serotec) nebo C5b-9 mAb (Dako). IgM laboratorního potkana byl detekován s použitím myší anti-potkaní IgM mAb MARM-4 (laskavý dar od Dr. H. Bazina, University of Louvain, Brussels, Belgie). Izotypově shodná mAb nebo purifikovaný Ig a také kontrola pro reziduální endogenní peroxidázovou aktivitu byly zahrnuty vždy v každém experimentu. Detekce apoptózy byl prováděna tak, že se používala detekční souprava pro *in situ* detekci apoptózy ApopTag[™] (Oncor, Gaithersburg, MD) podle instrukce výrobce.

Hemolytický test komplementu (CH50)

Jednotky CH50 byly definovaný jako ředění séra laboratorního potkana nutné pro dosažení 50 % maximální lýzy protilátkou senzibilizovaných (Ab-senzibilizovaných) ovčích erytrocytů. Stručně, Ab-senzibilizované ovčí erythrocyty (1×10^8 buněk, Sigma) byly inkubovány (30 minut, 37°C) se

sérem laboratorního potkana v želatinovém veronalovém pufru (GVB⁺⁺, Sigma). Buňky pak byly centrifugovány a uvolněný hemoglobin byl měřen ($I = 550$ nm). Bazální hodnota (šum) měřená v nepřítomnosti ovčích erytrocytů nebo bez přítomnosti séra byla odečtena u všech měřených vzorků.

Buněčná ELISA

Sérové hladiny anti-myších protilátek u laboratorního potkana byly měřeny metodou nepřímého testu ELISA založeného na buňkách.

Myší endotelová buněčná linie 2F-2B (CRL-2168, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) byla použita jako antigenní cíl. Stručně shrnuto, 2F-2B buňky byly kultivovány v médiu DMEM (Life Technologies, Rockville, MD), 10% FCS, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (Life Technologies, Rockville). Glutaraldehydem fixované 2F-2B buňky byly inkubovány (1 hodina, 37 °C) v přítomnosti séra laboratorního potkana sériově naředěného v PBS, 0,05% Tween 20 (Sigma) a potkaní anti-myší protilátky byly detekovány s použitím myšího anti-potkaního IgM (MARM-4), IgG1 (MARG1-2), IgG2a (MARG2a-1), IgG2b (MARGb-8) nebo IgG2c (MARG2c-5) (laskavé dary od Prof. H. Bazina, University of Louvain, Brussels, Belgie). Myší anti-potkaní Ab byly detekovány pomocí HRP-značeného kozího anti-myšího Fab' zbaveného anti-potkaní Ig zkřížené reaktivity (0,1 µg/ml, 1 hodina, teplota místnosti, Pierce, Rockford, IL). HRP byla detekována pomocí orthofenyldiaminu (Sigma) a H₂O₂ (0,03%) v citrátovém pufru (pH 4,9). Absorbance byl měřena při $I = 490$ nm. Relativní množství protilátek proti štěpu přítomných v séru bylo vyjádřeno jako OD ($I = 490$) získané z jednoho sériového ředění v lineárním rozsahu testu (1: 32 až 1:1024).

Vazba potkaního C3 na myší endotelové buňky byla měřena modifikovaným buněčným testem ELISA s myšími 2F-2B endotelovými buňkami jako antigenním cílem (Miyatake et al, J. Immunol. 160: 4114, 1998). Stručně, nefixované 2F-2B endotelové buňky byly inkubovány v přítomnosti séra laboratorního potkana sériově nařaděného v GVB⁺⁺ pufru (1 hodina, 37 °C). Buňky byly fixovány v PBS, 0,05% glutaraldehydu a depozit C3 laboratorního potkana byl detekován s použitím myší monoklonální protilátky proti potkanímu C3 (myší anti-potkaní C3 mAb) (Serotec).

Test agregace destiček

Myší 2F-2B endotelové buňky byly kultivovány na 0,2% želatinou (Sigma) potažených šestijamkových destičkách v 88% DMEM (Life Technologies), 10% FCS (FCS), 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (Life Technologies). Konfluentní endotelové buňky buď byly ponechány neošetřené nebo byly podrobeny působení s HO-indukujícím agens CoPPIX (50 µM, 18 hodin), HO inhibitoru SnPPIX (50 µM, 18 hodin) nebo jak CoPPIX (50 µM, 15 hodin) tak SnPPIX (50 µM, 3 hodiny). Plazma bohatá na destičky byla získána centrifugací (290 g, 12 minut, 19 °C) plazmy normálního laboratorního potkana v 3,8% citrátu sodném. Krevní destičky laboratorního potkana (3×10^8 buněk/ml) byly resuspendovány v HT pufru (8,9 mM NaHCO₃, 0,8 mM KH₂PO₄, 5,6 mM dextróza, 2,8 mM KCl, 0,8 mM MgCl₂, 129 mM NaCl, 10 mM HEPES). Destičky byly převrstveny (5 minut, 37 °C) na myší endotelové buňky a test agregace destiček byl proveden, jak bylo popsáno dříve (Kaczmarek et al, J. Biol. Chem. 271: 33116, 1996) s použitím agregometru (Chrono-Log, Harestown, PA) a ADP (0,5 až 4 µM) jako agonisty.

Buněčné extrakty a analýza Western blot

Endotelové buňky byly promyty v PBS (pH 7,2), sklizeny seškrábáním a lyzovány v Laemmliho pufru. Elektroforéza byla provedena v denaturačních podmínkách na 10% polyakrylamidovém gelu. Proteiny byly přeneseny na polyvinylidifluoridinovou membránu (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA) pomocí elektroblotovacího aparátu a detekovány králičí polyklonální protilátkou proti humánní HO-1 nebo HO-2 (StressGen, Victoria, Canada) nebo α -tubulinu (Boehringer Mannheim, Mannheim, Německo). Proteiny byly vizualizovány použitím HRP-konjugovaného oslího anti-králičího IgG nebo kozího anti-myšího IgG (Pierce) a následného ECL testu (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) použitého podle instrukce výrobce.

Přechodná transfekce a test na apoptózu

Myší endotelová buněčná linie 2F-2B (ATCC) byl přechodně transfekována, jak bylo popsáno jinde (Soares et al., Nature Med. 4: 1073, 1998, Brouard et al., J. Exp. Med. 192: 1015, 2000). Všechny experimenty byly prováděny 24 až 48 hodin po transfekci. Buňky transfekované β -galaktosidázou byly detekovány jak bylo popsáno jinde (Soares et al., Nature Med. 4: 1073, 1998, Brouard et al., J. Exp. Med. 192: 1015, 2000). Procento životaschopných buněk bylo hodnoceno tím, že se určil počet buněk exprimujících β -galaktosidázu, které si zachovaly normální morfologii, jak bylo již jinde popsáno (Soares et al., Nature Med. 4: 1073, 1998, Brouard et al., J. Exp. Med. 192: 1015, 2000). Počet náhodných polí, která byla počítána, byl určen tak, aby bylo nejméně 200 životaschopných transfekovaných buněk na jednu kontrolní jamku. Procento životaschopných buněk byl normalizováno pro každou DNA

preparaci podle počtu transfekovaných buněk počítaných bez výskytu apoptózu indukujícího agens (100% životaschopnost). Všechny experimenty byly prováděny alespoň třikrát v duplikátu. Aktinomycin D (ActD, Sigma) byl rozpuštěn v PBS a přidán do kultivačního média (10 µg/ml) 24 hodin po transfekci. SnPPIX (Porphyrin Products) byl rozpuštěn (10 µM) ve 100 mM NaOH a uchován při -20 °C do doby, než byl použit. SnPPIX byl přidán do kultivačního média (50 µM) 6 hodin po transfekci. Humánní rekombinantní TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN) byl rozpuštěn v PBS, 1% BSA a přidán do kultivačního média (10-100 ng/ml) 24 hodin po transfekci.

Vystavení kultivovaných endotelových buněk působení CO

Buňky byly exponovány působení stlačeného vzduchu nebo různých koncentrací CO (250 a 10000 ppm), jak bylo popsáno již jinde (Otterbein et al., Nature Med. 6: 422, 2000, and Brouard et al., J. Exp. Med. 192: 1015, 2000).

Model transplantace aorty

Model transplantace aorty byl realizován, jak bylo popsáno jinde (Plissonnier et al., Transplantation 60: 414-424, 1995). Krátce, aorta a dolní dutá žíla byly naříznuty, aby byly po heparinizaci vykrveny. Po dodatečné levé thorakotomii tři nebo čtyři páry interkostálních tepen byly ligovány stehy z nylonu 7-0 (Keisei Medical Industrial Co., LTD, Tokyo, Japonsko) a bylo pak získáno 2 cm sestupné aorty. Tento štěp byl pak vložen mezi ledvinové tepny a větvení aorty standardní mikrochirurgickou technikou s použitím šití nylonem 9-0 (EthilonTM, Ethicon, Inc, Somerville, New Jersey). Nativní břišní aorta byla ponechána po té, co oba konce byly ligovány.

CO v 1% koncentraci (10000 ppm) ve stlačeném vzduchu byl míchán s vyváženým vzduchem (21 % kyslíku), jak bylo popsáno dříve (Otterbein et al., Am J Physiol 276 (4 Pt1): L688-L694, 1999). Pro transplantační model byli dárce štěpu umístěni v CO komoře dva dny před transplantací. Příjemci byli umístěni do komory ihned po transplantaci a udržováni tam po dobu 56 dnů. CO koncentrace byla po celou dobu udržována na 250 ppm.

Dospělí samci (250 až 350 g) hnědých laboratorních potkanů RT1 byli použiti jako dárce aortálního štěpu a dospělý samci (250 až 350 g) laboratorního potkana (RT1) kmene Lewis jako příjemci (Charles River Lab. Wilmington, MA). Samci C57BL/6, p21^{-/-} a p53^{-/-} nulové myši byly koupeny od Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). MKK3^(-/-) nulové myši byly vytvořeny jak bylo popsáno dříve (Lua et al., EMBO. J. 18: 1845-1857, 1999). Myši byly ponechány aklimovat po jeden týden s potravou pro hlodavce a vodou *ad libitum*.

RT-PCR

RT-PCR (reverzní transkripce s následnou polymerázovou reakcí) byla prováděna po izolaci RNA z transplantovaných srdcí s použitím soupravy pro izolaci RNA podle instrukcí výrobce (Qiagen, Chatsworth, CA). Primery použité pro myši β -aktin byly následující:

„sense“ (5'-3'): CCTGACCGAGCGTGGCTACAGC (sekv. id. č. 1),

„antisense“ (3'-5'): AGCCTCCAGGGCATCGGAC (sekv. id. č. 2)

a pro myši HO-1:

„sense“ (5'-3'): TCCCAGACACCGCTCCTCCAG (sekv. id. č. 3)

„antisense“ (3'-5'): GGATTTGGGGCTGCTGGTTTC (sekv. id. č. 4).

Enzymatická aktivita je rozhodující pro potlačení akutní vaskulární rejekce

Myší srdce transplantovaná do neošetřených laboratorních potkanů trpěla akutní vaskulární rejekcí 2 až 3 dny po transplantaci, což bylo pozorováno v souladu s předchozími zprávami (Soares et al., *Nature Med.* 4: 1073, 1998, and Koyamada et al., *Transplantation* 65: 1210, 1998). Při léčení faktorem kobřího jedu (CVF) plus cyklosporinem A (CsA) myší srdeční štěpy přežívaly dlouhodobě (viz tabulka II, dále), což je zjištění, které je také v souladu s dřívějšími publikacemi. při léčení CVF plus CsA bylo přežívání štěpů asociováno s up-regulací HO-1 exprese v endotelových buňkách a buňkách hladkého svalstva štěpu a také v srdečních myocytech (viz obr. 7). Exprese HO-1 mRNA byla detekována pomocí RT-PCR 12 až 24 hodin po transplantaci a HO-1 protein 24 až 72 hodin po transplantaci (viz obr. 7). Dlouhodobé přežití štěpu nenastalo, jestliže byl dárci a pak příjemci podáván HO inhibitor SnPPIX, i přes léčbu CVF plus CsA. Za těchto podmínek všechny štěpy byly odvrženy během 3 až 7 dnů (viz tabulka II). Kontrolní léčba FePPIX, protoporfyrinem, který neinhibuje HO aktivitu, nevedla k odvržení štěpu (viz tabulka II).

Tabulka II

Inhibice HO-1 aktivity SnPPIX urychluje rejekci štěpu

Léčení	Doba přežití
CVF + CsA	> 50 (n=8)
CVF + CsA + FePPIX	> 50 (n=4)
CVF + CsA + SnPPIX	3, 4, 5 (n=2), 6 (n=4), 7 (n=2)

Pro získání údajů v tabulce II byla myší srdce transplantována do laboratorních potkanů ošetřených CVF plus CsA. Příjemci štěpu byly podrobeni působení FePPIX nebo SnPPIX. Podání SnPPIX indukovalo rejekci štěpu 3 až 7 dnů po transplantaci ($p < 0,0001$ ve srovnání s potkany, kterým byl podán CVF plus CsA nebo CVF plus CsA plus FePPIX). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Fisherova přesného testu.

Aby bylo možné demonstrovat, že SnPPIX, ale ne FePPIX, blokuje HO-1 funkci *in vivo*, celková HO enzymatická aktivita byl kvantifikována v srdci transplantačního dárce a příjemce 2 dny po transplantaci (viz obr. 8). Srdce naivních myší tvořilo 35,54 pmol bilirubinu na miligram celkového proteinu za hodinu (pmol/mg/h, viz obr. 8). HO aktivita byla významně zvýšena v myších srdcích transplantovaných do neošetřených ($98 \pm 7,21$ pmol/mg/h, $p = 0,001$), ošetřených CVF plus CsA ($98,3 \pm 7,23$ pmol/mg/h) nebo ošetřených CVF plus CsA plus FePPIX ($77,3 \pm 5,51$ pmol/mg/h, $p = 0,0009$) laboratorních potkanů ve srovnání s naivními srdci (viz obr. 8). HO aktivita byl inhibována na bazální hladin, jaká se vyskytuje v naivních srdcích, u myších srdcí transplantovaných do potkanů, kterým byl podán CVF plus CsA plus SnPPIX ($32,37 \pm 7,23$ pmol/mg/h). To reprezentovalo velmi významnou inhibici ve srovnání s myšími srdci transplantovanými do neošetřených ($p=0,0009$), ošetřených CVF plus CsA ($p = 0,0009$) nebo ošetřených CVF plus CsA plus FePPIX ($p= 0,0018$, obr. 8) potkanů. HO aktivita v játrech příjemců byla také zvýšena (up-regulována) po transplantaci způsobem, který se podobal transplantovaným srdcím (data nejsou ukázána). Nicméně, tneplatilo to pro příjemcovo vlastní srdce, ve kterém HO aktivita nebyla po transplantaci zvýšena (viz obr. 8). Ve štěpech transplantovaných do laboratorních

potkanů ošetřených SnPPIX se projevil progresivní infarkt myokardu, který se manifestoval již po 2 dnech po transplantaci (data nejsou ukázána). U štěpů transplantovaných do kontrolních laboratorních potkanů, kterým byl podán FePPIX, nebylo toto pozorováno (data nejsou ukázána).

Již dříve bylo ukázáno, že laboratorní potkan, který přjal myší srdeční štěp pod vlivem CVF plus CsA léčení, vytvářel anti-myší protilátky, který jsou výlučně izotypu IgM (Koyamada et al., Transplantation 65: 1210, 1998). Dodatečné ošetření SnPPIX nebo FePPIX tuto protilátkovou reakci již neovlivnilo (viz obr. 9). Vytvření protilátek proti štěpu bylo v korelaci s aktivací komplementu, jak bylo prokázáno depozitem C3 na myších endotelových buňkách (viz obr. 9). Ani léčení SnPPIX ani FePPIX neovlivňovalo depozit C3 na myších endotelových buňkách (Obr. 9).

Exogenní CO plně nahradí HO-1 enzymatickou aktivitu při potlačení akutní vaskulární rejekce

Všechna myší srdce transplantovaná do laboratorních potkanů, kterým byl podán SnPPIX a byli podrobena působení CO (400 ppm, 0,04%) dlouhodobě přežívala (viz tabulka III, dále). Použitá dávka CO (400 až 500 ppm) odpovídá přibližně jedné dvacetině smrtelné dávky (data nejsou ukázána). Laboratorní potkani a myši vystavené CO neprojevují neobvyklé reakce. CO expozice byla přerušena 14 (n = 3) nebo 16 (n = 3) dnů po transplantaci, aniž by to ovlivnilo přežití štěp, tj. štěpy byly funkční po více než 50 dnů (viz tabulka III).

Tabulka III

Exogenní CO plně nahradí HO-1 při potlačení akutní vaskulární rejekce

Léčení	Doba přežívání (dny)
CVF + CsA + SnPPIX	3, 4, 5 (n = 2), 6 (n = 4), 7 (n = 2)
CVF + CsA + SnPPIX + CO	> 50 (n=6)

Pro získání údajů uvedených v tabulce III byla myší srdce transplantována do laboratorních potkanů, kterým byl podán CVF plus CsA. Kde je to uvedeno, příjemci štěpu byl podán SnPPIX současně s expozicí nebo bez expozice k CO. Rejekce štěpu pozorovaná u potkanů, kterým byl podán SnPPIX, byla potlačena vystavením působení exogenního CO ($p < 0,0001$ ve srovnání s příjemci, kteří dostali CVF plus CsA plus SnPPIX). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Fisherova přesného testu.

Ke zjištění toho, zda exogenní CO brzdí inhibicí HO-1 enzymatické aktivity způsobenou SnPPIX, což by mohlo být příčinou schopnosti CO potlačit rejekci štěpu, bylo zkoumáno, zda CO ovlivňuje HO enzymatickou aktivitu v srdcích transplantovaných do laboratorních potkanů, kterým byl podán SnPPIX. Jak je ukázáno na obr. 10, není tomu tak. Celková HO enzymatická aktivita v srdcích transplantovaných za současného ošetření SnPPIX ($32,37 \pm 7,23$ pmol/mg/h) nebyla významně odlišná od aktivity v srdcích transplantovaných do potkanů ošetřených SnPPIX a současně podrobených působení CO ($43,6 \pm 7,57$ pmol/mg/h, $p = 0,1095$, obr. 10). Podobné výsledky byly získány pro játra a srdce v příjemci (obr. 10).

Exogenní CO je schopen nahradit HO-1 aktivitu v prevenci rejekce štěpu. To by mohlo účinkovat prostřednictvím mechanismu, který zahrnuje "naložení" exogenního CO pomocí vdechování na červené krvinky a pak prostřednictvím oběhu předání adekvátní koncentrace do štěpu. Podle této teorie, když endogenní HO-1 aktivita je inhibována SnPPIX, exogenní CO by mohl napodobovat účinek endogenního CO, který je tvořen, když HO-1 enzymatická aktivita není inhibována. Expozice transplantačního příjemce k 400 ppm exogenního CO zvýšilo karboxyhemoglobin z $0,5 \pm 1,5\%$ na $32,1 \pm 6,9\%$ (viz obr. 10). Skutečnost, že transplantovaná srdce přežívala ve zvířatech exponovaných CO, dokonce za inhibičních podmínek v přítomnosti SnPPIX, ukazuje, že tato hladina CO byla dostatečná k tomu, aby se červené krvinky „nabily“ CO, přenesly CO do štěpu a tak byla potlačena rejekce štěpu (viz obr. 10). Alternativně, oxid uhelnatý by mohl být předáván do štěpu a do všech tkání organismu jako rozpuštěný v plazmě.

Bylo také zkoumáno, zda exogenní CO potlačuje rozvoj infarktu myokardu, který charakterizuje rejekci štěpu laboratorních potkanů, kterří byli ošetřeni SnPPIX. Štěpy byly odebrány 3 dny po transplantaci a kvantifikovány z hlediska procenta oblasti poškozené infarktem (infarktová oblast). Srdce transplantovaná do neošetřených potkanů ukázala téměř kompletní transmurální infarkt pravé komory ($87,1 \pm 4,9\%$ plochy pravé komory) s rozsáhlým infarktem endomyokardu a transmurálním infarktem levé komory ($32,0 \pm 6,7\%$ plochy levé komory, data nejsou ukázána).

Infarkty vykazovaly neživé eosinofilní myokard s chybějícími jádry a s intersticiální hemoragií, edémem a neutrofily. Infarkty levé komory byly vždy infarkty endomyokardu s transmurální extenzí v závislosti na míře

infarktu, a infarkty pravé komory byly co do původu mnohem difúznějši. Procento infarktem postižené oblasti v obou komorách se obecně zvyšovalo od vrcholu k bázi srdce. Srdce transplantované do laboratorních potkanů ošetřených CVF plus CsA vykazovala jen malé, difúzní, nontransmurální oblasti infarktu v pravé komoře ($4,5 \pm 4,9 \%$), ale ne v levé ($0,72 \pm 2,1 \%$) komoře (viz tabulka IV, níže). Srdce transplantovaná do laboratorních potkanů ošetřených CVF plus CsA plus FePPIX vykazovala malé difúzní oblasti infarktu v pravé komoře ($12,2 \pm 9,5\%$) ale ne v levé komoře ($0,7 \pm 1,3 \%$) (viz tabulka IV). Tato srdce nebylo možné odlišit od těch, která byla transplantována do potkanů ošetřených CVF plus CsA bez ošetření FePPIX (data nejsou ukázána). Srdce transplantovaná do laboratorních potkanů ošetřených CVF plus CsA plus SnPPIX vykazovala významný transmurální infarkt pravé komory ($26,1 \pm 12,7 \%$) s rozsáhlým endomyokardiálním a transmurálním infarktem levé komory ($37,6 \pm 15,5 \%$) (tabulka IV), a sice s takový profilem, který byl k nerozeznání od srdcí, která byla transplantována do neošetřených laboratorních potkanů (data nejsou ukázána). Tyto léze byly specifické pro transplantovaná srdce. Nativní srdce příjemců byla zcela bez známek jakéhokoliv infarktu. Procento oblasti poškozené infarktem v srdcích transplantovaných do potkanů ošetřených SnPPIX bylo významně vyšší ($p < 0,001$) než u srdcí transplantovaných do potkanů ošetřených CVF plus CsA, buďto s nebo bez FePPIX (viz tabulka IV). Srdce transplantovaná do potkanů ošetřených SnPPIX podrobených působení exogenního CO vykazovala velmi málo infarktů pravé ($8,4 \pm 5,3\%$) a levé ($1,8 \pm 3,4\%$) komory (viz tabulka IV), s profilem velmi podobným srdcím transplantovaným do potkanů ošetřených CVF plus CsA, a to s nebo bez FePPIX (data nejsou ukázána). Procento oblasti poškozené infarktem v srdcích transplantovaných laboratorních

potkanů ošetřených SnPPIX, kteří byli podrobeni působení exogenního CO, se významně nelišilo od procenta u srdcí transplantovaných do potkanů ošetřených CVF plus CsA s nebo bez FePPIX. Nicméně, procento infarktem poškozené oblasti v těchto srdcích bylo významně odlišné ($p < 0,001$) od procenta u srdcí transplantovaných při stejném ošetření, ale bez expozice exogennímu CO.

Tabulka IV

Morfometrická analýza

Léčba	Pravá komora	Levá komora
CVF+ CsA	4,5 ± 4,9	0,7 ± 2,1
CVF+ CsA+ FePPIX	12,2 ± 9,5	0,7 ± 1,3
CVF+ CsA + SnPPIX	26,1 ± 12,7*	37,6 ± 15,5*
CVF+ CsA + SnPPIX + CO	8,4 ± 5,3	1,8 ± 3,4

Pro získání dat uvedených v tabulce IV, myší srdce byla transplantována do ($n = 3$ pro skupinu) laboratorních potkanů ošetřených CVF plus CsA. Jak je to uvedeno, příjemci štěpu byli ošetřeni FePPIX nebo SnPPIX a podrobeni působení CO. Výsledky jsou ukázány jako procento infarktové oblasti. Statistické analýzy byly provedeny s použitím ANOVA testu. Hvězdička ukazuje významný rozdíl při srovnání proti všem ostatním léčbám.

Exogenní CO potlačuje vaskulární trombózu a infiltraci monocytů/makrofágů, která charakterizuje akutní vaskulární rejekci

Myší srdce byla transplantována do laboratorních potkanů ošetřených CVF plus CsA. SnPPIX nebo FePPIX byl podán a příjemci štěpu byli exponováni CO (250 až 400 ppm). Štěpy pak byly odebrány 3 dny po transplantaci (n = 3 pro skupinu) a imunohistochemicky obarveny na potkaní IgM, potkaní a myší komplement C1q, potkaní a myší P-selektin, potkaní a myší fibrin/fibrinogen a potkaní CD45 exprimující leukocyty. Myší srdce transplantovaná do potkanů ošetřených CVF plus CsA s nebo bez FePPIX vykazovala rozsáhlé intravaskulární depozity potkaního IgM a C1q (data nejsou ukázána), ale nebyl detekovatelný žádný IgG, C3 nebo C5b-9 (data nejsou ukázána). HO-2, HO-1 a ferritin byly detekovány v buňkách endotelia a hladkého svalstva štěpu a také v myocytech srdce (data nejsou ukázána). Objevila se malá avšak detekovatelná vaskulární trombóza nebo infiltrace hostitelskými leukocyty obvykle spojená s fokálním výskytem infarktových oblastí (data nejsou ukázána). Ve vaskulárním endotelu se projevila nízká ale detekovatelná exprese P-selektinu (data nejsou ukázána). Srdce transplantovaná do laboratorních potkanů ošetřených CVF plus CsA při současné inhibici HO-1 aktivity podáním SnPPIX vykazovala podobné hladiny intravaskulárního depozitu IgM a C1q jako kontrolní potkaní ošetření FePPIX, a IgG, C3 nebo C5b-9 nebyly detekovatelné (data nejsou ukázána). Téměř všude se vyskytla vaskulární trombóza velkých koronárního cév asociovaná s agregáty krevních destiček exprimujících P-selektin a intravaskulárním fibrinem. Tromby byly také konzistentně pozorovány ve velkých koronárních cévách u báze srdce. V mikrovaskulatuře nebyly detekovatelné žádné agregáty destiček exprimujících P-selektin v microvasculature (data

nejdou ukázána). Projevila se rozsáhlá infiltrace štěpu hostitelským neutrofily a také CD45 leukocyty exprimujícími monocyty/makrofágový marker CD68/ED-1 a antigeny MHC třídy II (data nejsou ukázána). Infiltrující monocyty/makrofágy byly zjištěny v blízkosti arteriol a rozptýlené v myokardu, asociované s oblastmi infarktu.

Srdce transplantovaná do laboratorních potkanů ošetřených SnPPIX, kteří byli vystaveni působení CO, byla v podstatě nerozeznatelná od srdcí transplantovaných do potkanů ošetřených CVF plus CsA s nebo bez FePPIX (data nejsou ukázána). Tato srdce vykazovala podobné hladiny vaskulárních depozitů IgM a Clq jako srdce transplantovaná do příjemců ošetřených SnPPIX ale neexponovaných k CO (data nejsou ukázána). V podmínkách CO expozice se nevyskytly žádné známky vaskulární trombózy, jak bylo ukázáno absencí detekovatelných agregátů destiček exprimujících P-selektin nebo intravaskulárního fibrinu. P-selektin byl detekován na vaskulárním endotelu štěpu. Určitá hladina infiltrace monocytů/makrofágů byla asociována s malými fokálními oblastmi infarktu (data nejsou ukázána).

Up-regulace HO-1 v endotelových buňkách inhibuje agregaci destiček

Vzhledem k nepřítomnosti agregace destiček ve štěpech transplantovaných do laboratorních potkanů vystavených působení CO, bylo také zkoumáno, zda exprese HO-1 v endotelových buňkách inhibuje agregaci destiček *in vitro*. Myší endotelové buňky byly ošetřeny CoPPIX nebo SnPPIX, aby se indukovala nebo potlačila HO aktivita v těchto buňkách, v daném pořadí. Krevní destičky byly převrstveny na endotelové buňky a testovány na schopnost agregovat se po stimulaci ADP

(2 μ M). Krevní destičky převstvené na neošetřené endotelové buňky normálně agregují, když jsou stimulovány ADP (viz obr. 11). Když byly krevní destičky vystaveny působení endotelových buněk, které byly předem ošetřeny SnPPIX, agregace destiček byla zesílena ve srovnání s krevními destičkami vystavenými neošetřeným endotelovým buňkám (obr. 11). Toto pozorování ukazuje, že neošetřené endotelové buňky mají základní hladinu HO aktivity, pravděpodobně v důsledku konstitutivní exprese HO-2 v těchto buňkách (obr. 11). Když byly krevní destičky vystaveny působení endotelových buněk, které byly předem ošetřeny CoPPIX, agregace destiček byl významně inhibována ve srovnání s krevními destičkami vystavenými neošetřeným nebo SnPPIX ošetřeným endotelovým buňkám (obr. 11). Tento inhibiční účinek byl potlačen, když byly krevní destičky vystaveny působení endotelových buněk, které byly ošetřeny jak CoPPIX tak SnPPIX (obr. 11). CoPPIX a SnPPIX společně vedly k up-regulaci exprese HO-1 v kultivovaných endotelových buňkách (data nejsou ukázána). Rozdílné účinky těchto protoporfyrinů by mohly být přičítány schopnosti SnPPIX působit jako silný inhibitor HO-1 enzymatické aktivity.

HO-1 generuje CO, který potlačuje apoptózu endotelových buněk

Jeden z hlavních rysů, který charakterizuje rejekci myšího srdce transplantovaného do laboratorního potkana ošetřeného SnPPIX je velice rozsáhlá apoptóza endotelových buněk a srdečních myocytů (obr. 12). Apoptóza se nevyskytuje u myších srdcí transplantovaných do laboratorního potkana ošetřeného FePPIX (viz obr. 12). Vzhledem ke schopnosti HO-1 potlačit apoptózu endotelových buněk *in vitro* (Soares et al., Nature Med. 4, 1073-1077, 1998, and Brouard et al., J. Exp. Med. 192:

1015, 2000) bylo zkoumáno, zda tento cytoprotektivní účinek je zprostředkováván CO, který se vytváří. Apoptóza se nevyskytovala u myších srdcí transplantovaných do laboratorní potkanů ošetřených SnPPIX a vystavených působení CO, což vede k domněnce, že by to právě mohlo být toto vysvětlení (viz obr. 12). Bylo také zkoumáno *in vitro*, zda v podmínkách inhibice HO-1 aktivity SnPPIX exogenní CO může zabránit endotelovým bunkám, aby nepodstupovaly apoptózu zprostředkovanou TNF- α . Data znázorněná na obr. 6 svědčí pro to, že tato představa platí. Nadměrná exprese HO-1 potlačuje TNF- α -zprostředkovanou apoptózu endotelových buněk, jak k tomu dochází například v přítomnosti aktinomycinu D (viz obr. 12). Antiapoptotický účinek HO-1 je zprostředkovaný tedy její enzymatickou aktivitou, protože ošetření endotelových buněk SnPPIX blokovalo antiapoptotický účinek HO-1 (obráz. 12). V podmínkách inhibice HO-1 aktivity SnPPIX, exogenní CO (10000 ppm) potlačil TNF- α -zprostředkovanou apoptózu, takže lze navrhnout, že HO-1 potlačuje apoptózu endotelových buněk prostřednictvím tvorby CO (viz obr. 12).

Oxid uhelnatý potlačuje rozvoj arteriosklerózy asociované s transplantátem

Aorty z hnědých laboratorních potkanů (Brown Norway) byly transplantovány do hnědých laboratorních potkanů (syngenních), neošetřených laboratorních potkanů kmene Lewis (allogenních) nebo potkanů kmene Lewis vystavených působení oxidu uhelnatého (250 ppm, allogenní s oxidem uhelnatým). Vzorky byly odebrány 56 dnů po transplantaci a obarveny modifikovaným Massonovým trichromatickým barvením pružných tkání nebo eosinem-hematoxylinem. Segmenty aorty z hnědých laboratorních potkanů transplantované do laboratorních potkanů kmene Lewis

vyvolávaly arteriosklerotické léze, které jsou shodné s lézemi asociovanými s chronickou rejekcí štěpu (data nejsou ukázána). Tyto léze se začaly objevovat 20 až 30 dnů po transplantaci a byly výrazně zřetelnější za 50 až 60 dnů (data nejsou ukázána). Z tohoto důvodu byly všechny analýzy prováděny 56 dnů po transplantaci.

Léze byly charakterizovány hyperplázií intimy, ztrátou buněk hladkého svalstva medie (SMC) a akumulací leukocytů v adventicii (vnější obalové vrstvě), a nebyly pozorovány v aortách transplantačních příjemců (data nejsou ukázána). Žádné známky těchto lézí nebyly pozorovány, když segmenty aorty laboratorní potkana byly transplantovány do syngenních příjemců. Aby mohlo být testováno, zda CO potlačuje rozvoj těchto lézí, aortální štěpy byly transplantovány do allogenních příjemců, kteří pak byly vystaveni působení CO (250 ppm) ihned po transplantaci a po následujících 56 dnů. Hyperplázie intimy byla inhibována u aortálních štěpů transplantovaných do příjemců vystavených působení CO ve srovnání se štěpy transplantovanými do příjemců vystavených jen vzduchu, stejně tak jako akumulace leukocytů v adventicii (data nejsou ukázána). CO neměl žádný významný účinek na ztrátu SMC medie ve srovnání se štěpy transplantovanými do neošetřených příjemců (data nejsou ukázána).

Příklad 3

Postupy pro ošetřování orgánů a tkání, dárců a příjemců, při transplantaci

Následující příklad ukazuje postupy (protokoly) pro použití při ošetřování dárce, orgánu a příjemce aplikací oxidu uhelnatého během transplantačního výkonu. Kterýkoliv jeden nebo více z následujících postupů může být použit v transplantačním výkonu.

Ošetřování dárce

Před tím, než se odeberou orgány nebo tkáně, dárce může být podroben působení inhalovaného oxidu uhelnatého (250 ppm) po jednu hodinu. Podáváné dávky mohou kolísat v rozmezí od 10 ppm do 1000 ppm po dobu jedné až šesti hodin nebo po celé období od okamžiku, od kdy je možné ošetřovat dárce, u něhož byla stanovena klinická smrt (kadaver) až do odebrání orgánu nebo tkáně. ošetření by mělo být zahájeno co nejdříve je to možné, jakmile je stanovena klinická smrt. Při některých aplikacích může být užitečné zahájit ošetřování již před klinickou smrtí.

U zvířat, s výjimkou člověka (např. prasat), která slouží jako dárce xenotransplantátů, může být ještě živé zvíře podrobeno působení relativně vysoké hladiny inhalovaného oxidu uhelnatého, podle potřeby tak dlouho, aby vytvořený karboxyhemoglobin nenarušil životaschopnost a funkci orgánu, který má být transplantován. Například mohou být užity hladiny vyšší než 500 ppm (např. 1000 ppm nebo vyšší, až do 10000 ppm, zejména pro krátkou expozici).

Ošetřování orgánu *in situ*

Před tím, než je orgán odebrán od dárce, může být propláchnut roztokem, např. pufrem nebo médiem, bez červených krvinek, zatímco je stále ještě v těle dárce. Záměrem je proplachovat orgán roztokem saturovaným oxidem uhelnatým a udržovat atmosféru oxidu uhelnatého, aby obsah oxidu uhelnatého zůstal na saturační hladině. Proplachování může probíhat po dobu alespoň 10 minut, např. 1 hodinu, několik hodin nebo delší dobu. Roztok by měl v ideálním případě k buňkám orgánu dodat co možná nejvyšší koncentraci oxidu uhelnatého.

Ošetřování orgánů nebo tkání

Orgány nebo tkáně mohou být uchovávány/konzervovány v médiu, které obsahuje oxid uhelnatý, a to od okamžiku vyjmutí z těla dárce do okamžiku transplantace do těla příjemce. Toto může být provedeno tak, že se udržuje orgán nebo tkáň v médiu obsahujícím CO, nebo tak, že se orgán/tkáň perfunduje takovým médiem. Protože tato situace nastává *ex vivo* spíše než ve zvířeti, mohou být použity i velice vysoké koncentrace plynného CO (např. 10000 ppm udrží médium saturované CO).

Ošetřování příjemce

Příjemce může být vystaven působení oxidu uhelnatého. Ošetřování může začít v den transplantace alespoň 30 minut před zahájením chirurgického výkonu. Alternativně může začít alespoň 30 minut před reperfúzí orgánu v příjemci. Může pak pokračovat alespoň 30 minut, např. 1 hodinu. Dávky oxidu

uhelnatého mezi 10 ppm a 3000 ppm mohou být podávány po různé dlouhou dobu, např. minuty nebo hodiny, a mohou být podáván v den transplantace a v následujících dnech. Například příjemce může inhalovat koncentraci oxidu uhelnatého, např. 3000 ppm, ve třech po sobě jdoucích zadržovaných vdechách trvajících 10 vteřin. Alternativně, příjemce může inhalovat např. 200 ppm po delší dobu, například po 20 dnů. Koncentrace karboxyhemoglobinu může být použita jako vodítko pro vhodný podávání oxidu uhelnatého pacientovi. Obvykle by ošetřování příjemců nemělo vést ke zvýšení hladiny karboxyhemoglobinu nad hladinu, která je považována za přijatelné riziko pro pacienta, který potřebuje transplantaci.

Další provedení vynálezu

Je třeba rozumět, že zatímco vynález byl popsán v předchozím textu velmi podrobně a také formou příkladů provedení, tento popis je zamýšlen jen pro ilustraci a nijak neomezuje rozsah vynálezu, který je definován připojenými nároky. Další aspekty, výhody a modifikace jsou v rozsahu následujících patentových nároků.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití oxidu uhelnatého pro přípravu farmaceutické kompozice pro zlepšení přežití nebo funkce orgánu po transplantaci do příjemce, přičemž
 - a) farmaceutická kompozice je podávána dárce,
 - b) od dárce je získán orgán vybraný ze skupiny, kterou tvoří: ledvina, játra, srdce, kůže, tenké střevo a slinivka, a
 - c) orgán je transplantován příjemci.

2. Použití podle nároku 1, kde farmaceutická kompozice je podávána živému dárce nebo dárce, u kterého byla stanovena klinická smrt.

3. Použití podle nároku 1, kde farmaceutická kompozice obsahující oxid uhelnatý je podávána dárce před a po klinické smrti.

4. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde farmaceutická kompozice je první farmaceutická kompozice a použití dále zahrnuje *in situ* ošetření orgánu dárce druhou farmaceutickou kompozicí obsahující oxid uhelnatý.

5. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, které dále zahrnuje před transplantačním krokem *ex vivo* ošetření orgánu druhou farmaceutickou kompozicí obsahující oxid uhelnatý.

6. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde farmaceutická kompozice je první farmaceutická kompozice a použití dále zahrnuje krok podání příjemci druhé

farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý před krokem (c), během kroku (c), po kroku (c), před a v průběhu kroku (c), před a po kroku (c) nebo před, v průběhu a po kroku (c).

7. Použití kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kde orgánem jsou játra, ledvina, srdce, slinivka, tenké střevo nebo kůže.
8. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, kde dárce a příjemce patří ke stejnému nebo odlišnému biologickému druhu.
9. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, kde jak dárce tak příjemce jsou lidé nebo zvířata s výjimkou člověka, nebo kde dárce je zvíře s výjimkou člověka a příjemce je člověk.
10. Použití oxidu uhelnatého pro přípravu farmaceutické kompozice pro zlepšení přežití nebo funkce orgánu po transplantaci příjemci, přičemž
 - a) je poskytnut orgán od dárce,
 - b) farmaceutická kompozice je podávána orgánu a
 - c) orgán je transplantován příjemci.
11. Použití podle nároku 10, kde krok (b) je prováděn tak, že se orgán *in situ* perfunduje, přičemž je orgán v dárce.
12. Použití podle nároku 10, kdy krok (b) je prováděn *ex vivo*.
13. Použití podle nároku 12, dále zahrnující kroky před krokem (b), kdy je podávána dárce druhá farmaceutická kompozice obsahující oxid uhelnatý, a orgán se odebere z dárce.

14. Použití podle nároku 13, kdy druhá farmaceutická kompozice je podávána živému dárce nebo dárce, u kterého byla stanovena klinická smrt.
15. Použití podle nároku 13, kdy druhá farmaceutická kompozice je podávána dárce před a po stanovení klinické smrti.
16. Použití podle kteréhokoliv z nároků 10 až 15, dále zahrnující krok podávání příjemci druhé farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý před krokem (c), během kroku (c), po kroku (c), před a během kroku (c), před a po kroku (c) nebo před, během a po kroku (c).
17. Použití podle kteréhokoliv z nároků 10 až 16, kdy orgánem jsou játra, ledvina, srdce, slinivka, plíce, tenké střevo nebo kůže.
18. Použití podle kteréhokoliv z nároků 10 až 17, kdy patří ke stejnému nebo odlišnému biologickému druhu.
19. Použití oxidu uhelnatého pro přípravu farmaceutické kompozice pro zlepšení přežití transplantovaného orgánu v příjemci, přičemž
- a) orgán je poskytnut od dárce,
 - b) orgán je transplantován do příjemce a
 - c) farmaceutická kompozice je podávána příjemci před krokem (b), během kroku (b), po kroku (b), před a během kroku (b), před a po kroku (b) nebo před, během a po kroku (b).
20. Použití podle nároku 19, kdy farmaceutická kompozice je podávána příjemci během 1 až 20 dnů po (b), alespoň jednou

v období, které začíná 21 dnů po (b), nebo mnohokrát nebo nepřetržitě během období, které začíná 21 dnů po (b).

21. Použití podle nároky 19 nebo 20, kdy farmaceutický přípravek je podáván příjemci po zjištění, že transplantovaný orgán podstupuje nebo začíná proces chronické rejekce nebo po zjištění, že transplantovaný orgán podstupuje nebo začíná proces akutní rejekce.
22. Použití podle kteréhokoliv z nároků 19 až 21, dále zahrnující krok, před tím, než je odebrán orgán od dárce, podávání dárce druhé farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý.
23. Použití podle nároku 22, kdy druhá farmaceutická kompozice je podávána živému dárce nebo dárce, u kterého byla stanovena klinická smrt.
24. Použití podle nároku 19, dále zahrnující před krokem (b) podávání do orgánu druhé farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý.
25. Použití podle nároku 24, kdy druhá farmaceutická kompozice je podávána do orgánu *in situ* v dárce a/nebo *ex vivo*.
26. Použití podle kteréhokoliv z nároků 19 až 25, kde orgánem jsou játra, ledvina, srdce, slinivka, plíce, tenké střevo nebo kůže.
27. Použití kteréhokoliv z nároků 19 až 26, kde dárce a příjemce patří ke stejnému nebo odlišnému biologickému druhu.

28. Použití oxidu uhelnatého pro přípravu farmaceutické kompozice pro zlepšení funkce dárcovského orgánu, přičemž

- (a) orgán marginálního dárce je poskytnut a
- (b) orgán je vystaven působení farmaceutické kompozice.

29. Způsob uchovávání živočišných buněk *in vitro*, vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:

- a) poskytne se nádoba obsahující stlačený plyn obsahující plynný oxid uhelnatý,
- b) poskytnou se izolované buňky *in vitro*, kteréžto buňky jsou primární buňky nebo kmenová buňky,
- c) uvolňuje se stlačený plyn z nádoby, čímž se vytváří atmosféra obsahující plynný oxid uhelnatý, a
- d) zvířecí buňky se uchovávají *in vitro* v přítomnosti atmosféry obsahující plynný oxid uhelnatý.

30. Způsob uchovávání živočišných buněk *in vitro*, vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:

- a) poskytne se kultivační médium obsahující alespoň 0,0001 g CO/100 g média, a
- b) izolované buňky se uchovávají v médiu.

31. Použití oxidu uhelnatého pro přípravu kultivačního média pro uchovávání živočišných buněk před tím, než jsou transplantovány příjemci, kdy se buňky uchovávají způsobem podle nároku 30.

32. Použití podle nároku 31, kdy jsou živočišné buňky získány z příjemce nebo z dárce, který není příjemcem.

33. Použití podle nároku 31 nebo 32, dále zahrnující podávání

kompozice obsahující oxid uhelnatý příjemci před transplantací, v průběhu transplantace, po transplantaci, před a po transplantaci nebo před, během a po transplantaci.

34. Použití podle nároku 31, kdy živočišné buňky jsou získány od dárce způsobem zahrnujícím:
- a) podávání kompozice obsahující oxid uhelnatý dárce, a
 - b) získání buněk z tkáně dárce.

35. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 29 až 34, kdy živočišná buňka je součástí pankreatických ostrůvků, jaterní buňka, pankreatická β -buňka, fibroblast, buňka kostní dřeně, nervová buňka, myocyt nebo kmenová buňka.

36. Použití oxidu uhelnatého pro přípravu farmaceutické kompozice pro zlepšení přežití živočišných buněk po odebrání od dárce, přičemž
- a) farmaceutická kompozice je podávána živému dárce nebo dárce, u kterého byla stanovena klinická smrt,
 - b) izolovaná buňka je získána od dárce.

37. Použití podle nároku 36, kdy farmaceutická kompozice je stlačený plyn.

38. Použití podle nároku 36 nebo 37, dále zahrnující: (c) uchovávání buněk *in vitro* v přítomnosti druhé farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý.

39. Použití podle nároku 38, kdy buňky z kroku (c) jsou uloženy v tekutém médiu.

40. Použití podle nároku 39, kdy kroku (c) je prováděn tak, že je poskytnut zdroj stlačeného plynného oxidu uhelnatého a tekuté médium se přivede do kontaktu s plynným oxidem uhelnatým uvolňovaným ze zdroje stlačeného plynného oxidu uhelnatého.
41. Použití podle nároku 39, kdy tekuté médium obsahuje oxid uhelnatý.
42. Použití podle kteréhokoliv z nároků 36 až 41, kdy buňka je část pankreatických ostrůvků, jaterní buňka, pankreatická β -buňka, fibroblast, buňka kostní dřeně, neuron, myocyt nebo kmenová buňka.
43. Použití oxidu uhelnatého pro přípravu farmaceutické kompozice pro zlepšení přežití buněk po odebrání z dárce, přičemž
- a) farmaceutická kompozice je podávána živému dárce nebo dárce, u kterého byla stanovena klinická smrt,
 - b) izolovaná buňky jsou odebrány od dárce, a
 - c) buňky jsou transplantovány příjemci.
44. Použití podle nároku 43, kdy dárce není příjemcem nebo dárce a příjemce jsou stejným zvířetem.
45. Použití podle nároku 43 nebo 44, dále zahrnující krok podávání druhé farmaceutické kompozice obsahující oxid uhelnatý příjemci před krokem transplantace, během kroku transplantace, po kroku transplantace, před a po kroku transplantaci nebo před, během a po kroku transplantace.
46. Použití kteréhokoliv z nároků 43 až 46, kdy buňka je částí

pankreatických ostrůvků, jaterní buňka, pankreatická β -buňka, fibroblast, buňka kostní dřeně, neuron, myocyt nebo kmenová buňka.

47. Použití plynného oxidu uhelnatého pro přípravu farmaceutické kompozice pro zlepšení přežití nebo funkce živočišných buněk transplantovaných příjemci, přičemž

- a) živočišné buňky jsou transplantovány příjemci, a
- b) příjemce je přiveden k tomu, aby inhaloval farmaceutickou kompozici před, během a/nebo po kroku transplantace.

48. Použití podle nároku 47, kdy plynný oxid uhelnatý je dodáván ve formě nádoby obsahující stlačený plyn obsahující oxid uhelnatý.

49. Použití podle nároku 47, dále zahrnující krok, kdy se buňky před krokem transplantace vystaví *ex vivo* působení kompozice obsahující oxid uhelnatý.

50. Použití podle kteréhokoliv z nároků 47 až 49, kdy před krokem transplantace jsou živočišné buňky uchovávány v tekutém médiu, které obsahuje alespoň 0,0001 g oxidu uhelnatého ve 100 g média.

51. Použití podle nároku 47, kdy před krokem transplantace jsou buňky uchovávány *in vitro* v atmosféře obsahující oxid uhelnatý.

52. Použití podle kteréhokoliv z nároků 47 až 51, kdy buňky jsou odebrány z příjemce nebo z dárce, který není příjemcem.

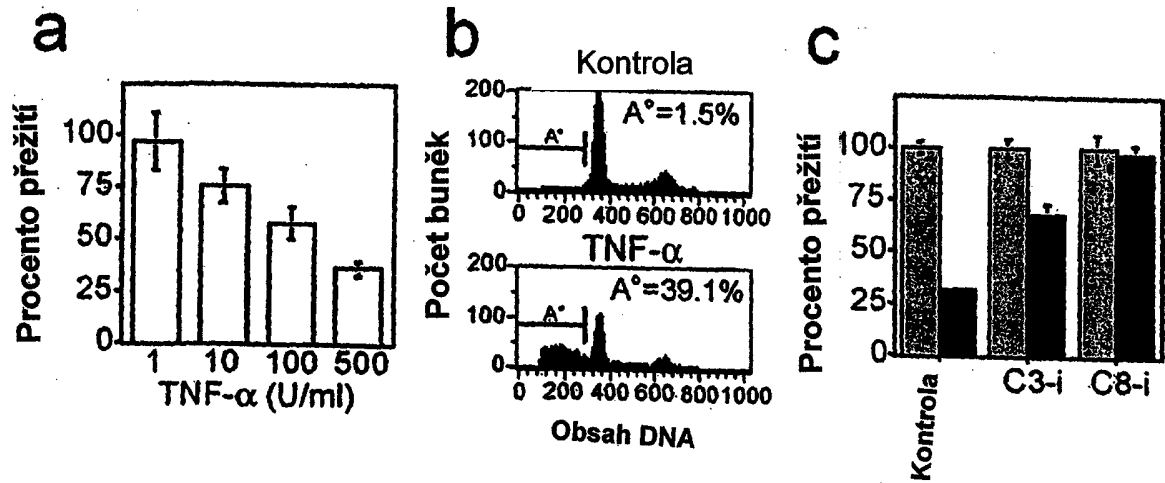
53. Použití podle kteréhokoliv z nároků 47 až 52, kdy buňky jsou odebrány od dárce před tím, než jsou transplantovány příjemci, a farmaceutická kompozice obsahující oxid uhelnatý je podávána dárci před a/ nebo během odebírání buněk od dárce.
54. Použití podle kteréhokoliv z nároků 47 až 53, kdy buňka je částí pankreatických ostrůvků, jaterní buňka, pankreatická β -buňka, fibroblast, buňka kostní dřeně, neuron, myocyt nebo kmenová buňka.
55. Použití plynného oxidu uhelnatého pro přípravu farmaceutické kompozice pro zlepšení přežití transplantovaných buněk v příjemci po transplantaci, přičemž farmaceutická kompozice je podávána příjemci před, během nebo po transplantaci buněk do příjemce.
56. Výrobek, vyznačující se tím, že obsahuje nádobu obsahující stlačený plyn obsahující nejméně 0,001 ppm oxidu uhelnatého a označení popisující použití plynu ke zlepšení přežití izolovaných živočišných buněk před, během nebo po transplantaci buněk pacientovi.
57. Sterilní buněčné médium vyznačující se tím, že obsahuje: (a) živiny vhodné pro uchovávání živočišných buněk v kultuře a (b) alespoň přibližně 0,0001 g oxidu uhelnatého ve 100 g média.
58. Způsob *in vitro* uchovávání izolovaných živočišných buněk vhodných pro transplantaci, vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:

- a) poskytne se nádoba obsahující stlačený plyn obsahující plynný oxid uhelnatý,
- b) poskytnou se izolované živočišné buňky *in vitro*, které jsou uloženy v médiu obsahujícím rozpuštěný oxid uhelnatý,
- c) uvolňuje se stlačený plyn z nádoby, čímž se připravuje atmosféra obsahující plynný oxid uhelnatý, a
- d) buňky se uchovávají v přítomnosti této atmosféry.

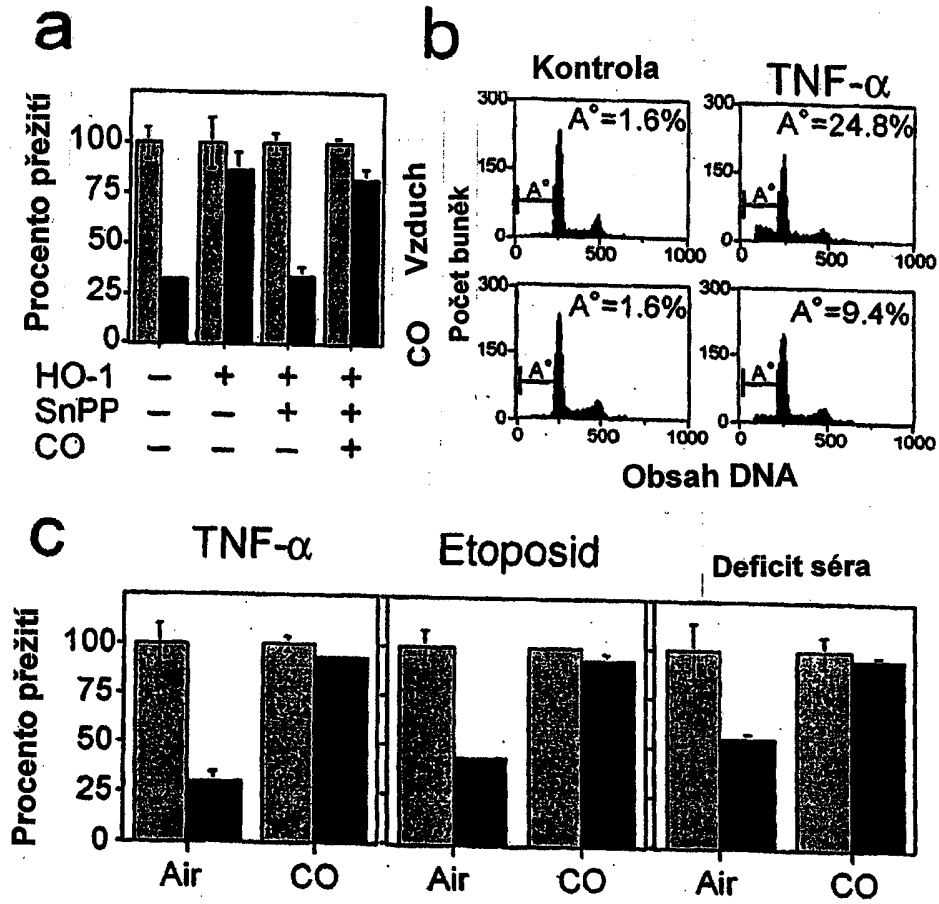
59. Použití plynného oxidu uhelnatého pro přípravu média pro uchovávání živočišných buněk před tím, než jsou transplantovány příjemci, přičemž buňky se uchovávají způsobem podle nároku 58.

60. Použití živočišných buněk uchovávaných způsobem podle nároku 30 pro přípravu farmaceutického přípravku pro transplantaci.

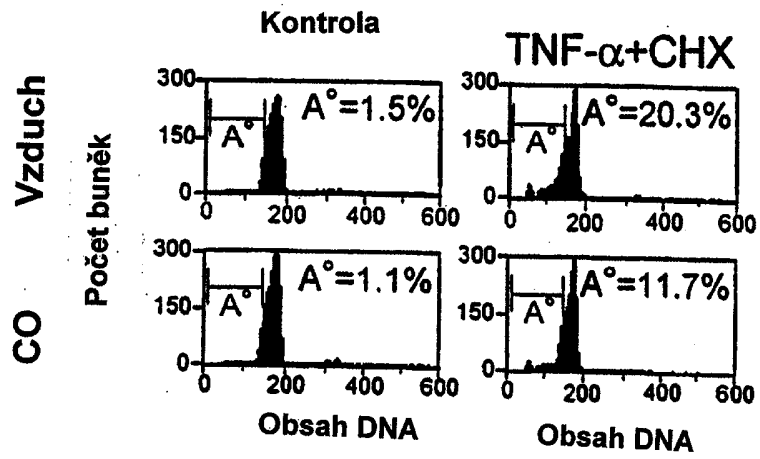
61. Použití živočišných buněk uchovávaných způsobem podle nároku 58 pro přípravu farmaceutického přípravku pro transplantaci.



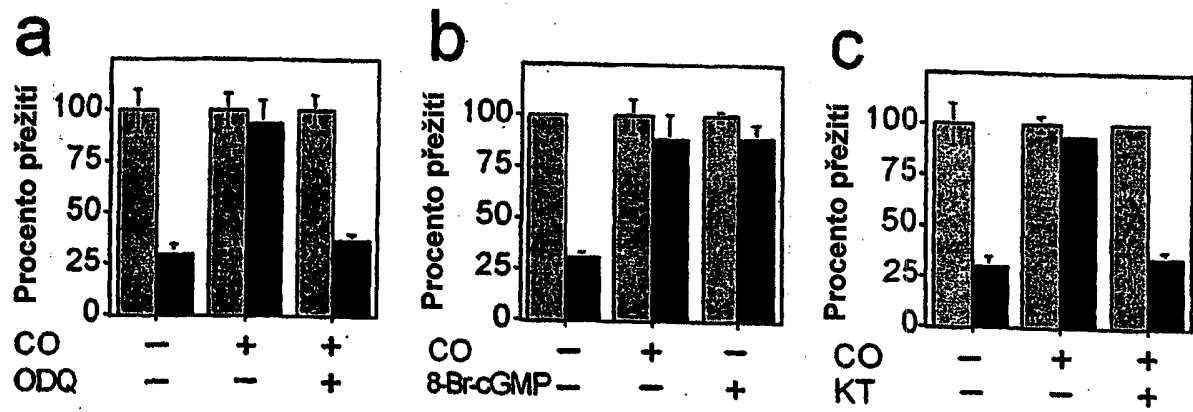
Obr. 1



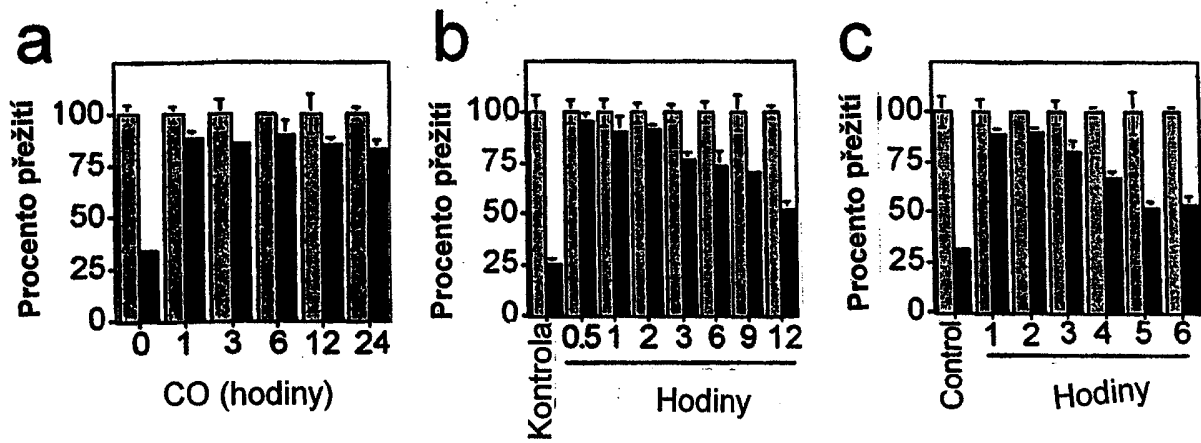
Obr. 2



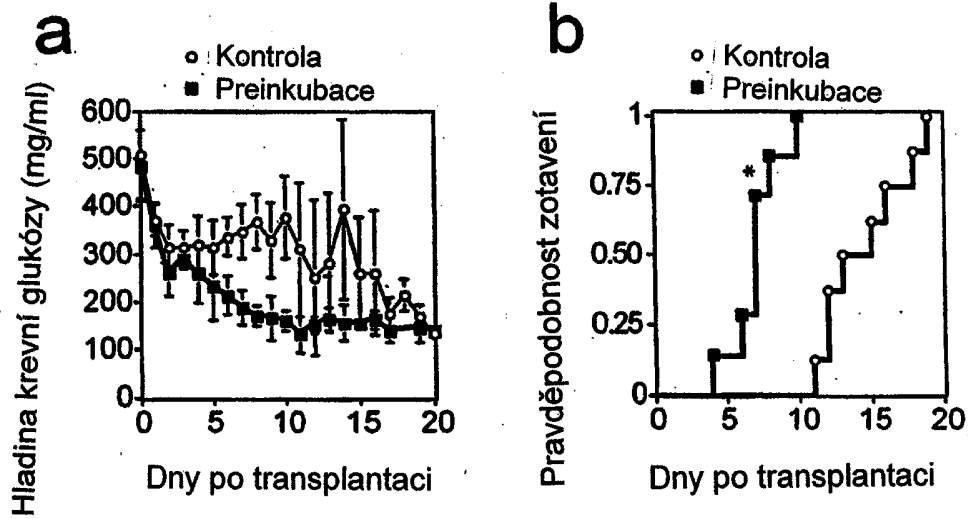
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

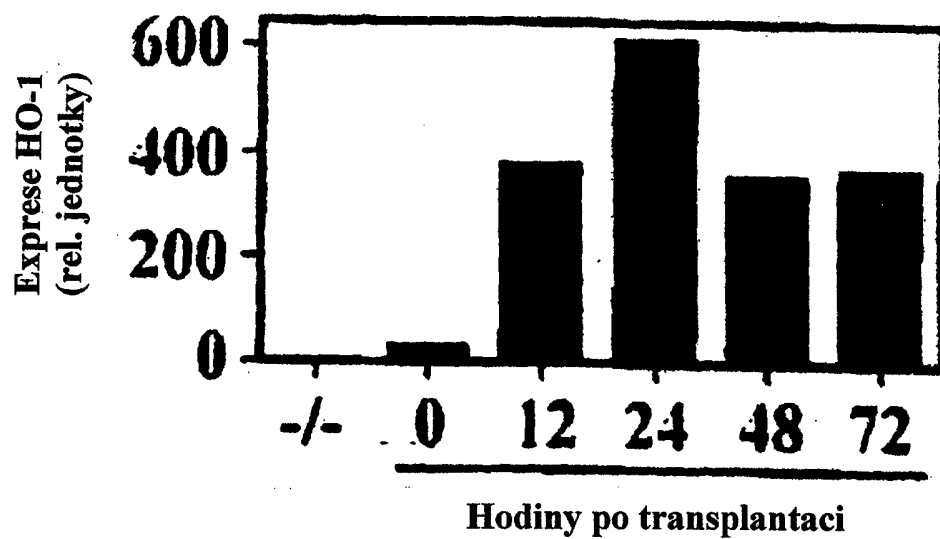


Obr. 6

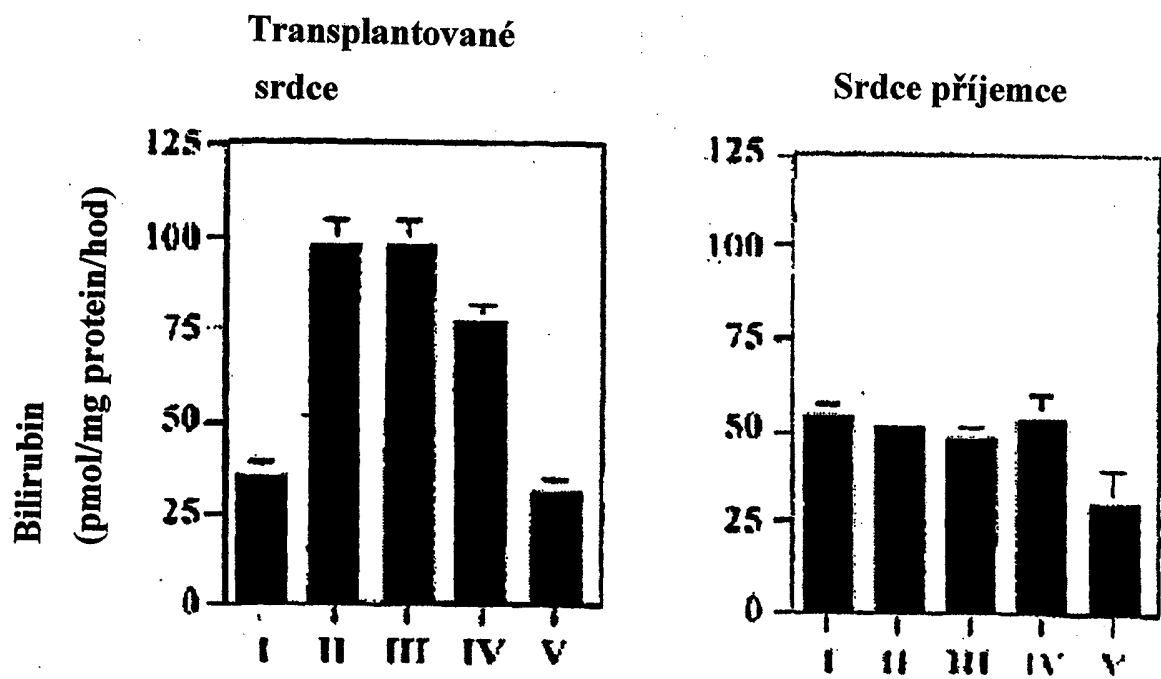
12.03.04

2003-3448

7/12

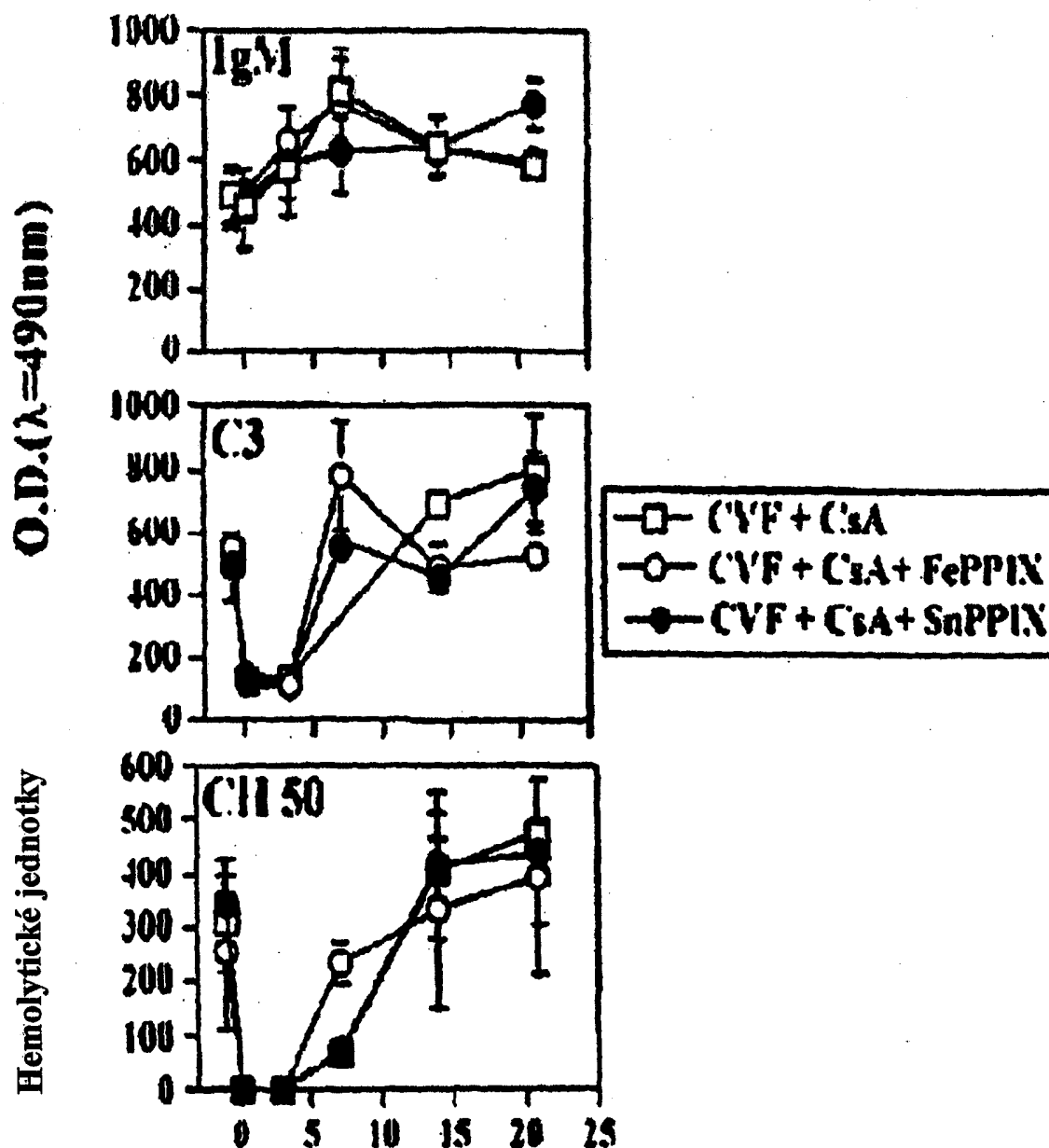


Obr. 7



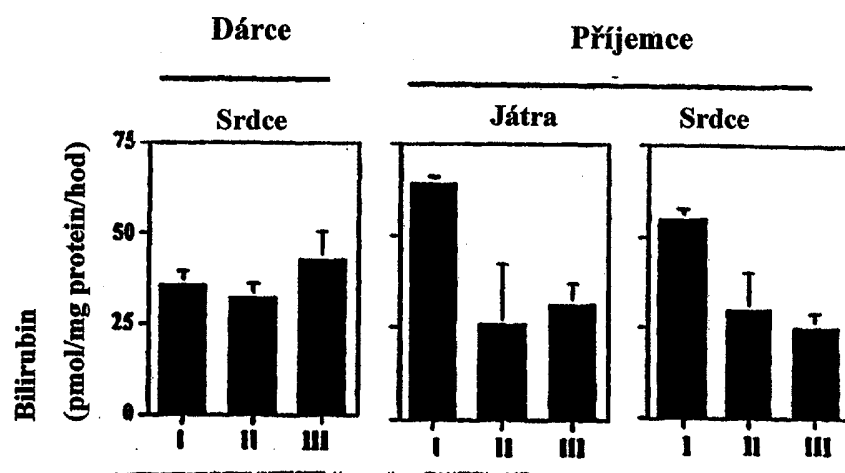
Obr. 8

9/12

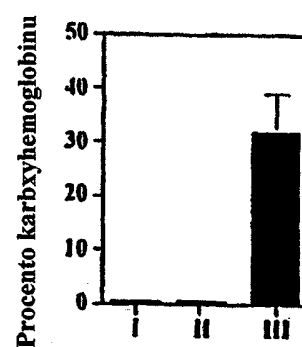


Obr. 9

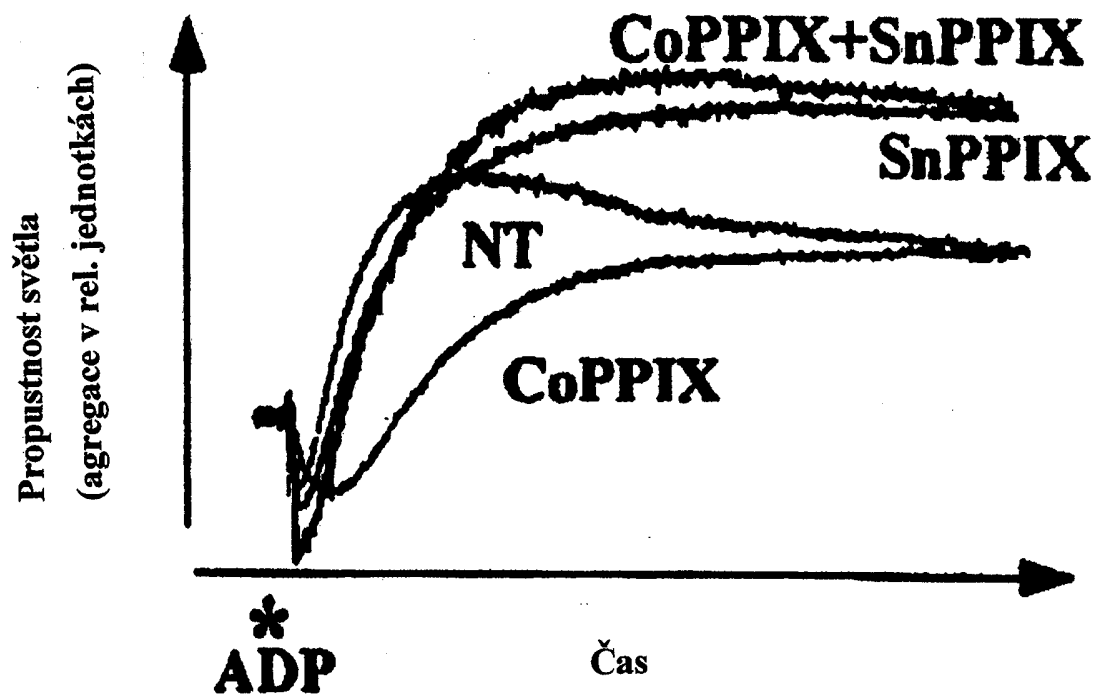
A



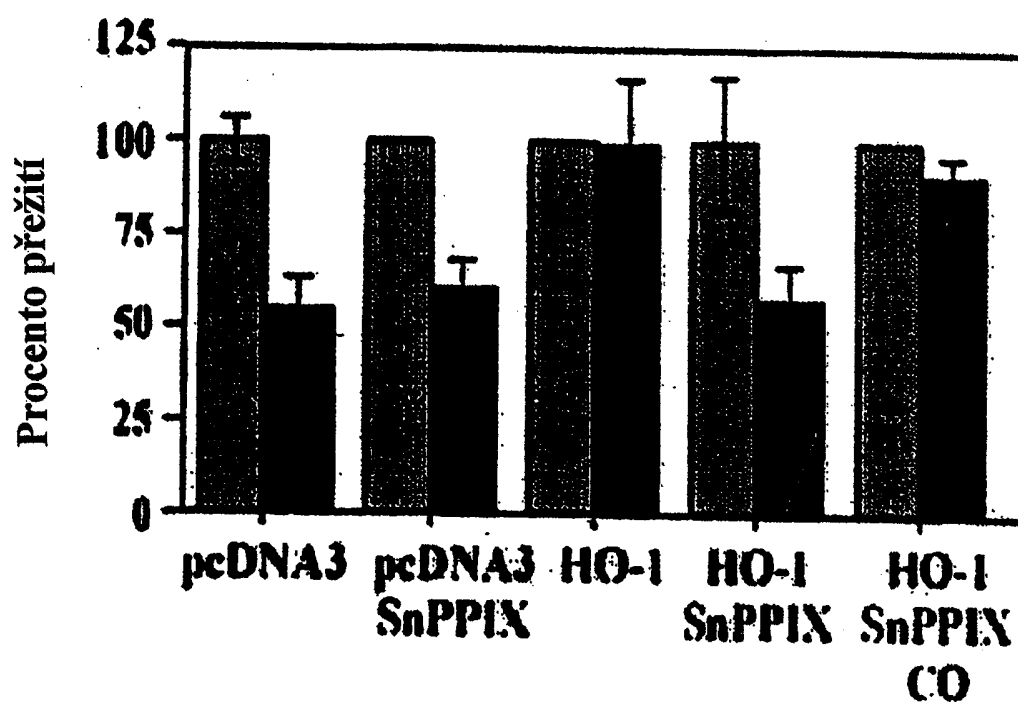
B



Obr. 10



Obr. 11



Obr. 12