SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 08.03.94

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/029 422

(32) Dátum priority: 09.03.93

(33) Krajina priority: US

(40) Dátum zverejnenia: 04.12.96

(86) Číslo PCT: PCT/US94/02558, 08.03.94

(21) Číslo dokumentu:

1031-95

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

A 61K 31/56

(71) Prihlasovateľ: UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION, Salt Lake City, UT, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Daynes Raymond A., Park City, UT, US;
Araneo Barbara A., Salt Lake City, UT, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie derivátu dehydroepiandrosterónu na výrobu farmaceutických prostriedkov a farmaceutický prostriedok obsahujúci derivát dehydroepiandrosterónu**

(57) Anotácia:
Použitie derivátu dehydroepiandrosterónu (DHEA), napríklad 16α-bróm-DHEA, androsténdiolu a derivátov, ktoré majú postranné reťazce v polohe 4 a/alebo 7 a nenarušujú natívnu aktivitu DHEA, a sú schopné inhibovať sulfotransferázu na predchádzanie konverzie DHEA na DHEA-S na výrobu farmaceutického prostriedku na prevenciu progresívnej nekrózy tkaniva, reperfúzneho poškodenia, bakteriálnej translokácie a syndrómu dýchacích ťažkostí dospelých.

POUŽITIE DERIVÁTU DEHYDROEPIANDROSTERÓNU NA VÝROBU FARMACEUTICKÝCH PROSTRIEDKOV A FARMACEUTICKÝ PROSTRIEDOK OBSAHUJÚCI DERIVÁT DEHYDROEPIANDROSTERÓNU

Oblasť techniky

Vynález nadväzuje na prihlášku vynálezu číslo 08/29,422, podanú 9. marca 1993 a týka sa spôsobu prevencie a znižovania vplyvov ischémie, spôsobov prevencie alebo znižovania bakteriálnej translokácie a syndrómu dýchacích ťažkostí dospelých. Podľa vynálezu sa takýmto chorobným stavom predchádza podávaním dehydroepiandrosterónu (DHEA) alebo jeho derivátov.

Doterajší stav techniky

Ischémia môže byť spôsobená napríklad infarktom, popáleninami, chirurgickou traumou a úrazovou traumou. Ischémii môže tiež predchádzať reperfúzne poškodenie.

Zistilo sa, že udržiavanie vaskulárnej integrity je dôležitým faktorom odozvy na takéto poškodenia. Komplex hemostatických mechanizmov koagulácie, funkcie doštičiek a fibrinolysis minimalizuje nepriaznivé následky vaskulárnych porúch a urýchľuje vaskulárnu opravu. Vaskulárne endotelial a bunky hladkého svalstva aktívne udržiavajú odolnosť cievnych stien voči trombom expresiou niektorých antitrombotických charakteristík. Pri poruchách vaskulárnej bunky vykazujú expresiu trombogenických charakteristík. Hemostatické charakteristiky normálnych a narušených vaskulárnych buniek popísal Rodgers, G. M. (1988, FASEB J. 2, str. 116 až 123).

Porucha dodávania okysličenej krvi do tkanív sa označuje ako ischémia. Je známe, že pôsobením ischémie dochádza k postupnému, to znamená v priebehu doby pokračujúcemu poškodeniu bunečnej vitality a tkanivo sa nekrotizuje. Celková pretrvávajúca ischémia s obmedzenou perfúziou kyslíka pre tkanivá vedie k smrti buniek a prípadne k nekróze navodenej koaguláciou navzdory reperfúzii arteriálnou krvou. Ischémia je pravdepodobne najdôležitejšou

príčinou koagulatívnej nekrózy v ľudských chorobách. Významný podiel ťažkostí, spojených s ischémiou, je výskyt príhod spojených s reperfúziou ischemických tkanív označovaných ako reperfúzne poškodenie. Z klinického hľadiska sú tri stupne poškodenia buniek v závislosti od trvania ischémie:

1. Pri krátko trvajúcej ischémii reperfúzia (a opätovné dodanie kyslíka) dokonale obnovuje štrukturálnu a funkčnú integritu bunky. Nech už prišlo k akémukoľvek poškodeniu buniek, zotavujú sa bunky reoxygenáciou dokonale. Napríklad zmeny membránového potenciálu, metabolizmu a ultraštruktúry sú krátkodobé, pokiaľ sa rýchlo obnoví cirkulácia.
2. Pri dlhodobejšej ischémii nie je reperfúzia spojená s obnovením štruktúry a funkcie bunky, avšak skôr s poškodením a smrťou bunky. Odozvou na reoxygenáciu v tomto prípade je rýchly a intenzívny zápal.
3. Smrteľné poškodenie bunky sa môže vyvinúť pri predĺženom období ischémie, kde reperfúzia nie je faktorom.

Reverzibilita poškodenia bunky ako dôsledok ischémie je daná nielen typom a trvaním poškodenia, ale tiež štítovou bunkou. Neuróny sú veľmi vysoko citlivé na ischémiu, zatiaľ čo myokardiálne, pulmonárne, hepatické a renálne tkanivá sú stredne citlivé. Fibroblasty, epidermis a skeletálne svalstvo má najnižšiu citlivosť na ischemické poškodenie a vyžaduje veľa hodín bez dodania krvi, aby došlo k vývoju nezvrátiteľného poškodenia.

Blízkosť endotelia k cirkulujúcimi leukocytom vytvára dôležitý štít pre neutrofilnú adherenciu a nasledujúce poškodenie vaskulárneho a parenchymálneho tkaniva. Interakcia aktivovaných endoteliálnych buniek a neutrofilov je bezprostredne včasný a nutný prípad pri ischemickom/reperfúznom poškodení (Hernandez L.A. a kol. 1987, Am. J. Physiol. 253 (Heart Cir. Physiol. 22), H699 až H703, Luccesi B.R., 1990, Am. J. Cardiology 65, str. 141 až 231). Adhezívne vlastnosti endotelia sa rýchlo navodzujú zavedením okysličenej krvi. K odozve na kyslík sa endoteliálne bunky aktivujú na vytváranie určitých produktov vrátane leukotriénu B4 (LTB4), faktoru aktivujúceho doštičky (PAF)

a kol., vyd. WB Saunders, Philadelphia, str. 1 až 81, 1989).

V ceste závislej od xantinoxidázy vytvárajú puríny, odvodené od katabolizmu ATP v priebehu ischemickej periódy substráty pre aktivitu xantinoxidázy, ktorá vyžaduje kyslík v katalýze vytvárania močovej kyseliny. Druhy kyslíkových radikálov sú vedľajšími produktmi tejto reakcie. Druhy kyslíkových radikálov, odvodených od xantinoxidázovej cesty, sú O_2^- (superoxid s jedným elektrónom) a H_2O_2 (peroxid vodíka s dvoma nepárovými elektrónmi). Superoxidy sa generujú vo vnútri cytosolu xantinoxidázou (nachádzajúcou sa v cytosole). Superoxidy sú potom katabolizované na peroxidy v mytochondria superoxidizmutázou. Peroxidy sa ďalej prevádzajú na vodu buď glutatiónperoxidázou v cytosole alebo katalázou v peroxisomes. Ako glutatiónperoxidázu, tak kataklázu zahrňujú antioxidantové obranné mechanizmy väčšiny buniek. Hlavným dôkazom pre túto domnienku je schopnosť allopurinolu, inhibítora xantinoxidázy, chrániť proti reperfúznemu poškodeniu v prípade pokusných modelov.

V prípade cesty, závislej od NADPH, sa NADPH oxidáza aktivuje na generovanie superoxidov prostredníctvom redukcie molekulárneho kyslíka v plazme membrány. Superoxidy sa redukujú na peroxid vodíka superoxidovou dismutázou v plazme membrány alebo vo fagolysosomes. Konečne peroxid vodíka vo fagolysosomes sa môže redukovať v prítomnosti superoxidov alebo železnatých iónov na hydroxylové radikály. Tretia forma kyslíkových metabolitov je sprostredkovávaná myloperoxidázou v prítomnosti chlóru na redukciu peroxidu vodíka na chlórnu kyselinu.

Hydroxylový radikál je mimoriadne reaktívny. Mitochondriálne membrány poskytujú mnohé vhodné substráty na atakovanie hydroxylovými radikálmi. Konečným výsledkom je nezvratné poškodenie na mitochondria trvajúce masívnym prílivom vápenatých iónov. Inou pravdepodobnou príčinou smrti buniek v dôsledku hydroxylových radikálov je peroxidácia fosfolipidov v plazmovej membráne. Nenasýtené mastné kyseliny sú vysoko citlivé štíty pre hydroxylové radikály. Odstránením vodíkového atómu z mastných kyselín bunečných membránových fosfolipidov sa vytvárajú voľné lipidové radikály. Tieto lipidové radikály fungujú podobne ako

a P-selektínu. Leukotrién B4 je mocné neutrofilné chemotaktické činidlo (Lehr H. A. a kol., J. Clin. Invest 87, str. 2036 až 2041, Entaman M. L. a kol. 1991, FASEB J. 5, str. 2529 až 2537). Po aktivácii endoteliálnych buniek sa P-selektín rýchlo translokuje z intracelulárnych organel do plazmovej membrány, kde pôsobí na obmedzenie cirkulujúcich neutrofilov a na ich stabilizáciu pre aktiváciu endoteliálne viazaným faktorom aktivujúcim doštičky, cytokínmi odvodenými od endotelia a inými biologicky aktívnymi mediátormi (Weyrich A. S. a kol. 1993, J. Clin. Invest. 91, str. 2620 až 2629). Preto fyziologické vzájomné pôsobenie medzi aktivovaným endoteliom a aktivovaným neutrofilom sa považuje za rozhodujúci a bezprostredne včasný jav v reperfúznom poškodení orgánov a tkanív. Iné celulárne a biochemické mediátory zápalového poškodenia ako doštičky a komplementná kaskáda a koagulačný systém sú tiež dôležité, uplatňujú sa však v kaskáde oveľa neskôr, v procese označovanom ako koagulatívna nekróza. Konečne monocyty, makrofágy, fibroblasty a infiltrácia buniek hladkého svalstva sú zodpovedné za rekonštrukciu a náhradu mŕtveho tkaniva novým vitálnym tkanivom, pričom sa takýto proces označuje ako hojenie rany.

Všeobecne rozšírená teória sa zameriava na čiastočné redukované a tak aktivované druhy kyslíka v iniciácii poškodenia membrány v reperfúznom poškodení. Súčasné poznatky naznačujú, že aktivovaný kyslík (superoxid, peroxid, hydroxylové radikály) sa vytvára v priebehu ischemických príhod, a preto reaktívne druhy kyslíka poškodzujú ischemické bunky. Toxické druhy kyslíka sa negenerujú v priebehu samotnej ischemickej periódy, ale skôr pri obnovení toku krvi alebo pri reperfúzii. Dva zdroje aktivovaných druhov kyslíka sú zahrnuté ako včasné prípady reperfúzneho poškodenia: zdroje produkované intracelulárne xantinoxidázovou cestou a zdroje, ktoré sa môžu transportovať na extracelulárne prostredie aktivovanými neutrofilmi (Hernandez L. A.a kol. 1987, Am. J. Physiol. 253 (Heart Cir. Physiol. 22), H699 až H703, Luccesi B. R., 1990, Am. J. Cardiology 65, str. 141 až 231, Lefer A. M. a kol., 1991, FASEB J. 5, str. 2029 až 2034, Brown J. M. a kol., 1988, J. Clin. Invest. 81, str. 1297 až 1301, "Cellular Injury and Adaptation" v Pathologic Basis of Disease, Cotran

hydroxylové radikály za vytvárania iných lipidperoxidových radikálov. Deštrukcia nenasýtených mastných kyselín fosfolipidov vedie k strate membránovej fluidity a k smrti bunky. Niektorí výskumní pracovníci sa domnievajú, že vplyvy oxidatívneho stresu spôsobujú programovanú smrť buniek u rôznych bunečných typov.

Infarkty a traumatické poškodenie zahrňuje početné tkanivá včítane vaskulárneho tkaniva. Jednou odozvou na traumatické poškodenie je pokles dodávky krvi do poškodeného tkaniva. Účelom tejto odozvy je chrániť jedincov od zavlečenia infekčných činidiel do tela. Závažné zníženie dodávky krvi je hlavným faktorom progresívnej ischémie v oblasti traumatického poškodenia. S progresívnou ischémiou sa rozširuje nekróza tkaniva od priamo napadnutého tkaniva k zahrnutiu okolitého nenapadnutého tkaniva. Táto progresívna ischémia má významnú úlohu v definovaní konečnej patológie tkaniva, pozorovanej v prípade ľudí, ako následok traumatického poškodenia (Robson M. C. a kol., 1979, Plastic and Reconstrictive Surgery 63, str. 781 až 787).

Jednou formou traumatického poškodenia, ktorá získala veľkú pozornosť, je tepelné poškodenie alebo spálenina. Rana, spôsobená spáleninou, predstavuje nerovnomerné poškodenie a spektrum poškodenia je od tkaniva, ktoré je dokonale koagulované vo chvíli poškodenia po tkanivo, ktoré je poškodené iba minimálne. Medzi týmito dvoma extrémami je tkanivo, ktoré je závažne poškodené a nie plne rozrušené, ktoré je však určené na odumretie. Etiológia postupnej šírky nekrózy je označovaná ako stáza a trombóza krvi v kožných cievach spôsobujúca ischémiu a deštrukciu epiteliálnych prvkov. Táto ischémia nastáva 24 až 48 hodín po tepelnom poškodení (Robson M. C. a kol., 1979, Plastic and Reconstructive Surgery 63, str. 781 až 787 a Robson M. C. a kol., 1980, J. Trauma 20, str. 722 až 725). Boli pozorované mnohé javy po tepelnom poškodení včítane adhézie leukocytov na steny ciev, aglutinácia buniek červených krviniek a uvoľnenie vazoaktívnych a nekrotizujúcich látok (Robson M. C. a kol., 1980, J. Trauma 20, str. 722 až 725).

Zistilo sa, že mikrovaskulárna oklúzia a ischémia, súvisiaca so spáleninou, sú spôsobené od času závislého vzrastu vývoja mikrotrombami v zóne stázy, ktorého podmienky prípadne vedú

k celkovej oklúzii arteriol a mikrocirkulačnej zástave. Zatiaľ čo marginácia erytrocytov, granulocytov a doštičiek na cievnych stenách je zjavná v priebehu niekoľko málo hodín po tepelnom poškodení, vytváranie doštičiek mikrotrombami (ku ktorému dochádza približne 24 hodín po chirurgickom zásahu), je pravdepodobne zodpovedná za vytváranie stavov, ktoré spôsobujú dokonalé alebo permanentné vaskulárne oklúzie a tkanivovú deštrukciu (Rockwell W. B. a Ehrlich H. P., 1992, J. Burn Care Rehab. 13, str. 403 až 406 a Boykin J. V. a kol., 1980, Plastic Reconstruct. Surgery 66, str. 191 až 198). Vytváranie doštičiek mikrotrombami sa javí na celulárnej báze pre rozširovanie zóny dokonalej oklúzie a ischemickej nekrózy, ktorá postupuje do zóny stázy po tepelnom poškodení.

Veľa úsilia sa venovalo zlepšeniu starostlivosti o spáleniny a o iné traumatické poškodenia a boli navrhnuté mnohé riešenia na zníženie progresívnej ischémie spojenej s takýmto poškodením. Zistilo sa, že protizápalové činidlá ako indometacín, acetylsalicylová kyselina a metylprednisonacetát chránia pred dermálnou perfúziou (Robson M. C. a kol., 1979, Plastic and Reconstrictive Surgery 63, str. 781 až 787). Tri tromboxanové inhibítory, imidazol, metimazol a dipyridamol, sa osvedčili v predchádzaní vaskulárnych zmien v prípade rán spôsobených popálením, umožňujúce dermálnu perfúziu a umožňujú inú prostaglandínovú syntézu, ktorá marí nepriaznivé pôsobenie protizápalových činidiel (Robson M. C. a kol., 1980, J. Trauma 20, str. 722 až 725). Terapeutické dávky ibuprofénu a imidazolu sa osvedčujú v predchádzaní dermálnej vaskulárnej oklúzii tým, že pôsobia ako antagonisty k plazmínovému inhibítoru (Ehrlich H. P., 1984, J. Trauma 24, str. 311 až 318). Redukcia cirkulácie fibrinogénu, vykázaná pri podaní ancrodu (jed zmije) vedie k zachovaniu vaskulárnej potencie v mieste poškodenia (Ehrlich H. P., 1987, J. Trauma 27, str. 420 až 424). Zistilo sa tiež, že inhibícia leukocyt - endoteliálnej adherencie, vykázaná pri použití monoklonálnych protilátok, predchádza rozšíreniu/progresii spálenín v marginálnej zóne stázy (Mileski W. a kol. 1992, J. Sugg. Res. 52, str. 334 až 339).

Bakteriálna translokácia je proces, pri ktorom vlastná

črevná flóra penetruje črevnú bariéru a napadá sterilné tkanivo. Tento proces zahrňuje migráciu mikrobiálnych organizmov do drenážnych mezenterických lymfatických uzlín, do sleziny, do pečene, do krvi a v niektorých prípadoch do pľúc (Morehouse J. L. a kol. 1986, Gastroenterol 91, str. 673 až 682 a Maejimak a kol. 1984, Arch. Surg. 119, str. 166 až 172). Tento jav bol popísaný u ľudí po tepelnom poškodení (Czaja A. J. a kol., 1974, N. Engl. J. Med. 291, str. 925 až 929, Seavitt S. 1967, Br. J. Surg. 54, str. 32 až 41 a Desai M. H. a kol., 1991, Surgery Gyn. Obstet. 8, str. 257 až 261) a po ischémia - reperfúznom poškodení (Deitch E. A. a R. Berg 1987, J. Burn Rehab. 8, str. 475 až 482).

Za normálnych podmienok je črevná sliznica nepriepustná pre možné škodlivé látky z črevného lúmenu (Morehouse J. L. a kol., 1986, Garstroenterol 91, str. 673 až 682, Deitch E. A. a R. Berg 1987, J. Burn Rehab. 8, str. 475 až 482 a Edmiston C. E.a R. E. Condon 1991, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83). Súčasné poznatky potvrdzujú, že rozrušenie integrity/permeability sliznice podporuje bakteriálnu translokáciu, pretože obnažuje k stresu, ktorý produkuje hostiteľskú odozvu charakterizovanú celulárnym poškodením a nekrotické tkanivo je v súhlase s vývojom bakteriálnej translokácie (R. E. Condon 1991, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83). Klinicky dôležitá reperkúzia bakteriálnej translokácie je sepsa a multisystémové orgánové zlyhanie (Deitch E. A. a R. Berg 1987, J. Burn Rehab. 8, str. 475 až 482 a Edmiston C. E. a R. E. Condon 1992, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83 a Deitch E. A. 1990, Arch. Surgery 125, str. 403 až 404). Výskyt sepsy a rozšírenie nákazy orgánov po strese je najväčšie u pacientov, ktorí majú tiež zníženú imúnnu ochranu (Deitch E. A. a R. Berg 1987, J. Burn Rehab. 8, str. 475 až 482 a Edmiston C. E. a R. E. Condon 1991, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83), ktorá sa pozoruje u jedincov s popáleninami (Deitch E. A. 1990, Arch. Surgery 125, str. 403 až 404 a Saadia R. a kol., 1990, Br. J. Surg. 77, str. 487 až 492). Preto v odozve na stres niektorí jedinci vykazujú bakteriálnu translokáciu za neprítomnosti závažných následkov. Jedinci tejto skupiny majú zachovanú neporušenú imunologickú odozvu (Deitch E. A. a R. Berg 1987, J. Burn Rehab. 8, str. 475 až 482 a Edmiston

C. E. a R. E. Condon 1991, Surgery, Gyn. Obstet. 173, str. 73 až 83 a Deitch E. A. 1990, Arch. Surgery 125, str. 403 až 404). Pre dobre známu moduláciu hostiteľovej imúnnej odozvy po závažných popáleninách je bakteriálna translokácia jedným z najzávažnejších následkov tepelného poškodenia ľudí (Deitch E. A. 1990, Arch. Surgery 125, str. 403 až 404 a Saadia R. a kol. 1990, Br. J. Surg. 77, str. 487 až 492).

Pokusné modely bakteriálnej translokácie doložili, že k nezvratnému poškodeniu čriev môže dochádzať až po 24 hodinách po poškodení teplom a za 48 hodín po zviditeľnení histologických zmien črevného vaskulárneho tkaniva (Desai M. H. a kol., 1991, Surgery Gyn. Obstet., str. 257 až 261 a Mainous M. R. a kol. 1991, Arch. Surgery 126, str. 33 až 37). Tieto experimentálne systémy sú užitočné na definovanie farmakologických mediátorov, ktoré sa javia ako užitočné na vytvorenie kaskády efektorových molekúl zodpovedných za nekrózu tkaniva. Okrem úlohy, ktorú majú katecholamíny, sú zahrnuté kyslíka zbavené radikály a endotoxíny, faktory ako interferón α, interleukín-6, faktor nekrózy nádoru, faktor aktivujúce doštičky a mnohé vazoaktívne mastné kyseliny, odvodené od metabolizmu arašidovej kyseliny (Morehouse J. L. a kol. 1986, Garstroenterol 91, str. 673 až 682). Príspevok kyslíka zbavených radikálov, endotoxínu, prostaglandínov a tromboxanov pri podpore deštrukcie tkaniva je podporovaný skutočnosťou, že inhibícia bakteriálnej translokácie a mukosálneho poškodenia sa dosahuje použitím allopurinolu (Vaugham W. G. a kol. 1992, J. Ped. Surg. 27, str. 968 až 973) (ako inhibítor xantinoxidázy), endotoxínovou desentizáciou (Deitch E. A. a kol. 1992, Circ. Schock 36, str. 206 až 216), prostaglandínovými analógmi (Fukushima R. a kol. 1992, Ann. Surg. 216, str. 438 až 444) a inhibítormi tromboxanovej syntetázy (Tokyay R. a kol. 1992, J. Trauma 32, str. 704 až 713).

Skutočnosť zahrnutia úlohy neutrofilov v syndróme dychových ťažkostí dospelých ("adult respiratory distress syndrome" = ARDS) je podstatná, ale nepriama (Simon R. H. a Ward P. A. 1992, Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, 2. vydanie, Galin J. I. a kol., Vyd. Raven Press, Ltd. New York, str. 999 až 1016). Niektoré z prvých poznatkov, že neutrofily

môžu spôsobovať obraz podobný ako ARDS, boli zistené u závažne neutropenických jedincov, ktorým boli dodané intravenóznou infúziou donorové neutrofily. Prípadne v rámci hodiny neutrofilnej infúzie došlo k odtrhnutiu "white-out" pľúc (röntgenové lúče) a k nástupu syndrómu ARDS. Početné štúdie ukázali, že sa neutrofily akumulujú v pľúcach v priebehu ARDS. Ich prítomnosť bola dokázaná napríklad histologicky. V priebehu skorej fázy ARDS počet cirkulujúcich krvných buniek prudko klesá pravdepodobne pre ich abnormálnu pulmonárnu sekvestráciu. Niekoľko neutrofilov, ktoré sa akumulujú v pľúcnych kapilárach, opúšťajú vaskulárny priestor a migrujú do interstícia a do alveolárnych vzduchových priestorov. U normálnych zdravých dobrovoľníkov je počet neutrofilov menší ako 3 % buniek, ktoré sa môžu získať bronchoalveolárnym premytím (BAL). V prípade chorých ARDS percento neutrofilov v premytí je značne zvýšené, 76 až 85%. Akumulácia neutrofilov je spojená s evidenciou ich aktivácie. Vykazujú podporenú chemotaxis a generujú abnormálne vysoké hladiny kyslíkového metabolizmu po stimulácii in vitro. Zvýšené koncentrácie neutrofilných sekretačných produktov, napríklad laktoferínu, boli zistené v plazme jedincov s ARDS. Ďalší jav, že sa neutrofily aktívne podieľajú na poškodení pľúc, sa získal z klinickej štúdie jedincov s miernym poškodením pľúc, ktoré je neutropenické pre nesúvisiace dôvody (napríklad pri chemoterapii). Zistilo sa, že poškodenie pľúc sa často horší, keď sa zlepší hematologický stav a počty cirkulujúcich neutrofilov sa vrátia na normálne hladiny.

Akokoľvek je jasné zahrnutie neutrofilov do genézy ľudskej ARDS stále v širokej miere nepriame, sú hodnoty dokladajúce význam neutrofilov v prípade rôznych živočíšnych modelov akútneho poškodenia pľúc presvedčivé. Bežný prístup, ktorý sa používa na doloženie neutrofilnej nezávislosti, je zbaviť živočíchov cirkulujúcich neutrofilov a merať zníženie pľúcneho poškodenia, ku ktorému dôjde. Hoci sa použili mnohé experimentálne modely pre štúdium neutrofilnej závislosti pľúcneho poškodenia, do diskusie ich bolo zahrnutých len niekoľko (pre nedostatok miesta).

Jedným extenzívne študovaným modelom je podanie endotoxínu ovci. Ak sa endotoxín zavádza ovci intravenózne, dochádza ku

komplexným javom, z ktorých jedným je vzrast permeability pulmonárneho kapilárneho endotelia. To sa prejavuje vzrastom toku pľúcnej lymfy, ktorá obsahuje vyššiu koncentráciu proteínu ako normálne. Tieto zmeny naznačujú zníženie schopnosti kapilárneho endotelia zadržiavať proteíny plazmy vo vaskulárnom priestore. Neutrofilná závislosť permeabilitného poškodenia sa ustanovuje, ak sa zistí, že sa ovce zbavujú neutrofilov pred infúziou endotoxínu, ktorý ich chráni. Iný in vivo model akútneho poškodenia pľúc zahrňuje intravenóznu infúziu faktoru jedu kobry krysám, ktorá spôsobuje komplementnú aktiváciu nasledovanú leukoagregáciou a sekvestráciou neutrofilov v pulmonárnej mikrovaskulatúre. Dochádza k alveolárnemu poškodeniu stien vedúcemu k intersticiálnemu a intraalveolárnemu opuchu s hemorágiou a s ukladaním fibrínu. Opäť odstránenie neutrofilu predchádza vzrastu pulmonárneho kapilárneho výtoku.

Izolované perfundované králičie alebo krysie pľúca sa tiež použili na štúdium mechanizmu alveolárneho poškodenia za okolností, ktoré umožňujú zlepšenú kontrolu faktorov, ktoré ovplyvňujú tok kvapaliny. Ak sa pridajú neutrofily do perfuzátu a potom sa stimulujú, uvoľňuje sa albumín z vaskulárnej oblasti do pľúcneho interstícia a do alveolárnych vzduchových priestorov. Nestimulované neutrofily alebo samotný stimulus (napríklad forbolmyristátacetát) zlyhávajú pri zvyšovaní alveolárnej kapilárnej permeability.

Ako je ďalej doložené, stimulované neutrofily môžu nezávisle poškodzovať pľúcne tkanivo. Pokusy in vitro sa vykonali za použitia vaskulárnych endoteliálnych a pľúcnych epiteliálnych buniek ako štítov. V niektorých správach sa neutrofily ukázali ako vyčleňujúce endoteliálne bunky alebo alveolárne epiteliálne bunky z povrchu misky s tkanivovou kultúrou. Zrejme ak k niečomu takému dochádza in vivo, odkrytý povrch umožňuje podstatné uvoľňovanie plazmových obsahov. Okrem toho mnohé správy pokladajú za jasné, že stimulované neutrofily sú schopné uľahčovať lýziu kultivovaných vaskulárnych endoteliálnych buniek a alveolárnych epiteliálnych buniek.

Dehydroepiandrosterón (DHEA) je endogénny androgenický steroid, ktorý vykazuje početné biologické aktivity. Araneo B. A.

a kol. (1993, Arch. Surgery 128, str. 318 až 325) doložili, že podávanie dehydroepiandrosterónu (DHEA) popálenej myši v priebehu jednej hodiny po poškodení vedie k uchovaniu normálnej imunologickej kompetencie včítane normálnej kapacity produkovať od T buniek odvodené lymfokíny, generácie bunečnej imúnnej odozvy a schopnosti odolávať navodenej infekcii. Eich D. M. a kol. (1992, americký patentový spis číslo 5 110 810 a 1992, americký patentový spis číslo 5 162 198) popisuje použitie dehydroepiandrosterónu (DHEA) k zníženiu rýchlosti agregácie doštičiek a použitiu dehydroepiandrosterónu (DHEA) alebo dehydroepiandrosterónsulfátu (DHEA-S) k prípadnému zníženiu produkcie tromboxanu.

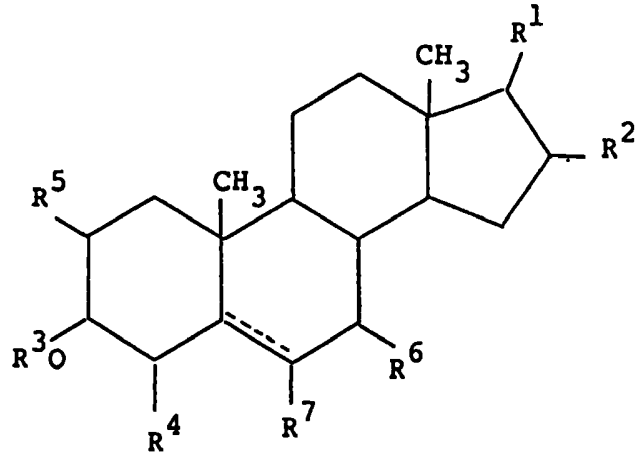
Nestler S. (1990, americký patentový spis číslo 4 920 115) uvádza, že podávaním dehydroepiandrosterónu (DHEA) je možné u ľudí znížiť hmotu tuku, zvýšiť svalovú hmotu, znížiť hladinu LDL cholesterolu bez ovplyvnenia hladiny LDL cholesterolu, znížiť hladiny sérového apolipoproteínu B a neovplyvniť citlivosť tkaniva k inzulínu. Kent S. (1982 Geriatrics 37, str. 157 až 159) popisuje dehydroepiandrosterón (DHEA) ako "zázračnú drogu", ktorou sa môže predchádzať obezite, starnutiu, diabetes mellitus a ochoreniu srdca. Dehydroepiandrosterón (DHEA) sa v širokej miere predpisuje ako účinná látka veľa rokov. Avšak organizácia Food and Drug Administration najnovšie obmedzila jeho používanie. Dehydroepiandrosterón (DHEA) je ochotne interkonvertibilné so svojím sulfátovým esterom DHEA-S prostredníctvom pôsobenia intracelulárnych sulfatáz a sulfotransferáz.

Nehľadiac na hore uvedené objavy, zamerané na pôsobenie rôznych zlúčenín na spáleniny, je potrebné identifikovať ďalšie zlúčeniny, ktoré by boli schopné predchádzať alebo znižovať reperfúzne poškodenie ako dôsledok ischémie, pôsobenie ischémie spojené s infarktmi alebo s traumatickým poškodením a identifikovať zlúčeniny, ktoré sú schopné predchádzať alebo znižovať bakteriálnu translokáciu a ARDS. Preto sa vynález týka predchádzania alebo znižovania progresívnej nekrózy tkaniva, predchádzania alebo znižovania reperfúzneho poškodenia, predchádzania alebo znižovania bakteriálnej translokácie a predchádzania alebo znižovania syndrómu dýchacích ťažkostí

dospelých (ARDS).

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je použitie derivátu dehydroepiandrosterónu vzorca I



I

kde znamená

R^1 atóm kyslíka alebo hydroxylovú skupinu,

R^2 atóm vodíka, metylovú skupinu, hydroxylovú skupinu alebo atóm halogénu, pokiaľ R^1 znamená atóm kyslíka a atóm vodíka, pokiaľ R^1 znamená hydroxylovú skupinu,

R^3 atóm vodíka, zvyšok mastnej kyseliny, skupinu alkylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, acetylenickú s 1 až 10 atómami uhlíka, $(X)_n$-fenylalkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkylovom podieli, $(X)_n$-fenylalkenylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkenylovom podieli alebo skupinu všeobecného vzorca $-CO-R^8$,

R^4 a/alebo R^5 atóm vodíka, hydroxylovú skupinu alebo atóm halogénu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje konverziu R^3 vo význame atómu vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^6 atóm vodíka, hydroxylovú skupinu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje

konverziu R^3 vo význame atómu vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^7 atóm vodíka, keď čiarkovaná čiarka znamená dvojitú väzbu, atóm kyslíka alebo vodíka a halogénu, keď čiarkovaná čiarka znamená jednoduchú väzbu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje konverziu R^3 vo význame atómu vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^8 atóm vodíka, zvyšok mastnej kyseliny, skupinu alkylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, acetyalenickú s 1 až 10 atómami uhlíka, $(X)_n$-fenylalkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkylovom podieli, $(X)_n$-fenylalkenylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkenylovom podieli,

X na sebe nezávisle atóm halogénu, skupinu alkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 4 atómami uhlíka, alkoxyskupinu s 1 až 5 atómami uhlíka, karboxyskupinu, nitroskupinu, sulfátovú skupinu, sulfonylovú skupinu, skupinu karboxylového esteru s 1 až 6 atómami uhlíka alebo skupinu sulfátového esteru s 1 až 6 atómami uhlíka a

n 0, 1, 2 alebo 3.

na výrobu farmaceutických prostriedkov na prevenciu progresívnej nekrózy tkaniva, reperfúzneho poškodenia, bakteriálnej translokácie a syndrómu dýchacích ťažkostí dospelých na prevenciu, alebo znižovanie bakteriálnej translokácie.

Farmaceutický prostriedok podľa vynálezu je teda vhodný na prevenciu, alebo redukciu reperfúzneho poškodenia po ischémii, po poškodení buniek spojenom s ischemickou príhodou, ako sú infarkt alebo traumatické poškodenie, a tak prevencia alebo zníženie následnej postupnej nekrózy tkaniva spojenej s takouto ischémiou. Tento efekt sa dosahuje podávaním dehydroepiandrosterónu (DHEA) alebo derivátov DHEA jedincom. Podstatou vynálezu je tiež prevencia alebo zníženie bakteriálnej translokácie a spôsobu prevencie alebo zníženia ARDS. Podobne sa bakteriálna translokácia a ARDS predchádzajú alebo znižujú podávaním dehydroepiandrosterónu (DHEA) alebo derivátov DHEA. Ako takéto vhodné deriváty DHEA sa uvádzajú napríklad 16α-bróm-DHEA, androstendiol a deriváty, ktoré majú bočné reťazce v polohách 2', 4', 6' alebo 7'. Takéto bočné

reťazce nenarušujú natívnu aktivitu DHEA, sú však schopné inbihovať sulfotransferázu na predchádzanie iónverzie dehydroepiandrosterónu (DHEA) na DHEA-S. S prekvapením sa zistilo, že DHEA-S je užitočný na predchádzanie alebo na znižovanie ischémie.

Vynález bližšie objasňuje nasledujúci podrobný popis s pripojenými obrázkami:

Na obr. 1 sú výsledky analýzy vytvárania edému (opuchu ucha) a jeho rozrušenie v prípade spálených uší myši kontrolnej a ošetrenej dehydroepiandrosterónom (DHEA).
Na osi x je počet hodín po tepelnom poškodení, na osi y opuch ucha (v 0,001 palcov) čiara so štvorčekmi je pre samotný nosič, s kolieskami na ošetrenie dehydroepiandrosterónom.

Na obr. 2 je analýza vytvárania opuchu (opuch ucha) a jeho rozrušenie v prípade spálených uší myši kontrolnej a ošetrenej dehydroepiandrosterónom (DHEA), androstendiolom, 16α-bróm-DHEA alebo známym antiglukortikoidom RU486.
Na osi x je ošetrovanie myši (denné) vždy v prvom stĺpci stav pred spálením, v druhom stĺpci 12 hodín po spálení a v treťom stĺpci 24 hodín po spálení, pričom v prvej sade stĺpcov ide o ošetrenie samotným nosičom, v druhej sade o ošetrenie dehydroepiandrosterónom, v tretej sade o ošetrenie androstendiolom, v štvrtej sade o ošetrenie antiglukortikoidom RU486 a piatej sade stĺpcov o ošetrenie 16α-bróm-DHEA a na osi y je opuch ucha (v 0,001 palcov).

Na obr. 3A je schopnosť dehydroepiandrosterónu (DHEA) chrániť proti väčšine progresívnych následkov ischémie alebo proti tepelnému poškodeniu ucha.

Na obr. 3B je schopnosť androstendiolu chrániť proti väčšine progresívnych následkov ischémie alebo proti

tepelnému poškodeniu ucha.

Na obr. 3C je schopnosť 16α-bróm-DHEA chrániť proti väčšine progresívnych následkov ischémie alebo proti tepelnému poškodeniu ucha.

Na obr. 3D sú progresívne ischemické následky tepelného poškodenia ucha pri podaní samotného nosiča.

Na obr. 3E sú progresívne ischemické následky tepelného poškodenia ucha pri podaní samotného androstendiolu.

Na obr. 3F sú progresívne ischemické následky tepelného poškodenia ucha pri podaní samotného RU486.

Na obr. 4 je vplyv ošetrenia dehydroepiandrosterónom (DHEA) na progresívnu ischémiu pri podaní 0 až 6 hodín po tepelnom poškodení.
Na osi x je doba ošetrenia po spálení, pričom v prvom stĺpci ide o ošetrenie púhym nosičom, v nasledujúcich stĺpcoch ide vždy o ošetrenie dehydroepiandrosterónom, a to v druhom stĺpci bezprostredne po spálení, v treťom jednu hodinu, vo štvrtom dve hodiny, v piatom 4 hodiny a v šiestom šesť hodín po spálení. Na osi y je stredný stupeň straty tkaniva.

Na obr. 5A je počet voľných kapilár v blízkosti postkapilárnych žiliek v zóne 1 v priebehu reperfúzneho poškodenia.

Na obr. 5B je počet voľných kapilár v blízkosti postkapilárnych žiliek v zóne 2 v priebehu reperfúzneho poškodenia.

Na obr. 5C je počet voľných kapilár v blízkosti postkapilárnych žiliek v zóne 3 v priebehu reperfúzneho poškodenia.
Na osi x je vždy doba po reperfúzii, na osi y kumulatívne skóre, čiara so štvorčekmi je pre samotný nosič, s kolieskami pre predbežné ošetrenie dehydroepiandrosterónom.

Na obr. 6A je počet leukocytov prechádzajúcich lúmenom postkapilárnych žiliek v dvojminútovej perióde.

Na obr. 6B je počet leukocytov prilnievajúcich alebo nalepujúcich sa na lúmen postkapilárnych žiliek v dvojminútovej perióde.

Na obr. 6C je počet leukocytov migrujúcich cez endotelium

v dvojminútovej perióde.
Os x a y je pre rovnaké hodnoty ako podľa obrázkov 5, čiarkovaný stĺpec je pre samotný nosič, bodkovaný pre predbežné ošetrenie dehydroepiandrosterónom.

Na obr. 7A je rýchlosť červených krviniek v žilnej krvi pre reperfúziu.

Na obr. 7B je rýchlosť červených krviniek arteriálnej krvi po reperfúzii.
Os x a y je pre rovnaké hodnoty ako podľa obrázkov 5, čiarkovaný stĺpec je pre samotný nosič, bodkovaný pre predbežné ošetrenie dehydroepiandrosterónom.

Vynález sa teda týka spôsobu prevencie alebo zníženia reperfúzneho poškodenia v dôsledku ischémie a bunečnej traumy, spojeného s ischemickými príhodami ako je infarkt alebo traumatické poškodenie. Príkladovo sa ako infarkt uvádza infarkt myokardu. Príkladovo sa ako traumatické poškodenie uvádza poškodenie popálením, chirurgiou, chemickým popálením s tržnými ranami. Pri prevencii alebo znížení reperfúzneho poškodenia v dôsledku ischémie a bunečnej traumy, spojenej s ischemickými príhodami sa tiež predchádza alebo sa znižuje nasledujúce postupné odumieranie tkaniva, spojené s takýmto infarktom alebo poškodením. Podľa vynálezu sa reperfúznemu poškodeniu alebo bunečnému poškodeniu, spojenému s ischemickými príhodami ako je infarkt alebo traumatické poškodenie, predchádza alebo sa znižuje podávaním dehydroepiandrosterónu (DHEA) alebo derivátov dehydroepiandrosterónu ošetrovaným jedincom tak skoro, ako je to len možné, s výhodou v priebehu štyroch hodín a najvýhodnejšie v priebehu dvoch hodín ischémie, infarktu alebo traumatického poškodenia.

Vynález sa tiež týka spôsobu prevencie alebo znižovania bakteriálnej translokácie. Podľa vynálezu sa bakteriálnou translokáciou predchádza alebo sa znižuje hore popísaným podávaním dehydroepiandrosterónu (DHEA) alebo derivátov dehydroepiandrosterónu ošetrovaným jedincom. Dehydroepiandrosterón (DHEA) alebo deriváty dehydroepiandrosterónu sa ošetrovaným jedincom podávajú v priebehu 24 hodín po poškodení, ktoré má za

následok bakteriálnu dislokáciu.

Vynález sa tiež týka spôsobu prevencie alebo znižovania syndrómu dýchacích ťažkostí dospelých (ARDS). Podľa vynálezu sa ARDS predchádza alebo sa znižuje hore popísaným podávaním dehydroepiandrosterónu (DHEA) alebo derivátov dehydroepiandrosterónu ošetrovaným jedincom. Dehydroepiandrosterón (DHEA) alebo deriváty dehydroepiandrosterónu sa ošetrovaným jedincom podávajú pred klinickými symptómami ARDS, hlavne jedincom, u ktorých je nebezpečenstvo ARDS.

Vo všeobecnom vzorci I sú atómy halogénu, atóm brómu, chlóru, fluóru a jódu. Ako výhodné významy symbolov R^4, R^5 a R^6 sa uvádzajú hydroxylová skupina a atóm brómu. Iné vhodné substituenty je možné stanoviť (a) podávaním derivátov dehydroepiandrosterónu popáleným jedincom a určovaním ich protiischemického pôsobenia a (b) stanovením množstva sulfátovaného derivátu.

Je známe, že pri reperfúznom poškodení, infarktoch a pri traumatickom poškodení ako sú napríklad infarkt myokardu, spáleniny, veľká chirurgia, chemické popáleniny a rezné rany, môže dochádzať k poškodeniu, pri ktorom postupuje odumieranie tkaniva a k priamemu ovplyvneniu obklopujúceho nenapadnutého tkaniva. Táto progresívna ischémia má významnú úlohu v definovaní konečnej patológie tkaniva, pozorovanej v prípade ľudí, ako následok traumatického poškodenia (Robson M. C. a kol. 1979, Plastic and Reconstrictive Surgery 63, str. 781 až 787). Je tiež známe, že dôsledkom tepelného poškodenia je bakteriálna translokácia. Tepelné poškodenie, napríklad popálením, je najvhodnejšie pre štúdium traumatického poškodenia, pri ktorom dochádza k progresívnej ischémii.

Strata žijúcej pokožky v dôsledku procesu postupnej ischemickej nekrózy prispieva významne k veľkej strate pokožky, ktorá vyžaduje chirurgicky naštiepenie po spáleninách (Jackson, 1953, British J. Surg. 40, str. 588 až 593). Boli skúmané mnohé zvieracie modely veľmi napodobňujúce vzhľad klinických popálenín. Napríklad po experimentálnom obarení viac ako 20 % celkového povrchu tela hlodavca (napríklad pôsobením vody s teplotou 72 °C po dobu 7 sekúnd) sa bezprostredne obarené tkanivo chová úplne

podobne ako extenzívne poškodené a okolité poškodené tkanivo vyvinuté v nasledujúcich 24 až 72 hodinách. Pozorované ako klinické, tak experimentálne spáleniny dokladajú, že celková strata pokožky pri závažnom tepelnom poškodení je sumou bezprostredne rozrušeného tkaniva a latentného poškodenia, ku ktorému dochádza na epidermis, dermis a na štruktúre pokožky napadnutej a obklopujúcej napadnuté miesto.

Počiatočné výskumy, používajúce zadné časti kože hlodavcov, viedli k niektorým dramatickým poznatkom. Zistilo sa, že obarením poškodená myš, ktorá sa ošetrí v priebehu jednej hodiny po tepelnom poškodení miernym androgénnym steroidovým hormónom dehydroepiandrosterón (DHEA), vykazuje vývoj poranenia úplne odlišný od neošetrenej alebo simulovanej ošetrenej, rovnako poškodenej myši. Tri až štyri dni po tepelnom poškodení vykazujú všetky kontrolné poškodené zvieratá tretí až štvrtý stupeň poškodenia rozľahlej väčšiny pokožkového tkaniva v mieste poškodenia. Skutočne všetka koža v napadnutej oblasti je definitívne stratená ako následok postupnej ischemickej nekrózy. Miera poškodenia tkaniva u týchto zvierat sa spája s veľkou stratou štruktúry kože (vlasových folikulov, krvných ciev, neurónov a mazových žliaz), s infiltráciou fibroblastov, s extenzívnou kontrakciou rany a s vytváraním mnohých fibróznych adhézií pod napadnutou oblasťou kože. Zvieratá ošetrené dehydroepiandrosterónom (približne 2 mg/kg/deň po počiatočnej dávke 4 mg/kg) však vykazujú podstatnú stratu patologických javov s oveľa menším progresívnym poškodením dermis, subdermis a spojenej štruktúry kože. Zatiaľ čo je epitelializácia aktívna ako u kontrolných, tak u dehydroepiandrosterónom ošetrených myší, myši ošetrené dehydroepiandrosterónom vykazujú oveľa menšie kontrakcie rany s výrazne menším vytváraním fibróznych adhézií pod miestom rany.

Na modeli chrbtového poškodenia kože je jasne doložené, že ošetrenie dehydroepiandrosterónom vykazuje veľmi kladné pôsobenie na progresiu rany. Tento poznatok dokladá, že ošetrenie tepelne poškodených zvierat dehydroepiandrosterónom môže ovplyvniť hojenie rany na základe zásadnej schopnosti predchádzať ischémii. Preto modifikácia spôsobu, ktorý popísal Boykin J. V. a kol.

(1980, Plastic Reconstruct. Surgery 66, str. 191 až 198) a Ericksson E a kol. (1980, Microvascular Res. 19, str. 374 až 379) bola vyvinutá na umožnenie kinetického hodnotenia ku kvantifikácii progresívnej kožnej ischémie v priebehu bezprostredne a v neskorších fázach po tepelnom poškodení ucha myši. Technika, použitá v týchto štúdiách, uľahčuje presné a postupné monitorovanie na čase závislom postupe poškodenia kože a ischemickej nekrózy ucha myši obarenej horúcou vodou (s teplotou 52 °C v priebehu 24 sekúnd) a poskytuje dobrý živočíšny model pre výskum progresívnej ischémie spálením poškodeného tkaniva.

Myšie ucho pozostáva z dvoch vrstiev pokožky, z chrupavky, z riedkych svalových buniek a zo spojovacieho tkaniva. Organizácia vaskulatúry ucha je dobre organizovaná, zahrňuje arterioly, prekapilárne arterioly, postkapilárne žilky a žilky. Použitím aparatúry vhodnej na aplikáciu riadeného tepelného poškodenia na celú plochu ucha myši je možný výskum bezprostredných zmien v toku krvi. Ako výsledok presných morfologických štúdií hemodynamických zmien po poškodení spálením myšieho ucha sú popísané tri oddelené zóny, ľahko oddeliteľné podľa stupňa patológie. Tri zóny zahrňujú zónu kompletnej kapilárnej oklúzie, zónu parciálnej oklúzie (stasis) a zónu kapilárnej hyperémie. Použitím aparatúry, vhodnej na aplikáciu riadeného tepelného poškodenia na celú plochu ucha myši (Boykin J. V. a kol. 1980, Plastic Reconstruct. Surgery 66, str. 191 až 198). Jednu hodinu po poškodení sa plocha celkovej kapilárnej oklúzie obmedzí na vzdialený okraj myšieho ucha. Zóna parciálnej oklúzie alebo stasis je umiestnená bezprostrednejšie do tejto najokrajovejšej a bezprostredne citlivej oblasti. Je to hlavná oblasť ušného tkaniva, ktorá vykazuje postupnú ischémiu v priebehu 24 až 72 hodín po tepelnom poškodení a ktorá nakoniec podlieha nekróze. Konečne najbezprostrednejšia oblasť napadnutého ucha je zóna hyperémie. Táto oblasť je takmer odolná progresívna pospáleninovej ischémii.

Zistilo sa, že výsledkom podávania terapeuticky účinného množstva dehydroepiandrosterónu alebo jeho derivátov všeobecného vzorca I vo fyziologicky vhodnom nosiči tak skoro, ako je to len

možné, s výhodou v priebehu štyroch hodín reperfúzneho poškodenia, infarktu alebo traumatického poškodenia je prevencia alebo zníženie ischémie, súvisiace s reperfúznym poškodením, s infarktom alebo s traumatickým poškodením. Prevenciou alebo znížením ischémie sa dosiahne prevencia alebo zníženie nasledujúcej nekrózy tkaniva, spojenej s takouto ischémiou. Toto níženie ischémie je následkom zníženia priľnavosti neutrofilov k endoteliálnym bunkám, ako dokladá príklad. Následkom zníženej neutrofilnej priľnavosti sa neutrofily neaktivujú a neprodukujú bunečné faktory, ktorú vedú k agregácii doštičiek. Je najvýhodnejšie, aby sa dehydroepiandrosterón alebo jeho deriváty všeobecného vzorca I podávali v priebehu dvoch hodín, kedy jedinec podlieha reperfúzii, infarktu alebo traumatickému poškodeniu. Dehydroepiandrosterón alebo jeho deriváty všeobecného vzorca I sa podávajú jedincom vo forme esteru alebo v inej farmaceuticky vhodnej forme a v spojivách, elixíroch alebo v iných farmaceuticky vhodných zmesiach alebo s inými farmaceuticky vhodnými nosičmi.

Farmaceutické prostriedky, obsahujúce dehydroepiandrosterón všeobecného vzorca I podľa vynálezu ako účinnú látku v tesnej zmesi s farmaceutickým nosičom sa môžu pripravovať spôsobmi známymi na prípravu farmaceutických prostriedkov. Nosič môže mať najrôznejšiu formu v závislosti od formy podania žiaduceho farmaceutického prostriedku napríklad pre prípad intravenózneho, orálneho alebo paranterálneho podania. Na prípravu farmaceutických prostriedkov pre orálne podanie sa môže používať akékoľvek bežné farmaceutické prostredie, ako sú napríklad voda, glykoly, oleje, alkoholy, ochucovacie prísady, konzervačné prísady a farbivá pre orálne kvapalné prostriedky (ako sú napríklad suspenzie, elixíry a roztoky). Alebo sa môžu používať nosiče, ako sú napríklad škroby, cukry, riedidlá, granulačné prísady, mazadlá, spojivá, rozptyľovacie činidlá pre orálne pevné prostriedky (ako sú napríklad prášky, kapsule a tabletky). Prípadne sa tabletky môžu povliekať cukrom alebo enterickým povlakom známymi spôsobmi. Na parenterálne podanie je nosičom spravidla sterilná voda, pričom do úvahy prichádzajú tiež iné zložky, napríklad napomáhajúce rozpusteniu alebo konzervovaniu.

Vstrekovateľné suspenzie sa tiež môžu pripravovať vo vhodnom kvapalnom nosiči s použitím suspenzačného činidla.

Dávka dehydroepiandrosterónu alebo jeho derivátu všeobecného vzorca I podľa vynálezu sa riadi známymi farmaceutickými zásadami, to znamená, že sa podáva účinnej látky 1 až 200 mg/kg, s výhodou 2 až 50 mg/kg. Dávka sa môže podávať denne alebo každý druhý deň vo forme jednej dávky alebo vo forme rozdelených dávok na dosiahnutie vhodnej dennej dávky. V prípade nechránených zlúčenín, to znamená zlúčenín, ktoré môžu byť sulfátované ľudskými sulfotransferázami alebo sulfatázami, je výhodné podávať dávku v nadbytku kvôli zaisteniu podania dostatočného množstva účinnej látky, hlavne v prípadoch, kedy sú sulfatázy neaktívne v mieste poškodenia tkaniva. Je výhodné, aby boli nechránené zlúčeniny podávané denne, zatiaľ čo chránené zlúčeniny sa môžu podávať buď denne alebo každý druhý deň. Jedinec sa ošetruje dehydroepiandrosterónom alebo jeho derivátom všeobecného vzorca I po dobu 3 až 30 dní, s výhodou 7 až 14 dní po infarkte alebo po traumatickom poškodení.

V prípade jedincov, u ktorých je nebezpečenstvo infarktu myokardu alebo nebezpečenstvo reperfúzneho poškodenia, je možné predchádzať alebo znižovať progresívnu ischémiu, spojenú s takýmto infarktom alebo reperfúznym poškodením, podaním dehydroepiandrosterónu alebo jeho derivátu všeobecného vzorca I súčasne a/alebo po infarkte alebo po reperfúznom poškodení v hore uvedenej dávke. Ošetrenie po infarkte myokardu je hore popísané. Dehydroepiandrosterón alebo jeho deriváty všeobecného vzorca I sa jedincom s klasickými známkami hroziaceho infarktu myokardu môžu podávať rovnako, ako hore je popísané na ošetrovanie stavu po infarkte.

V prípade jedincov, u ktorých je nebezpečenstvo bakteriálnej translokácie, sa takejto bakteriálnej translokácii predchádza alebo sa znižuje podávaním dehydroepiandrosterónu alebo jeho derivátov všeobecného vzorca I ako je hore popísané a v hore uvedených dávkach. Podávanie kvôli predchádzaniu alebo znižovaniu bakteriálnej translokácie pokračuje tak dlho, kým u jedinca trvá nebezpečenstvo bakteriálnej translokácie.

Zistilo sa, že je rozhodujúce, aby dehydroepiandrosterón

alebo jeho deriváty všeobecného vzorca I bol podávaný skoro po reperfúznom poškodení, po infarkte alebo po traumatickom poškodení kvôli predchádzaniu alebo kvôli zníženiu akéhokoľvek poškodenia buniek. Keď k podávaniu týchto zlúčenín dôjde príliš neskoro, krvné žily okludujú (spočiatku s neutrofilmi priliehajúcimi na endoteliálne bunky), pričom v takomto prípade je podávanie týchto zlúčenín k predchádzaniu alebo k redukcii ischémie nevhodné. Chvíľa, v ktorej sa má začať s podávaním, môže závisieť od typu reperfúzneho poškodenia, infarktu alebo traumatického poškodenia a môže sa ľahko stanoviť na vhodných zvieracích modeloch. Je však výhodné, aby sa s podávaním dehydroepiandrosterónu alebo jeho derivátov všeobecného vzorca I začalo v priebehu štyroch hodín a predovšetkým v priebehu dvoch hodín ischémie, infarktu alebo traumatického poškodenia. Podávanie dehydroepiandrosterónu alebo jeho derivátov na predchádzanie alebo redukciu bakteriálnej translokácie má začínať v priebehu 24 hodín poškodenia alebo príhody spôsobujúcej stres. Je výhodné, aby podávanie týchto zlúčenín na predchádzanie alebo na redukciu bakteriálnej translokácie začalo v priebehu štyroch hodín a predovšetkým v priebehu dvoch hodín. Podávanie dehydroepiandrosterónu alebo jeho derivátov na predchádzanie alebo na redukciu ARDS má začať pred nastúpením klinických symptómov. Všeobecne sa zlúčeniny majú podávať jedincom s nebezpečenstvom ARDS.

Vynález bližšie objasňujú, nijako však neobmedzujú nasledujúce príklady praktického vyhotovenia. Používajú sa známe spôsoby v odbore alebo špecificky popísané spôsoby.

Príklady vyhotovení vynálezu

Príklad 1

Experimentálny model tepelného poškodenia

Bol vyvinutý experimentálny model tepelného poškodenia používajúci myšie uši, pričom teplota a doba vystavenia pôsobenia teploty sa stanovujú empiricky. Podmienky predstavujú minimálne

poškodenie spálením s až celkovou nekrózou tkaniva vystaveného ucha neošetrenej myši 24 až 72 hodín po spálení. Skupiny myši Balb/c vo veku približne deväť týždňov, označené identifikačnými značkami, sa rozdelia na kontrolné a ošetrené podskupiny. Zaznamenáva sa hrúbka ucha poraneného do horúcej vody a potom sa celé ucho anestetizovanej myši ponorí do vody s teplotu 52 °C presne na 24 sekúnd. Každá myš sa potom vráti do svojej klietky po vstreknutí buď propylénglykolového nosiča (kontrola) alebo 100 µg skúšanej látky, rozpustenej v propylénglykole. Zaznamenávajú sa zmeny opuchu ucha jednotlivej myši pred spálením a v rôznych hodinách po tepelnom poškodení.

Príklad 2

Skupiny myši Balb/c vo veku približne deväť týždňov, označené identifikačnými značkami, sa rozdelia na kontrolné a ošetrené podskupiny. Zaznamenáva sa hrúbka ucha poraneného do horúcej vody a potom sa celé ucho anestetizovanej myši ponorí do vody s teplotou 52 °C presne na 24 sekúnd. Každá myš sa potom vráti do svojej klietky po vstreknutí buď propylénglykolového nosiča (kontrola) alebo 100 µg dehydroepiandrosterónu rozpusteného v propylénglykole. Zaznamenávajú sa zmeny opuchu ucha jednotlivej myši pred spálením a 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 a 48 hodín po tepelnom poškodení.

Výsledky analýzy vytvárania opuchu a rozlíšenia uší kontrolných myší a myší ošetrených dehydroepiandrosterónom sú na obr. 1. Zbobtnanie uší, ako miera opuchu, dosahuje vrchol ako u myší ošetrených dehydroepiandrosterónom, tak u kontrolných spálených myší šesť hodín po tepelnom poškodení. U neošetrených myší miera opuchu začína klesať po 12 hodinách a rýchly pokles pokračuje v nasledujúcich 12 hodinách. Medzi 24 a 48 hodinou po spálení sa meranie ucha prerušuje v prípade neošetrenej skupiny kvôli úplnej strate tkaniva v dôsledku kompletnej mikrovaskulárnej oklúzie pôvodnej zóny stázy. Kinetická analýza opuchu neošetrenej myši a myši ošetrenej dehydroepiandrosterónom dokladá po tepelnom poškodení, že príhody v priebehu prvých 24 hodín po tepelnom poškodení sú rozhodujúce pre život tepelne

poškodeného tkaniva, pričom prípadné zachovanie živého tkaniva ucha v 48. hodine je nepriamo úmerné rýchlosti, s ktorou opuch ustupuje medzi píkom do šiestich hodín a konečnými 48 hodinami.

Okrem analýzy opuchu myši tepelne poškodenej neošetrenej a myši ošetrenej dehydroepiandrosterónom sa fotograficky dokumentujú zmeny životnosti samotného ušného tkaniva. Poškodenie ušného tkaniva myši, ktorej sa podal iba nosič, je extenzívne s väčšou ako 70 % nekrotizáciou ušného tkaniva a s deštrukciou do 48 hodín. Celkovo napadnutá plocha zahrňuje ako zónu kompletnej vaskulárnej oklúzie, tak pôvodnú zónu stázy. Táto ďalšia zóna sa poškodzuje ako sekundárny dôsledok tepelného poškodenia, pričom sa tento stav definuje ako progresívna dermálna ischémia po spálení. Avšak myš ošetrená dehydroepiandrosterónom vykazuje nepatrné poškodenie a zachovanie ušného spáleného tkaniva. Jediná oblasť ušného tkaniva, ktorá bola zjavne ovplyvnená, ale nie stratená tepelným poškodením, zodpovedá iba pôvodnej zóne kompletnej vaskulárnej oklúzie.

Príklad 3

Vplyv rôznych zlúčenín na tepelne poškodený model

Skupiny myší Balb/c vo veku približne deväť týždňov, sa rozdelia na podskupiny, ktorým sa podáva buď samotný nosič, dehydroepiandrosterón (DHEA), androstendiol, 16-α-bróm-DHEA, androstendión alebo potentný anti-glukokortikoid, RU486. Jednotlivej myši sa podáva 100 µg uvedených steroidov alebo samotný nosič bezprostredne po spálení (deň 0) a ďalšie dávky 50 µg každých 24 hodín po dobu trvania pokusu. Odozva opuchu uší každej jednotlivej označenej myši sa zaznamenáva pred spálením a 12, 24 a 48 hodín po spálení.

Spálené uši myši ošetrenej terapeuticky androstendiolom, dehydroepiandrosterónom alebo nemetabolizovaným syntetickým derivátom dehydroepiandrosterónu, 16-α-bróm-DHEA, vyvíjajú vždy významný opuch ucha ako odozvu na poškodenie teplom (obr. 2) a vykazujú pomalú a konštantnú rýchlosť vymiznutia opuchu. Táto pomalá strata opuchu po tepelnom poškodení ucha je paralelná

s iba minimálnou dermálnou ischémiou a nekrózou oblasti. Výsledky tejto štúdie tiež potvrdzujú, že vývoj opuchu spáleného ucha neošetrenej myši dosahuje pík a potom sa stráca trochu rýchlejšie, takže 24 až 48 hodín po spálení dochádza k výraznému rozsahu ischémie tkaniva a nekrózy. Podobný obraz opuchu po postupnej ischemickej nekróze sa pozoruje u myši ošetrenej androstendiónom. Podobne obdobný obraz opuchu po postupnej ischemickej nekróze sa pozoruje u skupiny myší tepelne poškodených ošetrených RU486, čo znamená, že dehydroepiandrosterón nepôsobí iba svojimi antiglukokortikoidnými vplyvmi.

Obr. 3A až 3C dokladajú schopnosť dehydroepiandrosterónu, androstendiolu a 16-α-bróm-DHEA chrániť proti väčšine ischemických dôsledkov tepelného poškodenia ucha. Myš, ošetrená jedným z týchto steroidných hormónov, vykazuje skoré zmeny ušného tkaniva s miernou stratou alebo bez straty ušného tkaniva niekoľko dní po tepelnom poškodení. Zdá sa, že napadnutá oblasť zodpovedá zóne kompletnej oklúzie definovanej Boykinom J. V. a kol. (1980, Plastic Reconstruct. Surgery 66, str. 191 až 198). Myš, ktorej sa podal samotný nosič, androstendión alebo RU486 (obr. 3D až 3F) stráca po tepelnom poškodení viac ako 70 % tkaniva vystaveného tepelnému poškodeniu v prvých 48 hodinách po tepelnom poškodení v dôsledku postupnej popáleninovej ischemickej nekrózy. Bez účinného ošetrenia nekrotizovaná oblasť ucha po tepelnom poškodení zodpovedá zóne kompletnej oklúzie plus zóne stázy. Tak je doložené, že ošetrenie tepelne poškodenej myši buď samotným dehydroepiandrosterónom, androstendiolom alebo 16-α-bróm-DHEA nielen mení prirodzený priebeh vytvoreného opuchu ucha, ale tiež trocha chráni napadnuté tkanivo od postupného poškodenia inhibíciou vývoja ischémie v zóne stázy a konečného vývoja nekrózy tejto oblasti.

Pri podobnej skúške sa zistilo, že 16α-hydroxy-DHEA menej chráni, to znamená znižuje rozsah, avšak nepredchádza totálne postupnej ischémii a 16α-chlór-DHEA mierne chráni proti postupnej ischémii.

Príklad 4

Načasovanie počiatočného podania dehydroepiandrosterónu

Vykonáva sa skúška na stanovenie, či podanie dehydroepiandrosterónu musí byť bezprostredne alebo až za niekoľko hodín po tepelnom poškodení. Myši sa anestetizujú, popália sa v anestetizovanom stave, štyrom myšiam sa podá samotný nosič, štyrom sa podá 100 µg dehydroepiandrosterónu a zvyšné myši sa rozdelia na ďalšie skupiny po štyroch. Všetkým myšiam v jednotlivej skupine sa podá 100 µg dehydroepiandrosterónu, jednu, dve, štyri alebo šesť hodín po tepelnom poškodení. Strata tkaniva v prípade každej myši sa hodnotí 72 hodín po tepelnom poškodení a výsledky sú uvedené na obr. 4.

Obr. 4 dokladá, že použitie dehydroepiandrosterónu sa môže odložiť na dobu až dvoch hodín bez výrazného rozdielu chrániaceho pôsobenia dehydroepiandrosterónu, ktoré sa hodnotí stupňom 1,24 ± 0,25 (p je menšie ako 0,001). I pri zdržaní štyroch hodín pred podaním dehydroepiandrosterónu je stredný hodnotiaci stupeň 2,75 ± 0,479 (p je menšie ako 0,016). Pri zdržaní šesť hodín pred podaním dehydroepiandrosterónu je stredný hodnotiaci stupeň straty tkaniva 4,00 ± 0,408 a to je značný rozdiel od skupiny, ktorej sa podal dehydroepiandrosterón bezprostredne po tepelnom poškodení (p je menšie ako 0,058). Skutočnosti, vedúce k nekróze, sú obrátene úmerné podaniu dehydroepiandrosterónu až po niekoľko hodín po tepelnom poškodení.

Hore popísané príklady dokladajú, že mierne intenzívne tepelné poškodenie myšieho ucha je smerodajný a reprodukovateľný model pre skúšanie postupnej ischemickej nekrózy kože. Z výsledkov je zrejmé, že bezprostredné použitie dehydroepiandrosterónu po spálení má ochranné pôsobenie na dermálnu ischémiu, navodenú tepelným poškodením. Okrem dehydroepiandrosterónu sa skúšali so zreteľom na terapeutické pôsobenie niektoré iné steroidné hormóny. Výsledky sú uvedené v tabuľke I.

Tabuľka I.

Výsledky skúšky steroidných hormónov (100 µg/myš)	Analýza ischémie (na modeli myšieho ucha)
DHEA-S	nechráni
DHEA	chráni
16α-bróm-DHEA	chráni
androstendiol	chráni
androstendión	nechráni
RU 486	nechráni

Spolu s DHEA androstendiol a 16α-bróm-DHEA výrazne chránia tým, že 90 až 100 % ušného tkaniva zostáva neporušené, pokiaľ sa pokus skončí za dva týždne, kedy je proces hojenia skončený. 16α-hydroxy-DHEA má menej chrániace pôsobenie a 16α-chlór-DHEA chráni mierne. Avšak DHEA-S, androstendión a RU486 je úplne neúčinné, pričom poškodenie ucha a strata tkaniva je rovnaká ako u neošetrených kontrolných myší v prípade všetkých zvierat v priebehu 48 hodín po tepelnom poškodení. Schopnosť oddeliť chrániace steroidy od nechrániacich steroidov u modelov tepelne poškodených je najpravdepodobnejšie uľahčená skutočnosťou, že je priame alebo bezprostredné poškodenie spálením ušného tkaniva minimálne a že väčšina poškodení, ku ktorému dochádza, je spôsobená postupnou ischémiou a nekrózou, spôsobenou odozvou jedinca na spáleninu obarením.

Výsledky dokladajú, že dehydroepiandrosterón, ale nie jeden z jeho prirodzených metabolitov, je činidlom sprostredkujúcim ochranu proti postupnej ischemickej nekróze. Podklad pre tento záver je jasný. 16α-bróm-DHEA je analóg dehydroepiandrosterónu, ktorý sa nemôže účinne metabolizovať na androgénové steroidy a jeho chrániace pôsobenie je rovnaké ako dehydroepiandrosterónu. Androstendiol má tiež rovnaké biologické pôsobenie ako dehydroepiandrosterón v prípade modelu ucha tepelne poškodeného. Tento steroid je prírodným metabolitom dehydroepiandrosterónu, ktorý sa môže prevádzať späť na dehydroepiandrosterón modifikáciou závislou od enzýmu. Tiež sa môže ďalej metabolizovať na testosterón. Androstendión, rovnako sekundárny metabolit dehydroepiandrosterónu, sa môže metabolizovať iba na produkty

(napríklad testosterón a estrogény) bez známej konverzie na dehydroepiandrosterón. Preto androstendión nemôže chrániť proti postupnej dermálnej ischémii v tomto modeli, pričom nedostatok tohto pôsobenia podporuje záver, že aktívnym steroidom je dehydroepiandrosterón a nie androgén alebo estrogén. Okrem toho sa zistilo, že sulfátovaný dehydroepiandrosterón, ktorý sa v ľudskom tele prirodzene vyskytuje, je neschopný chrániť proti postupujúcej ischémii.

Dehydroepiandrosterón má zverejnenú schopnosť predchádzať niektorým biologickým javom, spôsobeným glukokortikoidmi. Možnosť, že dehydroepiandrosterón pôsobí ako antiglukokortikoid v prípade modelu dermálnej ischémie myšieho ucha poškodeného teplom sa skúšala podaním známeho anti-glukokortikoidu, RU486, myši bezprostredne po tepelnom poškodení. Ako tento model doložil a za skúšobných podmienok látky s anti-glukokortikoidnou účinnosťou neposkytli priaznivé pôsobenie.

Príklad 5

Vplyv dehydroepiandrosterónu na reperfúzne poškodenie

Samčekovia krysy Sprague-Dawley s hmotnosťou 130 až 170 g sa náhodne určia na neošetrenie, na predbežné ošetrenie samotným nosičom alebo na predbežné ošetrenie dehydroepiandrosterónom (4 mg/kg). Myši sa ošetrujú nosičom alebo dehydroepiandrosterónom deň pred chirurgickým zásahom a v deň chirurgického zásahu. Anestézia sa navodí intraperitoneálnym podaním pentobarbitalu (60 až 70 mg/kg). Krysy sa umiestnia na vyhrievanú podložku a telesná teplota (meraná rektálnou sondou) sa udržiava na 35 až 37 °C. Detekcia kremasterového svalu na jeho neurovaskulárnom pendikule sa vykonáva známymi spôsobmi (Anderson G.L. a kol. 1988, Microvascular Res. 36, str. 56 až 63, Siemionow M. a kol. 1991, Microcirc. Endoth. Lymphatics 7, str. 183 až 197, Siemionow M. a kol. 1993, J. Hand Surgery 18A, str. 963 až 971). Vyreže sa koža z predného bedrového chrbátu na vytipovanie skrota. Testicel s nedotknutým kremasterovým svalom sa odreže od skrota. Vytvorí sa 1 cm otvor na brušnom povrchu kremasteru a odstráni sa

testicel a odstráni sa spermiový povrazec. Pod mikroskopom sa dokonale izoluje neurovaskulárny pendikulus, pozostávajúci z pubicko - epigastrických artérií, zo žily a z genitofemorálneho nervu, vyrezaním k začiatku žíl od vonkajšej bedrovej artérie a žily. Nakoniec sa čelná stena kremasterového svalového vačku otvorí a ostrovček kremasterového svalového plátku sa pripraví na intravitálnu videomikroskopiu. Krysa sa vloží do špeciálne určeného tkanivového kúpeľa a kremasterový plátok sa rozprestrie na krycie sklíčko v otvore v dne kúpeľa a fixuje sa s 5-0 hodvábnymi stehmi. Potom sa zospodu presvieti wolfrámovou lampou s optickým vláknom. Sval sa udržiava vlhký a pokrytý nepriepustným plastovým filmom. Tkanivový kúpeľ, určený špeciálne na riadenie teploty, sa naplní 0,9 % soľankou a teplota sa udržiava na 35 až 36 °C. Mikroskop sa vybaví farebnou videokamerou. Videoobraz mikrocirkulácie je na monitore 482,6 mm, pričom je konečné zväčšenie 1800. Meranie mikrovaskulárnej aktivity sa zaznamenáva po izolácii svalu na nastavenie preischemickej základnej hodnoty (baseline). Po správnom umiestnení svoriek na dokonalé vylúčenie toku krvi do svalového transplantátu je ischemická perióda šesť hodín. Po odstránení svoriek na navodenie reperfúzneho poškodenia sa meria aktivita mikrovaskulatúry 30, 60 a 90 minút po reperfúzii. V prípade všetkých skúšaných subjektov nasleduje ischémia po obnovení toku krvi a potom v počiatočnej perióde toku krvi mikrocirkuláciou. Tento prielom cirkulačnej aktivity je nasledovaný reperfúznym poškodením, ktoré navodzuje stratu toku.

Na hodnotenie stavu mikrovaskulatorného systému kremasterového svalu pred ischémiou a po reperfúzii sa používajú nasledujúce parametre:

1. Hustota perfundovaných kapilár

Hustota perfundovaných kapilár v každej z troch oblastí plátku (zóna 1, 2 a 3) sa meria počítaním pretekaných kapilár v blízkosti vopred vybranej postkapilárnej žilky. Počíta sa deväť viditeľných polí kapilár v prípade každej postkapilárnej žilky pre celkovo 27 podielov ma kremasterovom plátku. Výsledky sú na

obr. 5A, 5B a 5C pre zóny 1, 2 a3.

2. Počet leukocytov v postkapilárnych žilkách

Videozáznam troch preselektovaných postkapilárnych žiliek sa sníma v blízkej strednej a vzdialenej oblasti plátku. Zaznamenáva sa pre každú žilku počet leukocytov pretekajúcich lúmen, počet priliehajúcich k endoteliu a počet migrovaných cez endotelium v priebehu dvoch minút. Výsledky sú uvedené na obr. 6A, 6B a 6C.

3. Rýchlosti buniek červených krviniek v A1 (prvého rádu) a A2 (druhého rádu) arteriolách.

Rýchlosti buniek červených krviniek sa zaznamenávajú v hlavných arteriolách kremasterového plátku za použitia bežného optického velocimetra Doppler. Výsledky sú uvedené na obr. 7A a 7B pre rýchlosť žilnej a arteriálnej krvi.

A. Reperfúzne poškodenie neošetrených a nosičom ošetrených krýs

Šesť krýs sa neošetruje a šesť krýs sa ošetruje nosičom. Za podmienok šesťhodinovej ischémie a 90 minútovej reperfúzie dramaticky vzrastá počet valčekovitých, priľnutých a transmigrovaných leukocytov v priebehu 60 minútovej reperfúzie a vykazuje ďalší vzrast do 90 minút (obr. 6A až 6C). Pozoruje sa dramatický pokles absolútneho počtu perfundovaných kapilár na vysoko silové pole, ktoré sa podrobuje 30 až 60 minútovej postreperfúzii s pokračujúcim poklesom počtu pretekaných kapilár 90 minút po reperfúzii (obr. 5A až 5C). Podobne rýchlosť červených krviniek v nádobách s rozmermi A2 je podstatne nižšia do 60 a 90 minút po reperfúzii (obr. 7A a 7B).

B. Reperfúzne poškodenie krýs ošetrených dehydroepiandrosterónom

Za podmienok, kedy sa krysy predbežne ošetrujú podkožným vstreknutím 4 mg/kg dehydroepiandrosterónu deň pred a v deň chirurgického zásahu, sa meria výrazné a vysoko významné ochranné pôsobenie terapie. Všetky tri parametre vykazujú hodnoty, ktoré

sa tesne približujú alebo sú identické s normálnymi hodnotami. Hlavný význam má skutočnosť, že vo všetkých časových bodoch sú endoteliálne adhezívne charakteristiky nezmenené od základných hodnôt. Tento záver je založený na skutočnosti, že mnohé valčekovité, uľpievajúce a transmigračné leukocyty sa javia výrazne podobné základným hodnotám (obr. 6A až 6C). Rýchlosti červených krviniek v A2 arteriolách sa pomalšie vracajú k normálnym rýchlostiam toku s rýchlosťami v niektorých oblastiach merania 75 % normálu do 90 minút po reperfúzii (obr. 7A a 7B). V čase 90 minút počet kapilár v mikrovaskulatúre nie je podstatne odlišný od základných hodnôt, dosiahnutých pred ischémiou (obr. 5A až 5C).

Bez snahy viazať na nejakú teóriu fyziologické a biochemické operácie dehydroepiandrosterónu a jeho derivátov všeobecného vzorca I sa zdá, že antiischemické pôsobenie týchto zlúčenín súvisí s ich pôsobením na priľnavosť neutrofilov na endoteliálne bunky. Preto pôsobenie týchto zlúčenín pri prevencii alebo znižovaní ischémie, ktorá môže byť dôsledkom rôznych typov poškodenia tkaniva, môže byť založené na ovplyvňovaní priľnavosti endoteliálnych buniek. Preto inhibícia priľnavosti neutrofilov predchádza aktivácii neutrofilov a transmigrácii do tkanivovej strany endotelia. Pretože sa transmigrácia neutrofilov inhibuje, predchádza sa neutrofilmi navodenému masívnemu poškodeniu endoteliálnych buniek a parenchymálnych buniek. Pretože sa predchádza neutrofilnou aktiváciou produkcii bunečných faktorov (neutrofily), predchádza sa tiež agregácii doštičiek. Tým sa predchádza a znižuje sa progresívna nekróza tkaniva. Okrem toho progresívna ischémia črevného tkaniva (vedúca k bakteriálnej translokácii) a epidermis a srdečného svalu a ischémie alveolárnej steny (vedúcej k ARDS) sa sprostredkováva podobným mechanizmom. Preto sú tieto zlúčeniny účinné pri predchádzaní alebo pri znižovaní bakteriálnej translokácie a ARDS.

Pripomína sa, že spôsoby a zlúčeniny podľa vynálezu sa môžu vnášať do formy najrôznejšieho vyhotovenia, pričom sa tu pojednáva iba o niekoľkých takýchto formách. Pracovníkom v odbore je zrejmé, že v rámci vynálezu sú možné i ďalšie vyhotovenia. Preto sú hore uvedené vyhotovenia mienené iba ako objasňujúce

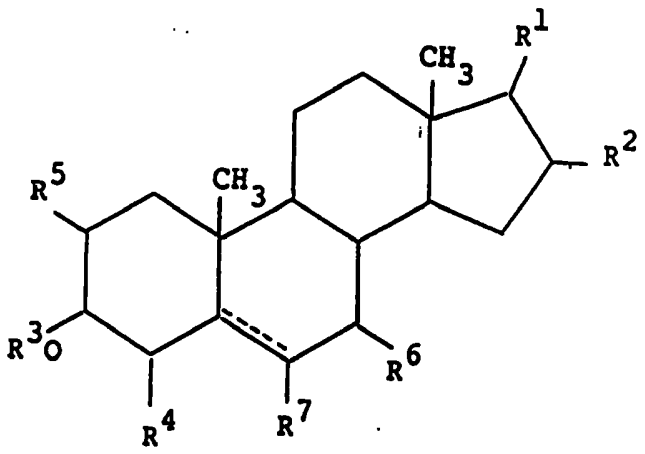
a neobmedzujúce príklady.

Priemyselná využiteľnosť

Použitie dehydroepiandrosterónu (DHEA) alebo jeho derivátov na výrobu farmaceutických prostriedkov na prevenciu progresívnej nekrózy tkaniva, reperfúzneho poškodenia, bakteriálnej translokácie a syndrómu dýchacích ťažkostí dospelých. Ako vhodné deriváty DHEA sa uvádzajú napríklad 16α-bróm-DHEA, androstendiol a deriváty, ktoré majú bočné reťazce v polohe 4' a/alebo 7', ktoré nenarušujú natívnu aktivitu DHEA a sú schopné inhibovať sulfotransferázu na predchádzanie konverzie DHEA na DHEA-S.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie derivátu dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I



I

kde znamená

R^1 atóm kyslíka alebo hydroxylovú skupinu,

R^2 atóm vodíka, metylovú skupinu, hydroxylovú skupinu alebo atóm halogénu, pokiaľ R^1 znamená atóm kyslíka a atóm vodíka, pokiaľ R^1 znamená hydroxylovú skupinu,

R^3 atóm vodíka, zvyšok mastnej kyseliny, skupinu alkylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, acetylenickú s 1 až 10 atómami uhlíka, $(X)_n$-fenylalkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkylovom podieli, $(X)_n$-fenylalkenylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkenylovom podieli alebo skupinu všeobecného vzorca $-CO-R^8$,

R^4 a/alebo R^5 atóm vodíka, hydroxylovú skupinu alebo atóm halogénu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje konverziu R^3 vo význame atómu

vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^6 atóm vodíka, hydroxylovú skupinu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje konverziu R^3 vo význame atómu vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^7 atóm vodíka, keď čiarkovaná čiarka znamená dvojitú väzbu, atóm kyslíka alebo vodíka a halogénu, keď čiarkovaná čiarka znamená jednoduchú väzbu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje konverziu R^3 vo význame atómu vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^8 atóm vodíka, zvyšok mastnej kyseliny, skupinu alkylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, acetyalenickú s 1 až 10 atómami uhlíka, $(X)_n$-fenylalkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkylovom podieli, $(X)_n$-fenylalkenylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkenylovom podieli,

X na sebe nezávisle atóm halogénu, skupinu alkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 4 atómami uhlíka, alkoxyskupinu s 1 až 5 atómami uhlíka, karboxyskupinu, nitroskupinu, sulfátovú skupinu, sulfonylovú skupinu, skupinu karboxylového esteru s 1 až 6 atómami uhlíka alebo skupinu sulfátového esteru s 1 až 6 atómami uhlíka a

n 0, 1, 2 alebo 3.

2. Použitie podľa nároku 1 derivátu dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^3 atóm vodíka, alebo zvyšok mastnej kyseliny so 4 až 22 atómami uhlíka a ostatné symboly majú v nároku 1 uvedený význam.

3. Použitie podľa nároku 1 derivátu dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^1 atóm kyslíka a R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atóm vodíka.

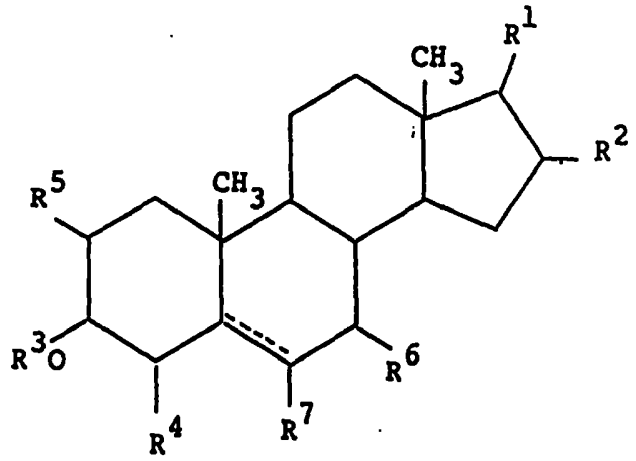
4. Použitie podľa nároku 1 derivátu dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^1 hydroxylovú skupinu a R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atóm vodíka.

5. Použitie podľa nároku 1 derivátu dehydropiandrosterónu

všeobecného vzorca I, kde znamená R^1 atóm kyslíka, R^2 atóm brómu a R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atóm vodíka.

6. Použitie podľa nároku 1 derivátu dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^1 atóm kyslíka, R^2hydroxylovú skupinu a R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atóm vodíka.

7. Farmaceutický prostriedok na prevenciu progresívnej nekrózy tkaniva, reperfúzneho poškodenia, bakteriálnej translokácie a syndrómu dýchacích ťažkostí dospelých, na prevenciu, alebo znižovanie bakteriálnej translokácie vyznačujúci sa tým, že obsahuje ako účinnú látku derivát dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I



I

kde znamená

R^1 atóm kyslíka alebo hydroxylovú skupinu,

R^2 atóm vodíka, metylovú skupinu, hydroxylovú skupinu alebo atóm halogénu, pokiaľ R^1 znamená atóm kyslíka a atóm vodíka, pokiaľ R^1 znamená hydroxylovú skupinu,

R^3 atóm vodíka, zvyšok mastnej kyseliny, skupinu alkylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, acetylenickú s 1 až 10 atómami uhlíka, $(X)_n$-fenylalkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkylovom podieli, $(X)_n$-fenylalkenylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkenylovom

podieli alebo skupinu všeobecného vzorca $-CO-R^8$,

R^4 a/alebo R^5 atóm vodíka, hydroxylovú skupinu alebo atóm halogénu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje konverziu R^3 vo význame atómu vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^6 atóm vodíka, hydroxylovú skupinu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje konverziu R^3 vo význame atómu vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^7 atóm vodíka, keď čiarkovaná čiarka znamená dvojitú väzbu, atóm kyslíka alebo vodíka a halogénu, keď čiarkovaná čiarka znamená jednoduchú väzbu alebo skupinu, ktorá neovplyvňuje antiischemickú činnosť, ktorá však inhibuje konverziu R^3 vo význame atómu vodíka na R^3 vo význame SO_3,

R^8 atóm vodíka, zvyšok mastnej kyseliny, skupinu alkylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 10 atómami uhlíka, acetyalenickú s 1 až 10 atómami uhlíka, $(X)_n$-fenylalkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkylovom podieli, $(X)_n$-fenylalkenylovú s 1 až 5 atómami uhlíka v alkenylovom podieli,

X na sebe nezávisle atóm halogénu, skupinu alkylovú s 1 až 5 atómami uhlíka, alkenylovú s 1 až 4 atómami uhlíka, alkoxyskupinu s 1 až 5 atómami uhlíka, karboxyskupinu, nitroskupinu, sulfátovú skupinu, sulfonylovú skupinu, skupinu karboxylového esteru s 1 až 6 atómami uhlíka alebo skupinu sulfátového esteru s 1 až 6 atómami uhlíka a

n 0, 1, 2 alebo 3.

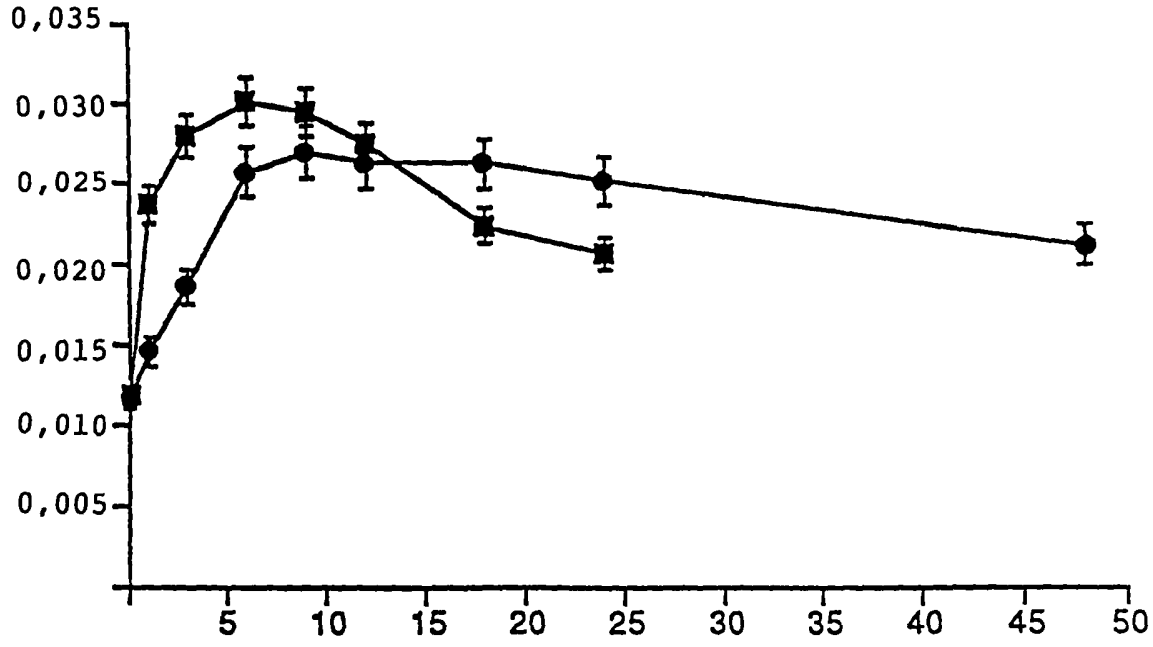
8. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje ako účinnú látku derivát dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^3 atóm vodíka, alebo zvyšok mastnej kyseliny a ostatné symboly majú v nároku 1 uvedený význam.

9. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje ako účinnú látku derivát dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^1 atóm kyslíka a R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atóm vodíka.

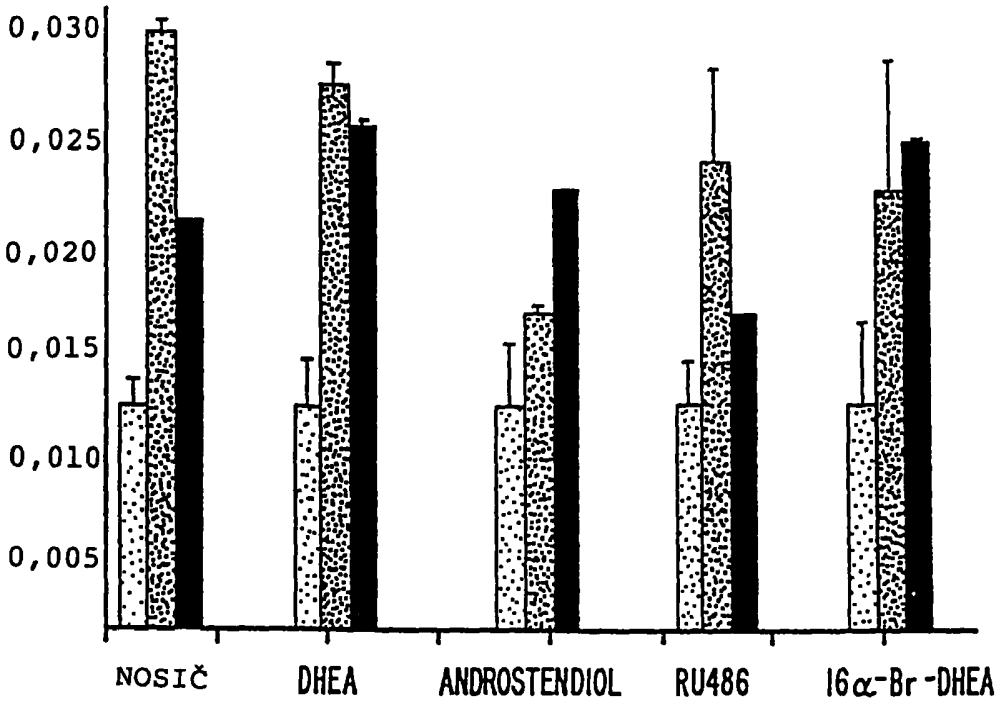
10. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje ako účinnú látku derivát dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^1 hydroxylovú skupinu a R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atóm vodíka.

11. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje ako účinnú látku derivát dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^1 atóm kyslíka, R^2 atóm brómu a R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atóm vodíka.

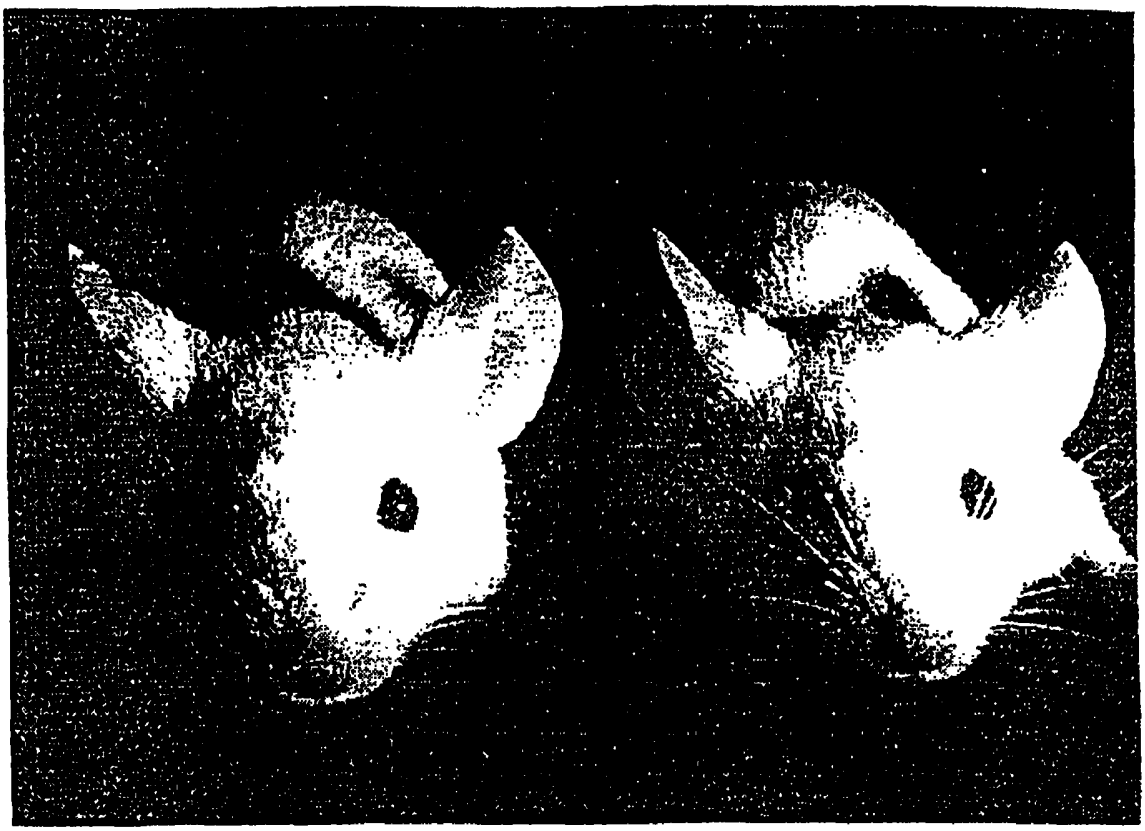
12. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje ako účinnú látku derivát dehydropiandrosterónu všeobecného vzorca I, kde znamená R^1 atóm kyslíka, R^2hydroxylovú skupinu a R^3, R^4, R^5, R^6 a R^7 atóm vodíka.



Obr. 1


0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
NOSIČ
DHEA
ANDROSTENDIOL
RU486
16α-Br-DHEA

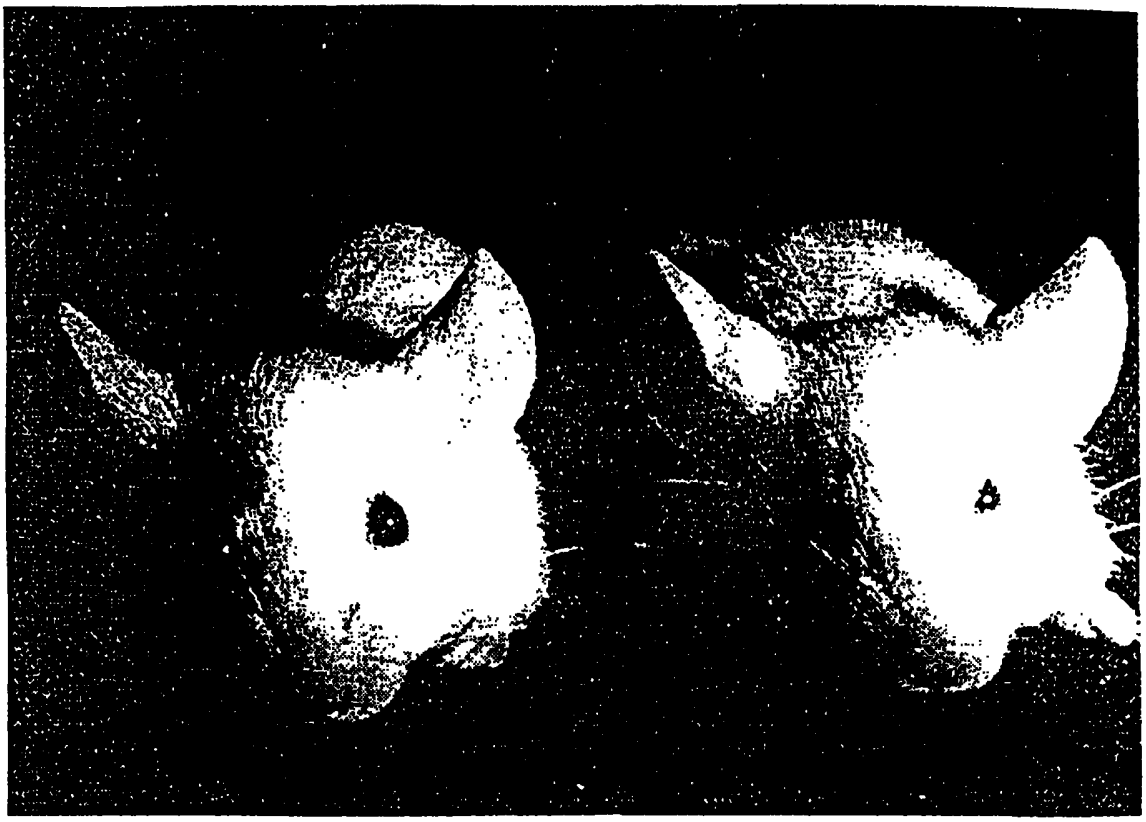
Obr. 2



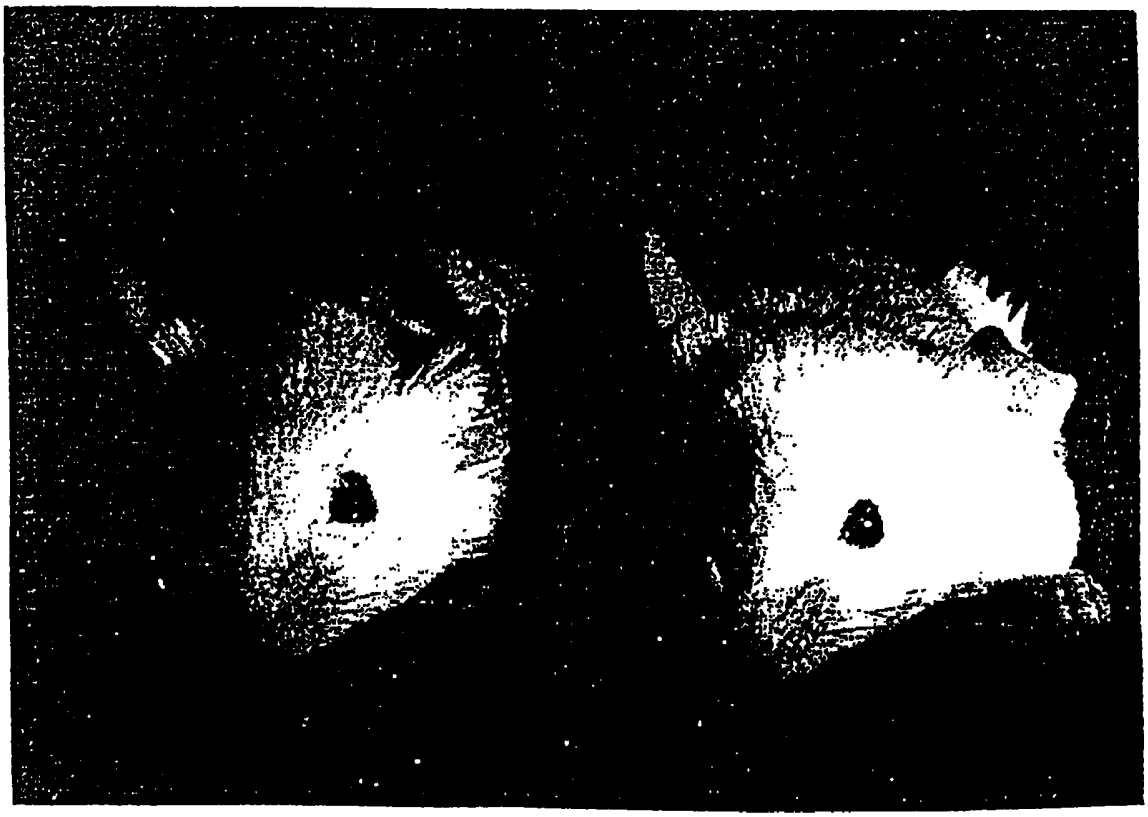
Obr. 3a



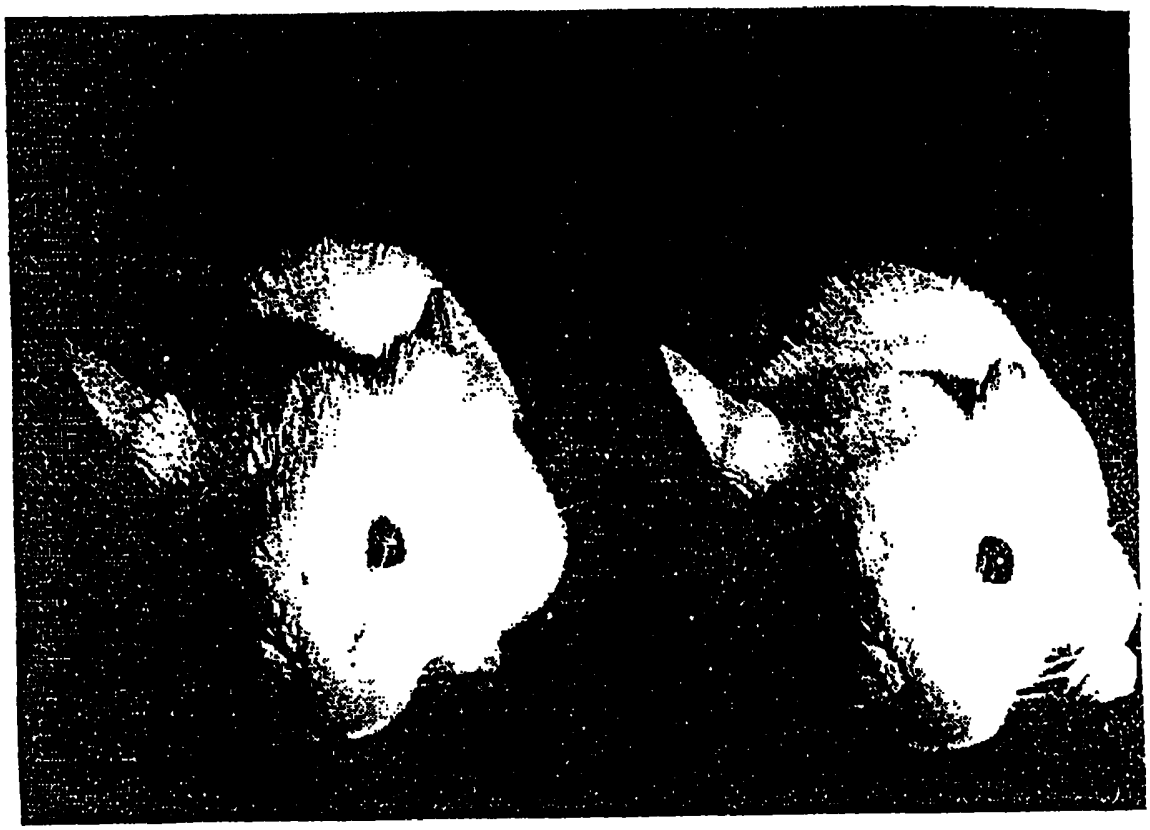
Obr. 3b



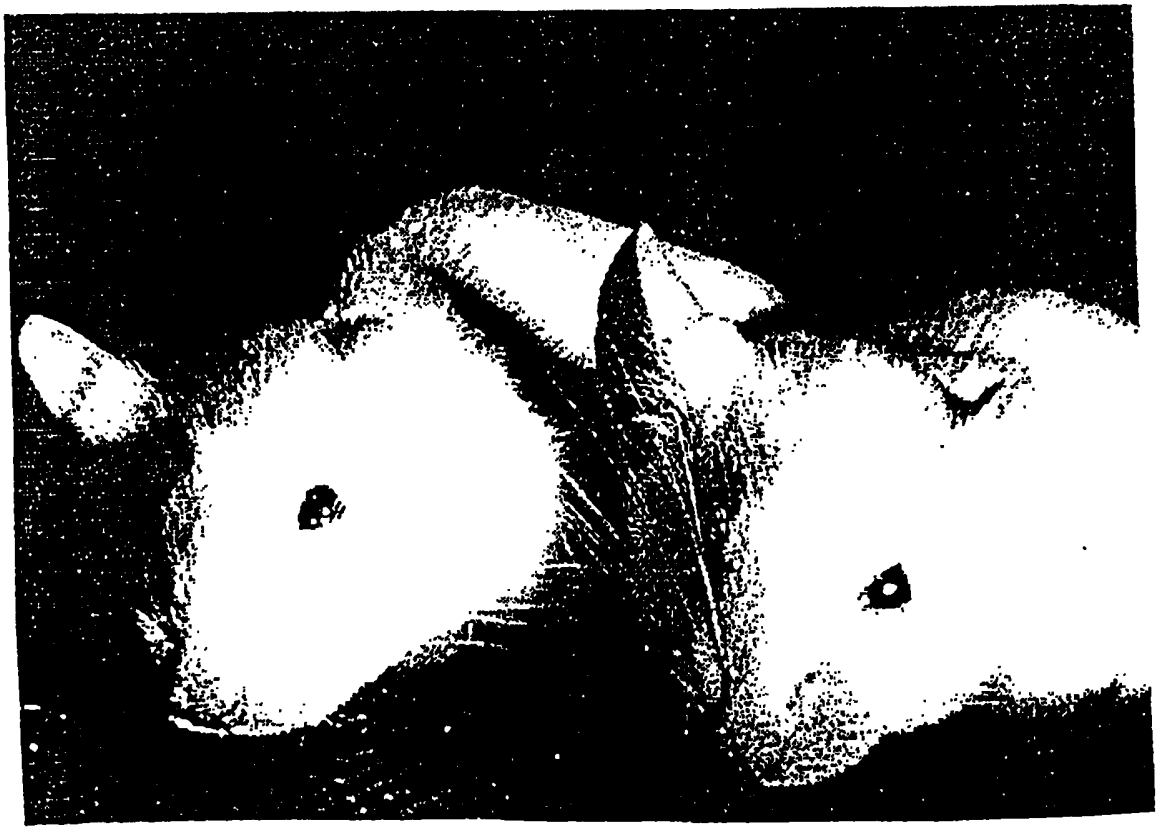
Obr. 3c



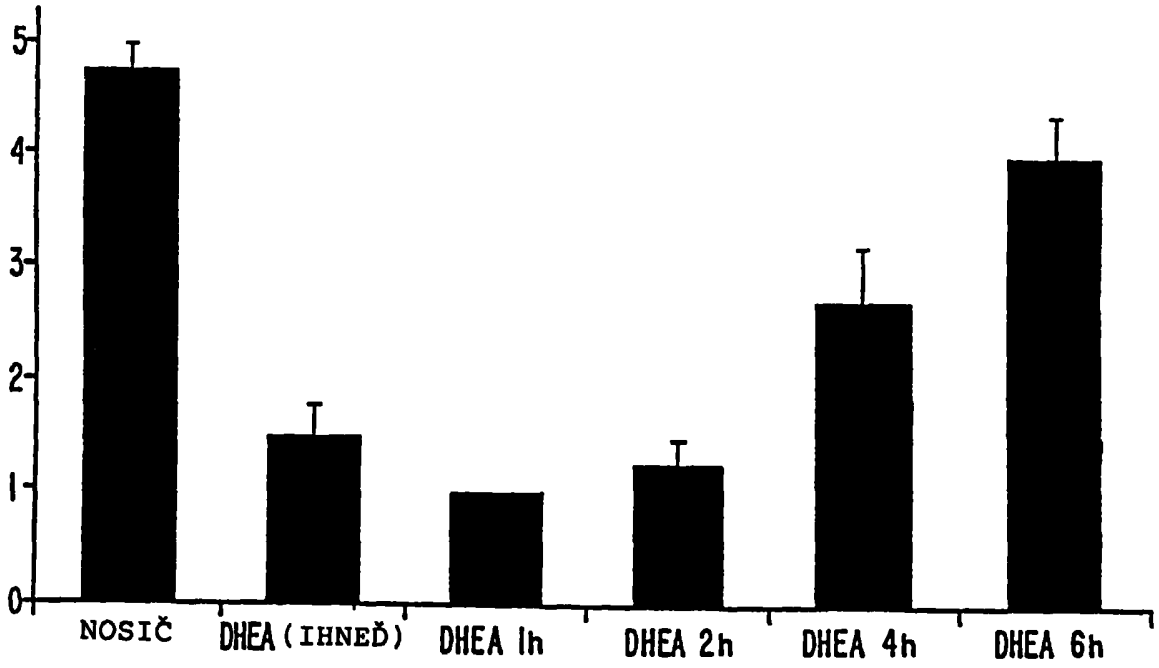
Obr. 3d



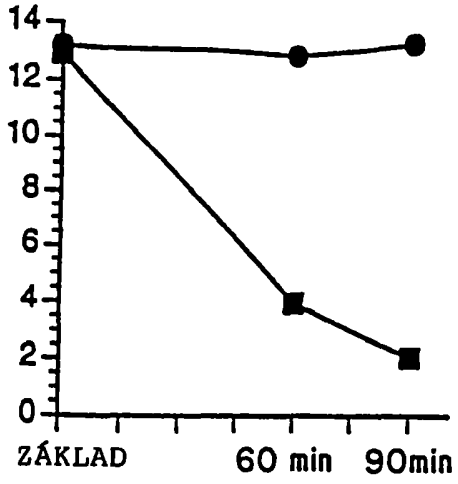
Obr. 3e



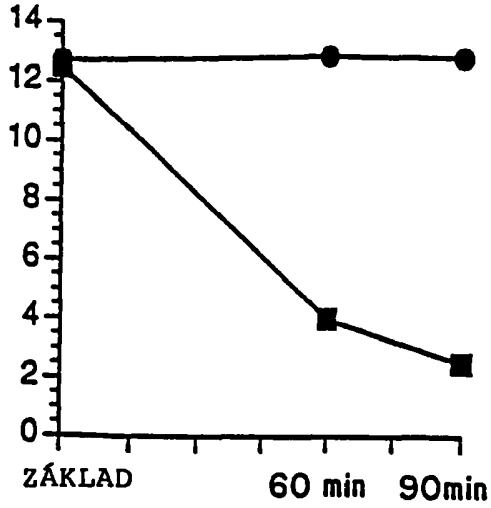
Obr. 3f



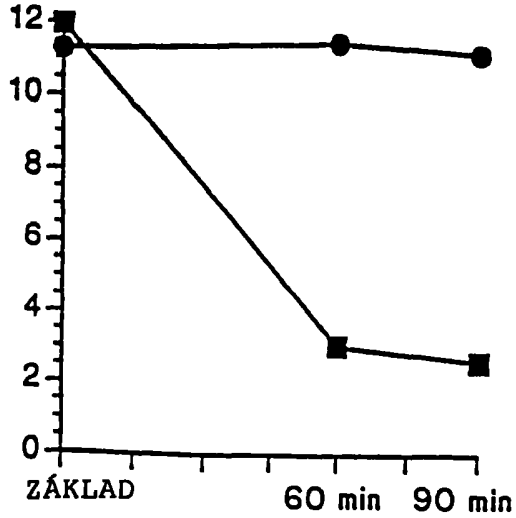
Obr. 4



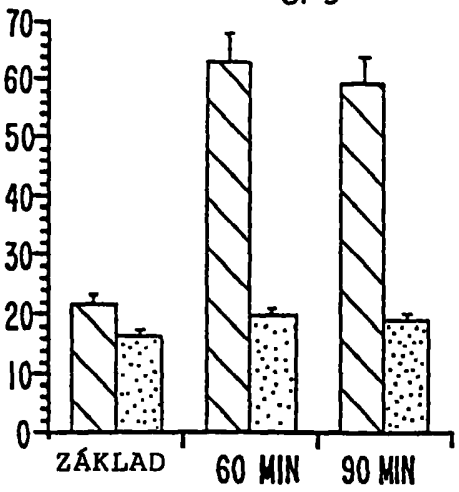
Obr. 5a



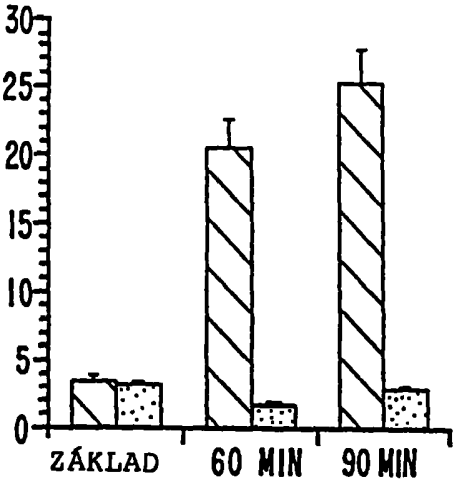
Obr. 5b



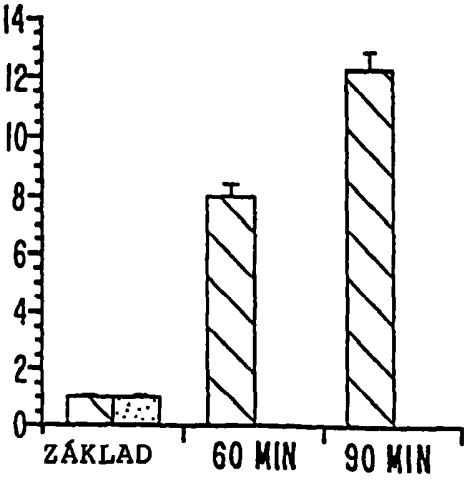
Obr. 5c



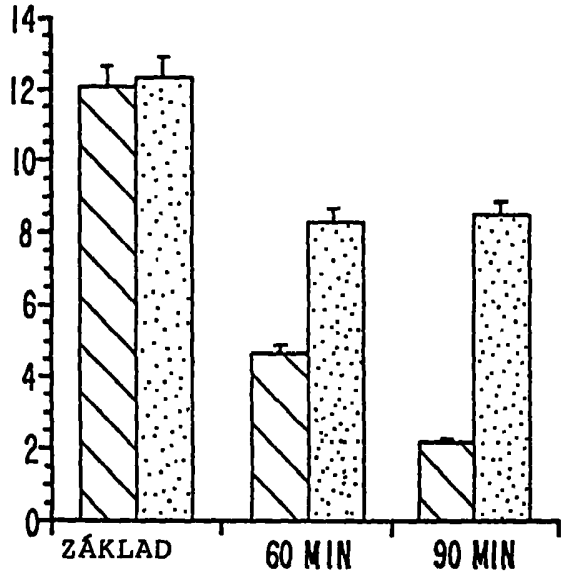
Obr. 6a



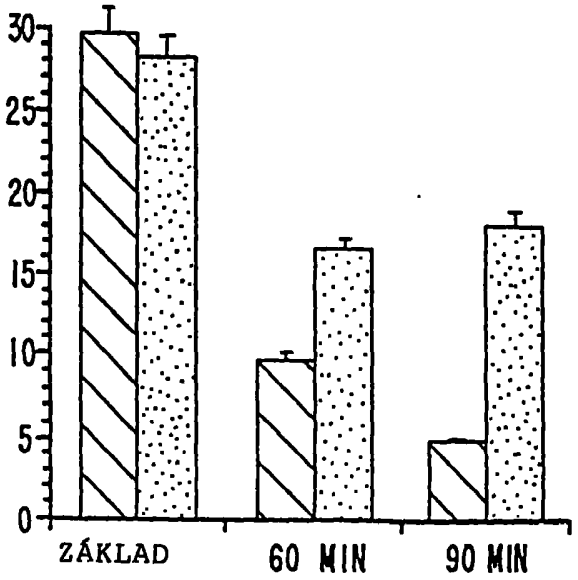
Obr. 6b



Obr. 6c


14
12
10
8
6
4
2
0
ZÁKLAD
60 MIN
90 MIN

Obr. 7a


30
25
20
15
10
5
0
ZÁKLAD
60 MIN
90 MIN

Obr. 7b