

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

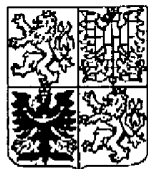
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2598-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08. 02. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.02.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/389304**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 05. 98**
(Věstník č. 5/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/01745**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/25184**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 L 9/04
A 61 K 9/12

(71) Přihlášovatel:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION,
Boston, MA, US;

(72) Původce:

Zapol Warren M., Concord, MA, US;
Bloch Kenneth D., Brookline, MA, US;

(74) Zástupce:

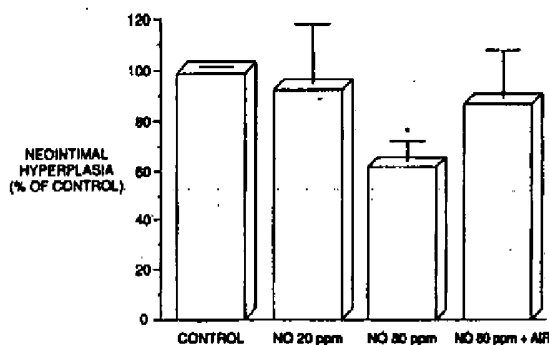
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14021;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Použití plynného oxidu dusnatého pro přípravu léčiva pro léčení, inhibici nebo prevenci vaskulární trombózy nebo arteriální restenózy

(57) Anotace:

Použití plynného oxidu dusnatého pro přípravu léčiva pro léčení nebo prevenci arteriální restenózy, vyplývající z nadměrné hyperplazie intimy u savce. Plynný oxid dusnatý může být použit v kombinaci se sloučeninami, které potencují blahodárné účinky inhalovaného oxidu dusnatého a antitrombotickými přípravky, které doplňují nebo zvyšují blahodárné účinky inhalovaného oxidu dusnatého.



CZ 2598-97 A3

Použití plynného oxidu dusnatého pro přípravu léčiva pro léčení, inhibici nebo prevenci vaskulární trombózy nebo arteriální restenózy.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká použití plynného oxidu dusnatého pro přípravu léčiva pro léčení, inhibici nebo prevenci vaskulární trombózy nebo arteriální restenózy vyplývající z nadměrné hyperplazie intimy.

Dosavadní stav techniky

Trombóza, tj. tvorba nebo přítomnost krevní sraženiny v krevní cévě, je následkem fyzického poranění arteriální stěny vaskulárním intervenčním výkonem jako je perkutánní transluminální koronární angioplastika ("PTCA", druh balonkové angioplastiky) nebo chirurgický výkon - koronární bypass. Trombóza může být také důsledkem přirozené progresse nemoci, jako je ateroskleróza. Jako antitrombotika byly používány různé přípravky, včetně aspirinu, prostaglandinu E₁, selektivních inhibitorů tromboxanu A₂, selektivních inhibitorů trombinu, blokátorů trombocytového receptoru GPIIb/IIIa, tkáňového aktivátoru plazminogenu, streptokinázy, heparinu a kistrinu. Viz např. Yasuda a kol. (Circulation 83:1038 (1991)), a Gold a kol., Circulation (Supplement IV) 83:IV26 (1991)). Běžně dostupné přípravky

působící proti trombocytům zahrnují aspirin, tiklopidin, monoklonální protilátky, nitroglycerin a nitroprusid sodný.

Jiný nežádoucí výsledek arteriálního poranění při vaskulárních intervenčních výkonech je arteriální restenóza. Například PTCA je rozsáhle používána při zprůchodnění uzavřených arterií jak v koronárním, tak v periferním vaskulárním systému. Ačkoliv je původně úspěšná ve více jak 95 procentech případů, během šesti měsíců se u 30 až 50 procent pacientů objeví buď postupné, opětné, zúžení nebo reokluzní proces, známý jako restenóza.

Vaskulární intervenční výkony mají tendenci k poškození cévní stěny. Takové poranění spouští proliferaci buněk hladkých svalů ve stěně cévy, což má za následek hyperplazii intimy. Tato proliferace může být částečně způsobena účinky růstových faktorů pocházejících z trombocytů (platelet-derived growth factor), které uvolní trombocyty adherující k místu arteriálního poranění. Nadměrná hyperplazie intimy vede k restenóze, tj. k opětnému zúžení průsvitu artérie. Tak může arteriální restenóza vážně omezit dlouhodobou účinnost vaskulárních intervenčních výkonů.

Podstata vynálezu

Bylo zjištěno, že inhalovaný plyn oxid dusnatý (NO) zvyšuje průchodnost krevních cév po lýzi trombu v místě kritické stenózy, aniž by způsobil jakýkoliv systémový hemodynamický účinek. Antitrombotické účinky inhalovaného NO přetrvávají po ukončení inhalace NO. Bylo také objeveno, že

inhalovaný NO inhibuje vznik arteriální restenózy plynoucí z nadměrné hyperplazie intimy.

Ve shodě s tím vynález uvádí použití plynného oxidu dusnatého pro přípravu léčiva pro léčbu, inhibici nebo prevenci trombózy u savce. Trombóza může být spojena s nemocí nebo poraněním.

Dále vynález uvádí použití plynného oxidu dusnatého pro přípravu léčiva pro léčbu, inhibici nebo prevenci arteriální restenózy u savce. Arteriální restenóza může být spojena s nemocí nebo poraněním.

Dále vynález popisuje použití oxidu dusnatého v kombinaci se sloučeninou, která potencuje blahodárné účinky inhalovaného NO pro přípravu léčiva. Jeden způsob, kterým druhá sloučenina potencuje blahodárné účinky inhalace NO, je prodloužení účinku inhalovaného NO v cílových tkáních nebo buňkách, které interagují s cílovými tkáněmi, aniž by se způsobila nežádoucí systémová vazodilatace a průvodné snížení systémového krevního tlaku. Konkrétněji může být prodloužení antitrombotického a/nebo inhibujícího účinku na hyperplazii intimy inhalovaným NO dosaženo kombinací přípravku inhibujícího fosfodiesterázu (tj. před, během nebo ihned po) s inhalovaným NO. Preferované inhibitory fosfodiesterázy jsou ty, které selektivně inhibují cGMP-specifické fosfodiesterázy, zatímco mají minimální vliv na odbourávání cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP) dalšími fosfodiesterázami. Preferovaný inhibitor fosfodiesterázy, který projevuje výše zmíněnou specifickou, je ZaprinastTM (M&B 22948, 2-o-propyloxy-

fenyl-8-azapurin-6-on, Rhone-Poulenc Rorer, Dagenham Essex, UK). Jsou známy další cGMP-specifické inhibitory fosfodiesterázy a Zaprinast™ jimi může být nahrazen.

Další způsob, kterým druhá sloučenina potencuje blahodárné účinky inhalace NO, je prodloužení poločasu rozpadu NO in vivo. Toho může být dosaženo například podáváním superoxid-dismutázy. Superoxid-dismutáza odstraňuje superoxidové radikály, které reagují s NO.

V dalším preferovaném ztělesnění může být v kombinaci s inhalovaným NO podán další antitrombotický přípravek, který zvyšuje blahodárné antitrombotické účinky inhalovaného NO. Příklady zahrnují aspirin, tiklopidin, monoklonální protilátky, nitroglycerin a nitroprusid sodný.

V tomto textu používaný termín "akutní ischemický koronární syndrom" znamená akutní uzávěr koronární arterie, např. akutní infarkt myokardu, nestabilní anginu, stupňující se anginu, anginu pectoris, koronární intermediární syndrom, angina pectoris status post thrombolysis a angina pectoris status post PTCA.

V tomto textu používaný termín "antitrombotický přípravek" znamená přípravek, který inhibuje tvorbu trombu nebo stimuluje trombolýzu, tj. rozpouštění trombu, nebo činí obé.

V tomto textu používaný termín "hyperplazie intimy (nebo neointimální hyperplazie)" znamená proliferaci buněk hladkého svalstva v intimě arterií jako odpověď na obnažení arteriálního endotelu.

V tomto textu používaný termín "revaskularizace"

znamená znovunastolení zásobování krví v tělesných částech savce.

V tomto textu používaný termín "cílové buňky" znamená buňky jiné než plicní, které po inhalaci NO interagují přímo s NO, a zprostředkovávají blahodárny účinek inhibicí, prevencí nebo léčbou trombózy nebo arteriální restenózy.

V tomto textu používaný termín "terapeuticky účinná koncentrace plynného NO" je koncentrace, která u pacienta vyvolává jednu nebo více z následujících událostí: úlevu od bolesti na hrudníku, úlevu od dušnosti, vymizení ischemických elektrokardiografických změn a zlepšený průtok koronárními arteriemi (což může být prokázáno angiografií).

V tomto textu používaný termín "terapeuticky účinné množství inhibitoru fosfodiesterázy" je množství, které zvyšuje trvání (tj. poločas rozpadu) nebo mohutnost terapeutického účinku plynného NO.

V tomto textu používaný termín "trombóza" znamená tvorbu nebo přítomnost krevní sraženiny v krevní cévě, tato sraženina může způsobit infarkt nebo ischemii tkání zásobovaných touto cévou.

V tomto textu používaný termín "arteriální restenóza" znamená abnormální zúžení průsvitu arterie jako výsledek nadměrné hyperplazie (neo)intimy.

V tomto textu používaný termín "vaskulární intervenční výkon" znamená jakýkoliv chirurgický výkon, který zahrnuje anatomické otevření nebo mechanické porušení krevní cévy. Neúplný seznam vaskulárních intervenčních výkonů zahrnuje balonkovou angioplastiku, laserovou angioplastiku,

20.02.98

chirurgický výkon na koronárních arteriích, vynětí ateromového plátu (aterektomie) a stenty koronárních arterií.

Použití samotného plynného NO nebo v kombinaci pro přípravu léčiva pro léčbu, inhibici nebo prevenci trombózy, která může vyplývat z přirozeně se vyskytující nemoci, např. aterosklerózy, nebo z vaskulárního intervenčního výkonu, např. angioplastiky nebo chirurgického výkonu na koronárních arteriích. Léčivo je použitelné pro léčbu, inhibici nebo prevenci arteriální restenózy plynoucí z nadměrné hyperplazie intimy. Tato arteriální restenóza je častá komplikace spojená s vaskulárními intervenčními výkony, jako je PTCA nebo koronární bypass.

Podle předkládaného vynálezu může být plynný NO použit:

- (a) kontinuálně nebo intermitentně,
- (b) v nepřítomnosti tabákového kouře,
- (c) v koncentraci mezi 0,1 a 300 ppm (miliontin), výhodně mezi 1,0 a 200 ppm, a nejvýhodněji mezi 20 a 100 ppm,
- (d) jako směs obsahující NO, kyslík (O_2) a dusík (N_2) nebo jiné inertní plyny, mající výhodně FiO_2 (tj. objemovou frakci O_2) od 0,20 do 0,99, přičemž frakce O_2 ve vzduchu je 0,21, a kde plynný NO je smísen s plynem obsahujícím O_2 krátce před inhalací (tj. méně než 5 minut před inhalací a výhodně méně než jednu minutu před inhalací a
- (e) to tak, že koncentrace NO_2 je sledována a udržována v bezpečném rozmezí (např. méně než 1 ppm).

Důležitá výhoda předkládaného vynálezu je, že

inhalovaný NO nenavozuje systémovou vazodilataci a průvodní akutní systémovou hypotenzi. Systémová vazodilatace je nežádoucí, potenciálně nebezpečný vedlejší účinek spojený s nepřerušovaným systematickým uvolňováním NO z perorálních nebo intravenózně podávaných sloučenin uvolňujících NO, které jsou používány ke zpomalení vzniku trombózy nebo nadměrné hyperplazie intimy.

Další charakteristické rysy a výhody vynálezu budou zjevné z následujícího popisu preferovaných ztělesnění a z patentových nároků.

Podrobný popis vynálezu

Trombóza

Trombóza, která má být léčena, inhibována nebo jí má být zabráněno, může být důsledkem jakékoliv různorodé příčiny trombóz. Například trombóza může být posttraumatická arteriální trombóza. Trombóza může být v jakékoliv rozmanité lokalizaci v těle savce. Například lokalizace trombózy může být arteriální, venózní, koronární, cerebrální, femorální, renální nebo placentární. Výhodně lokalizace léčené, inhibované nebo předcházené trombózy není v plicích.

Koronární trombóza je často spojena s akutním ischemickým koronárním syndromem. Jakýkoliv akutní ischemický koronární syndrom spojený s trombózou může být léčen, inhibován nebo se mu dá předcházet inhalovaným NO podle předkládaného vynálezu. Akutní ischemický koronární syndrom spojený s trombózou může být doprovázen např. nemocí

uzavírající tepny nebo vaskulárním intervenčním výkonem. Akutní ischemický koronární syndrom spojený s trombózou zahrnuje, ale není omezen na, infarkt myokardu, nestabilní anginu pectoris, trombózu po koronární revaskularizaci a reokluzi po koronární trombolyze. Koronární revaskularizace může být dosaženo různými známými vaskulárními intervenčními výkony, jako je např. PTCA, laserová angioplastika, přemostění koronární arterie štěpem (koronární bypass), vynětí ateromového plátu (aterektomie) z koronární arterie nebo stenty koronární arterie.

Podle předkládaného vynálezu může být inhalovaný NO použit k léčbě savce, u kterého byla rozpoznána existující trombóza. Je známo, že savci, obzvláště lidé, projevují různé známky a příznaky trombózy, která může být takto rozpoznána. Poznání těchto známek a příznaků je v moci lékařů. Známky a příznaky trombózy u lidí zahrnují, ale nejsou omezeny na, následující události: bolest na hrudníku, dušnost, paralýza, bolest v končetině, infarkt myokardu, angina pectoris, nestabilní angina pectoris, zesilující se angina pectoris, městnavé srdeční selhání ischemického původu, kardiogenní šok, onemocnění periferních cév a postižení končetin ischemického původu. V jednom ztělesnění předkládaného vynálezu je identifikovaným savcem člověk, který má trombózu a trombóza, která má být léčena inhalací NO, se projevuje jako infarkt myokardu.

Inhalovaný NO může být také použit k inhibici nebo prevenci vývoje trombózy u savce, který nemá existující trombózu, ale považuje se za rizikového z hlediska rozvoje

trombózy. Je známo, že při určitých existujících patologických stavech, jako je např. ateroskleróza, je jedinec ohrožen rizikem rozvoje trombózy. Navíc určité vaskulární intervenční výkony, např. balonková angioplastika a koronární arteriální bypass, kladou na jedince riziko vývoje trombózy. Proto mohou být podle předkládaného vynálezu výhodně léčeni jedinci, u nichž jsou diagnostikovány patologické stavy spojené se zvýšeným rizikem vzniku trombózy, jedinci, kteří prodělali jeden nebo více vaskulárních intervenčních výkonů a jedinci, kterých se bezprostředně týká provedení jednoho nebo více vaskulárních intervenčních výkonů.

Podobně může být identifikovaný savec člověk v riziku vývoje trombózy, kdy je riziko spojeno s nemocí uzavírající tepny, jako je ateroskleróza. Jednotlivci s takovými patologickými stavy jsou rozpoznávání způsoby známými lékařům zkušeným v příslušných oblastech lékařské praxe.

V dalším ztělesnění předkládaného vynálezu je riziko spojeno s vaskulárním intervenčním výkonem jako je angioplastika. V konkrétně preferovaném ztělesnění je identifikovaný savec člověk v riziku rozvoje trombózy jako výsledek PTCA.

Arteriální restenóza

Vynález poskytuje jednoduché, rychlé, selektivní a účinné použití NO pro přípravu léčiva pro léčbu, inhibici nebo prevenci arteriální restenózy plynoucí z nadměrné hyperplazie intimy. Nadměrná hyperplazie intimy a arteriální restenóza se často vyskytují po vaskulárních intervenčních

výkonech jako je angioplastika jakékoliv cévy (např. karotidy, femorální, koronární apod.) nebo jakýkoliv koronární revaskularizační výkon, včetně balonkové angioplastiky, laserové angioplastiky, bypassu koronární arterie, aterektomie nebo stentů koronární arterie.

Podle předkládaného vynálezu může být použit plynň NO pro přípravu léčiva k léčbě savce, u kterého byla rozpoznána existující arteriální restenóza. Je známo, že savci projevují různé známky a příznaky arteriální restenózy, která může být takto rozpoznána. Poznání těchto známek a příznaků je v moci lékařů. Známky a příznaky arteriální restenózy u savce zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, následující události: bolest na hrudníku, dušnost, elektrokardiografické změny a nálezy při koronární angiografii. Cílem léčby existující arteriální restenózy inhalovaným NO je redukce tloušťky intimy opětně zúžené arterie tak, aby se zvětšil průměr průsvitu arterie, tj. aby se redukovala patologická striktura.

Podle předkládaného vynálezu může být plynň NO použit pro přípravu léčiva k inhibici nebo prevenci arteriální restenózy u savce (např. člověka), který nemá existující arteriální restenózu, ale je shledán rizikovým z hlediska rozvoje arteriální restenózy. Určité vaskulární intervenční výkony, např. PTCA a koronární bypass, mohou způsobit arteriální poranění. Je známo, že arteriální poranění vede k nadměrné

restenózy plynoucí z nadměrné hyperplazie intimy. Nadměrná hyperplazie intimy a arteriální restenóza se často vyskytují po vaskulárních intervenčních výkonech jako je angioplastika jakékoliv cévy (např. karotidy, femorální, koronární apod.) nebo jakýkoliv koronární revaskularizační výkon, včetně balonkové angioplastiky, laserové angioplastiky, bypassu koronární arterie, aterektomie nebo stentů koronární arterie.

Podle předkládaného vynálezu může být inhalovaný NO použit k léčbě savce, u kterého byla rozpoznána existující arteriální restenóza. Je známo, že savci projevují různé známky a příznaky arteriální restenózy, která může být takto rozpoznána. Poznání těchto známek a příznaků je v moci lékařů. Známky a příznaky arteriální restenózy u savce zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, následující události: bolest na hrudníku, dušnost, elektrokardiografické změny a nálezy při koronární angiografii. Cílem léčby existující arteriální restenózy inhalovaným NO je redukce tloušťky intimy opětně zúžené arterie tak, aby se zvětšil průměr průsvitu arterie, tj. aby se redukovala patologická striktura.

Nebo může být inhalovaný NO použit, podle předkládaného vynálezu, k inhibici nebo prevenci arteriální restenózy u savce (např. člověka), který nemá existující arteriální restenózu, ale je shledán rizikovým z hlediska rozvoje arteriální restenózy. Určité vaskulární intervenční výkony, např. PTCA a koronární bypass, mohou způsobit arteriální poranění. Je známo, že arteriální poranění vede k nadměrné

hyperplazii intimy a arteriální restenóze. Tudiž tyto výkony kladou na jedince riziko vývoje arteriální restenózy. Proto mohou být výhodně léčeni podle předkládaného vynálezu jedinci, kteří prodělali jeden nebo více vaskulárních intervenčních výkonů a jedinci, kterých se bezprostředně týká provedení jednoho nebo více vaskulárních intervenčních výkonů.

Inhalovaný NO je například podáván pacientovi, u kterého se plánuje provedení vaskulárního intervenčního výkonu. Inhalovaný NO může být podáván před vaskulárním intervenčním výkonem, aby se minimalizoval stupeň zesílení intimy, které nastane po arteriálním poranění normálně spojeném s vaskulárními intervenčními výkony. Pacient, který dostává inhalovaný NO jako preventivní opatření před vaskulárním intervenčním výkonem, může nebo nemusí mít již existující arteriální restenózu. Nebo může být inhalovaný NO podáván pacientovi, který již prodělal vaskulární intervenční výkon. V této situaci podávání inhalovaného NO výhodně začíná během doby vaskulárního intervenčního výkonu. Ovšem odborník zná, že inhalovaný NO může být podáván před, během a po vaskulárním intervenčním výkonu. Bez ohledu na to, zda inhalovaný NO je podáván před, během nebo po výkonu, či platí všechny tři možnosti, může být inhalovaný NO podáván kontinuálně nebo intermitentně.

Podávání inhalovaného NO

Inhalovaný NO je výhodně podáván ze zdroje uskladněného stlačeného plynu NO. Stlačený plyn NO může být získán od komerčního dodavatele jako je Airco (Murray Hill, NJ),

typicky jako směs 200-800 ppm NO v čistém plynu N_2 . Zdroj NO může být 100% NO, nebo zředěný N_2 či jakýmkoliv jiným inertním plynem (např. heliem). Je absolutně nutné, aby NO byl získaný a uskladněný jako směs prostá jakéhokoli kontaminujícího O_2 nebo oxidů dusíku vyššího stupně, protože takové vyšší oxidy dusíku (které se mohou tvořit reakcí O_2 s NO) jsou potenciálně škodlivé plicním tkáním. Je-li požadováno, může být čistota NO před podáváním pacientovi prokázána chemiluminiscenční analýzou za použití známých metod. Jsou komerčně dostupné chemiluminiscenční analyzátory NO-NO_x (např. Model 14A, Thermo Environmental Instruments, Franklin, MA). Směs NO- N_2 může být míchána se vzduchem nebo O_2 např. kalibrovaným rotametrem, který byl předem ověřen spirometrem. Konečnou koncentraci NO v dýchací směsi je možno ověřit chemickou nebo chemiluminiscenční technikou odborníkům dobře známou (např. Fontijn a kol., Anal. Chem. 42:575 (1970)). Nebo mohou být koncentrace NO a NO₂ sledovány pomocí elektrochemického analyzátoru. Jakékoliv nečistoty, jako NO₂, mohou být vyčištěny působením roztoků NaOH, Baralymem nebo natronovým vápnem. Jako přídatná kontrola může být také stanoven FI_{O_2} konečné směsi plynů. Je-li žádoucí, může mít ventilátor k dýchacímu výstupu přidaný plynový čistič, aby se zajistilo, že do okolního prostředí neuniknou významná množství NO.

V nemocnici nebo v případě náhlé příhody může být podávání plynu NO provedeno například připojením tlakové lahve se stlačeným plynem NO v N_2 a druhé lahve s kyslíkem nebo směsí kyslíku/ N_2 k inhalátoru určenému mísit plyn ze

dvou zdrojů: řízením toku plynu z každého zdroje může být koncentrace NO inhalovaného pacientem udržována na optimální hladině. Plyn NO může být také mísen se vzduchem v místnosti za použití standardního nízkotlakého mísicího přístroje (např. Bird Blender, Palm Springs, CA). NO může být vyvíjen z N_2 a O_2 (tj. vzduch) za použití elektrického generátoru NO. Takový generátor je popsán v patentové žádosti Spojených Států Zpatl 07/850 383 (vyrozumění o povolení podáno), zahrnuto zde v odkazech. Navíc může být NO poskytnut intermitentně z inhalátoru. Použití inhalátoru může být obzvláště výhodné, je-li v kombinaci s NO podáván inhibitor fosfodiesterázy perorálně nebo inhalací.

NO může být podáván savci, u kterého byla rozpoznána trombóza nebo arteriální restenóza, nebo savci, který je v riziku rozvoje trombózy nebo arteriální restenózy, v koncentraci od 0,1 ppm do 300 ppm ve vzduchu, čistém kyslíku nebo jiném vhodném plynu nebo plyné směsi, dokud je vyžadován. Výhodně je koncentrace 1,0 až 200 ppm a výhodněji 20 až 100 ppm (např. 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm nebo 80 ppm). Koncentrace může být přechodně na krátkou dobu zvýšena: např. 5 min. na 300 ppm NO, když je žádoucí okamžitý dramatický účinek. Z důvodů popsaných níže může průvodní léčení inhibitorem fosfodiesterázy snížit celkovou dávku vyžadovaného NO (nebo umožnit intermitentní dávkování) za tvorby uspokojujivého anti-trombotického nebo anti-restenotického účinku.

Pro léčbu, inhibici nebo prevenci arteriální restenózy může být nezbytné podávat inhalovaný NO nazální vidlicí,

maskou, ve stanu, intratracheálním katetrem nebo endotracheální kanylou, po delší dobu, tj. dny nebo týdny. Podávání může být kontinuální během delší doby. Nebo může být podávání během delší doby intermitentní. Podávání plyného NO může být spontánní nebo mechanickou ventilací.

Stanovení účinků inhalovaného NO

Když je inhalovaný NO podáván k léčbě, inhibici nebo prevenci trombózy nebo arteriální restenózy, je žádoucí sledovat účinky inhalace NO. Takové sledování může být použito u konkrétního jedince, aby se ověřily žádoucí účinky a rozpoznaly nežádoucí vedlejší účinky, které by mohly nastat. Takové sledování je také užitečné při nastavení dávky, trvání a četnosti podávání inhalovaného NO danému jedinci.

Výhodně by měly být účinky inhalovaného NO na pacienta určeny dle jedné či více z následujících událostí: klinická manifestace jako je bolest na hrudníku, elektrokardiografie, pravidelné analýzy vaskulární průchodnosti ultrazvukovým vyšetřením, koronární arteriografií nebo jinými prostředky a zvýšení hladin cGMP v plazmě nebo trombocytech.

Inhibitory fosfodiesterázy

NO se rychle rozkládá reakcí s molekulárním kyslíkem za vzniku nitritů a nitrátů. Navíc NO, který se dostane do krve, je rychle inaktivován těsnou vazbou na hemoglobin. Z těchto důvodů má NO v arteriální krvi pouze krátký poločas rozpadu. To znamená, že inhalovaný NO se výhodně vyhne systémové vazodilataci, nežádoucímu, potenciálně nebezpečnému vedlejšímu účinku spojenému s nepřerušovaným

systematickým uvolňováním NO ze sloučenin uvolňujících NO.

Může být žádoucí prodloužit blahodárné účinky inhalovaného NO v cílových buňkách nebo buňkách interagujících s cílovými buňkami v plicích. V souvislosti s inhibicí trombózy, její prevencí a léčbou, jsou cílovými buňkami cirkulující trombocyty. V souvislosti s inhibicí arteriální restenózy, její prevencí a léčbou, jsou cirkulující trombocyty (a možná bílé krvinky) buňkami, které interagují s cílovými buňkami v cévní tkáni.

Při určování, jak prodloužit blahodárné účinky inhalovaného NO, je užitečné uvážit, že jeden z účinků NO in vivo je aktivace rozpustné guanylátcyklázy, která stimuluje produkci cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP). Alespoň některý z blahodárných účinků NO vyplývá ze stimulace biosyntézy cGMP plynem NO. Proto tedy je v preferovaném ztělesnění předkládaného vynálezu inhibitor fosfodiesterázy podáván v kombinaci s inhalací NO, aby se inhibovalo odbourávání cGMP endogenními fosfodiesterázami.

Inhibitor fosfodiesterázy může být do savce vpraven jakýmkoliv vhodným způsobem, včetně perorálního, transmukózního, intravenózního, intramuskulárního, subkutánního nebo intraperitoneálního způsobu. Nebo může být inhibitor savcem inhalován. Pro inhalaci je inhibitor fosfodiesterázy výhodně ve formě suchého prášku nebo aerosolizovaného roztoku, který má částice nebo kapky o velikosti menší než 10 μm , aby byl optimálně zanesen do alveolů a může být volitelně inhalován v plynu obsahujícím NO.

Preferovaným inhibitorem fosfodiesterázy je ZaprinastTM (M&B 22948, 2-o-propyloxyfenyl-8-azapurin-6-on, Rhone-Poulenc Rorer, Dagenham Essex, UK). ZaprinastTM selektivně inhibuje hydrolýzu cGMP s minimálním účinkem na odbourávání cAMP v buňkách hladkých svalů cév (Trapani a kol., J. Pharmacol. Exp. Ther. 258:269 (1991), Harris a kol., J. Pharmacol. Exp. Ther. 249:394 (1989), Lugnier a kol., Biochem. Pharmacol. 35:1743 (1986), Souness a kol., Br. J. Pharmacol. 98:725 (1989)). Když se používá ZaprinastTM podle předkládaného vynálezu, jsou preferované cesty podávání intravenózní nebo perorální. Vhodné rozmezí dávkování je určeno odborníkem. Zásobní roztok ZaprinastuTM může být připraven v 0,05 N NaOH. Zásobní roztok může být pak ředěn Ringerovým laktátovým roztokem na požadovanou konečnou koncentraci ZaprinastuTM bezprostředně před použitím.

V praxi může být vynález provozován s dalšími inhibitory fosfodiesterázy. V oboru jsou známy různé inhibitory fosfodiesterázy, včetně dipyridamolu a teofylinu. Jako u ZaprinastuTM může být způsob podávání a vhodné dávkování určeno odborníkem.

Další antitrombotické přípravky v kombinaci s inhalovaným NO

Trombóza může být léčena přípravky, které inhibují tvorbu trombu, přípravky, které stimulují trombolýzu, tj. rozpouštění trombu, nebo oběma. Příklady antitrombotických přípravků jsou aspirin, streptokináza, urokináza, tkáňový aktivátor plazminogenu ("t-PA"), met-t-PA, (tj. t-PA s methionovým zbytkem na N koncové části), FE1X (analog t-PA), heparin, hirudin a HirulogTM (analog hirudinu).

V praxi předkládaného vynálezu mohou být použity také další antitrombotické přípravky. Jeden nebo více takových antitrombotických přípravků může být podáván savci před, během nebo po léčbě inhalovaným NO, takže jejich samostatná antitrombotická aktivita je výhodně použita ke zvýšení antitrombotického účinku (účinků) inhalovaného NO.

Například v jednom ztělesnění předkládaného vynálezu pro léčbu trombózy je podána vhodná dávka t-PA před, během nebo okamžitě po inhalaci NO. Zatímco inhalovaný NO inhibuje nebo zabraňuje tvorbě nových trombů, t-PA bude stimulovat rozpouštění: (1) trombů již přítomných v období, kdy byl podáván inhalovaný NO nebo (2) trombů tvořených (třebaže ve snížené míře) během nebo těsně po inhalaci NO. Výběr vhodných antitrombotických přípravků podávaných v kombinaci s inhalovaným NO a výběr vhodné dávky a způsobu podávání těchto antitrombotických přípravků jsou v oboru známe.

V preferovaném ztělesnění předkládaného vynálezu je pro léčbu trombózy před, během nebo těsně po inhalaci NO podáván aspirin. Preferované rozmezí dávkování aspirinu je od 81 do 325 mg (perorálně) denně.

Zatímco byly dva aspekty předkládaného vynálezu popsány odděleně (tj. trombóza a arteriální restenóza), je nutné si uvědomit, že jedinec již může mít obě (či být v riziku jejich vývoje) onemocnění, trombózu i arteriální restenózu. Za takovýchto okolností mohou být obě stránky vynálezu v praxi uskutečňovány současně, u stejného jedince, pouze jednoduchým podáváním inhalovaného NO.

Popis obrázků

Obr. 1A je graf srovnávající čas, po který byla otevřena arterie (jako procento celkového času), u kontrolní skupiny, před, během a po inhalaci 0 ppm NO, v modelu trombózy koronárních arterií u psů.

Obr. 1B je graf srovnávající čas, po který byla otevřena arterie (jako procento celkového času), u skupiny, která inhalovala 20 ppm NO, před, během a po inhalaci NO, v modelu trombózy koronárních arterií u psů. Hvězdička označuje hodnotu významně se lišící od základních hodnot ($p < 0,05$).

Obr. 1C je graf srovnávající čas, po který byla otevřena arterie (jako procento celkového času), u skupiny, která inhalovala 80 ppm NO, před, během a po inhalaci NO, v modelu trombózy koronárních arterií u psů. Hvězdička označuje hodnotu významně se lišící od základních hodnot ($p < 0,05$).

Obr. 1D je graf srovnávající čas, po který byla otevřena arterie (jako procento celkového času), u skupiny, která inhalovala 200 ppm NO, před, během a po inhalaci NO, v modelu trombózy koronárních arterií u psů.

Obr. 2 je graf ukazující křivky agregace trombocytů indukované ADP u psů pro vzorky vystavené 0 ppm nebo 400 ppm NO.

Obr. 3 je graf, který shrnuje údaje o účinku inhalovaného NO na agregaci trombocytů u psů v závislosti na dávce.

Obr. 4 je graf srovnávací poměr intima/médie u kontrolních krys, krysy vystavené 20 ppm NO po dobu dvou týdnů, krysy vystavené 80 ppm NO po dobu dvou týdnů, a krysy vystavené 80 ppm NO po dobu jednoho týdne, následováno jedním týdnem inhalací vzduchu. Hvězdička označuje hodnotu významně se odlišující od základních hodnot ($p < 0.05$).

Příklady provedení vynálezu

Pokusy s trombózou

Účinky NO namířené proti trombocytům byly hodnoceny v uznávaném psím modelu akutní koronární trombolýzy po vytvoření trombu. Používaný psí model byl v podstatě týž, jaký byl popsán autory Yasuda a kol. (J. Am. Coll. Cardiol. 13:1409 (1989)) a Gold a kol. (Circulation (suppl. IV) 83: IV26 (1991)).

U dvaceti pěti dospělých psích kříženců (20-25 kg) obého pohlaví byla provedena anestézie pentobarbitalem (30 mg/kg tělesné váhy). Doplnující pentobarbital byl podáván pro udržování celkové anestézie. Trachey psů byly intubovány a jejich plíce byly mechanicky ventilovány, 15 dechů/min a 10-15 ml/kg, ventilátorem na FiO₂ 21 až 35% (Hudson Ventronics, Tenecula, CA), nastaveným pro udržování O₂ arteriální krve mezi 80 a 100 torry. Kyslíková saturace byla během pokusu kontinuálně sledována za použití pulzního oximetru (Nellcor, Inc., Hayward, CA).

Femorální arterie a vena byly kanylovány polyvinylchloridovým katetrem za účelem kontinuálního

sledování arteriálního tlaku, pro krevní odběry a infuze.

Při výskytu arytmií byl podáván Lidokain 0,1 mg/kg/min i.v.

V levém pátém mezižeberním prostoru byla provedena torakotomie. Perikard byl otevřen a zavěšen, čímž se vytvořilo perikardiální lůžko. Levá přední sestupná arterie byla uvolněna disekcí a byl izolován segment dlouhý 2,5 cm distálně k první diagonální větvi. Byl odebrán jeden mililitr krve pro vytvoření trombu. Katetr i.d. o průměru 0,7 mm byl zaveden do postranní větve izolovaného segmentu levé přední sestupné koronární arterie a do proximální části arterie byla umístěna ultrazvuková průtoková sonda (T101 Transonic System, Inc., Ithaca, NY) ke kontinuálnímu sledování krevního průtoku. Levá přední sestupná arterie, těsně distálně od místa plánované tvorby trombu, byla postupně zaškrcena plastickým vláknem o šířce 2 mm (Mass Gas and Electric Supply, Watertown, MA) tak, aby se omezil průtok krve na $50 \pm 10\%$ základní hodnoty. Předcházející angiografická studie prokázala, že toto zaškrcení zmenší průměr průsvitu cévy o více než 90%.

Izolovaná levá přední sestupná koronární arterie byla traumatizována čtyřmi po sobě jdoucími vnějšími kompresemi tupými kleštěmi po dobu 3 až 5 sekund, aby se poškodil endotel a podporovalo přichycení trombu. Byly provedeny smyčkové okluze distálně k sondě a proximálně k místu zaškrcení. Aby se indukovala tvorba trombu, byl katetrem z postranní větve do vyprázdněného segmentu koronární arterie injikován trombin (0,1 ml z roztoku 100 jednotek/ml, Thrombinar, Armour Pharmaceutical, Kankakee,

IL) smíšený s 0,3 ml krve. Po deseti minutách byla uvolněna proximální smyčka. Dvě minuty později byla uvolněna distální smyčka. Deset minut po vytvoření trombu byl intravenózně podán bolus heparinu (75 m.j./kg) a byl následován kontinuální infuzí heparinu (50 m.j./kg/h). Po 30 minutách stabilního uzávěru byly podávány v patnácti minutových intervalech bolusy rekombinantního t-PA (0,45 mg/kg, Activase™, Genentech Inc., South San Francisco, CA), dokud nebylo dosaženo rekanalizace trombóзованé koronární arterie nebo do maxima čtyř podaných bolusů.

Tento postup navodil střídavá období rekanalizace a reokluze (definovaná jako méně než 25% průtoku za stenózou) po počátečním obnovení průtoku v levé sestupné koronární arterii. Poměr času otevření arterie k celkovému času byl zaznamenáván jako primární výstupní proměnná. Kontinuálně se zaznamenávalo EKG, systémový arteriální tlak, tlak v levé předsíni srdeční a koronární průtok krve. Z další studie byla vyloučena zvířata, u nichž nastala: (1) žádná reperfuze, (2) reperfuze bez okluze, (3) méně než tři cykly během první 45-ti minutové doby sledování nebo (4) smrt před koncem první doby sledování.

Plyn NO (800ppm NO v dusíku, Airco, Murray Hill, NJ) byl smíšen se vzduchem v místnosti za použití standardního nízkotlakého mísicího přístroje (např. Bird Blender, Palm Springs, CA), a poté byl titrován různým množstvím NO těsně před dodáním do ventilátoru tak, aby se udržela konstantní FiO_2 . Hladina vdechovaného NO byla kontinuálně sledována chemiluminiscenčním analyzátozem NO-NO_x (Model 14A, Thermo

Environmental Instruments, Franklin, MA. Fontijin a kol.,
 výše). FIO_2 se měřila (oximetr č. 5590, Hudson, Temecula,
 Kalif.) distálně od rezervoáru poté, co byly smíšeny plyny
 obsahující NO . Vydechované plyny, stejně jako plyny
 vypouštěné z chemiluminiscenčního analyzátoru, byly odsávány
 za použití difuzérového výdechového jímače udržovaného
 v negativním atmosférickém tlaku laboratorním centrálním
 vakuovým systémem. Hladiny NO/NO_2 v okolí se během pokusu
 nezvyšovaly, jak bylo měřeno periodicky chemiluminiscencí.
 Vždy, když se odebíraly vzorky, se měřily hladiny
 methemoglobinu. Kontinuálně se sledovaly a zaznamenávaly
 hodnoty srdeční frekvence, krevního tlaku a koronárního
 průtoku.

Po 45-ti minutovém období základní studie (období před
 léčbou) byla zvířata rozdělena do čtyř skupin: skupině
 A ($n=6$) se podávalo 0 ppm inhalovaného NO (tj. vzduch) po
 dobu 45 minut, skupině B ($n=6$) se podávalo 20 ppm
 inhalovaného NO po dobu 45 minut, skupině C ($n=6$) se
 podávalo 80 ppm inhalovaného NO po dobu 45 minut a skupině
 D ($n=6$) se podávalo 200 ppm po dobu 45 minut. Všechny
 skupiny zvířat byly poté sledovány ve třetím období studie,
 které začalo po ukončení podávání NO a trvalo 45 minut
 (období po léčbě).

Měření agregace trombocytů in vitro

Krev osmi psů byla odebrána do 0,01M citrátu a stočena
 při teplotě místnosti v $370 \times g$ po dobu 5 minut pro přípravu
 plazmy bohaté na trombocyty (platelet-rich plasma - PRP)
 a v $1200 \times g$ po dobu 10 minut pro přípravu plazmy chudé na

trombocyty (platelet-poor plasma - PPP). PRP byla přechovávána pouze v plastických nádobkách nebo, během testování, v silikonizovaném sklu. Počet trombocytů v PRP (Thrombocounter CTM platelet counter, Coulter Electronics, Inc., Hialeh, FL) byl upraven zředěním plazmou PPP tak, aby se získalo $300\,000/\text{mm}^3 \pm 10\%$. PRP byla poté rozdělena do kyvet inkubovaných ve $37\text{ }^\circ\text{C}$ s magnetickými míchadélky (1 000 rpm) v agregometru s dvojitým kanálem (Model 440, Chrono-Log Corp., Havertown, PA). Propustnost světla byla kontinuálně zaznamenávána na zapisovači (Model 707, Chrono-Log Corp., Havertown, PA). Zkoumavka se vzorkem, u kterého se stanovovala agregace, byla uzavřena gumovou zátkou a do ní byly zapíchnuty dvě jehly kalibru 19 (Sherwood Medical, St. Louis, MO), což umožňovalo dodávku směsi plynu NO a kyslíku nad PRP. Vstupní jehla byla spojena přes měřič průtoku s rezervoárem plynu, do kterého se dodávala směs plynu NO, vzduchu a kyslíku, titrovaná jak popsáno výše. Koncentrace NO byla kontinuálně sledována chemiluminiscenčním analyzátozem NO-NO_x. Jehlový ventil umožňoval regulaci průtoku vzorkem na přibližně 40 ml/min. Pozitivní tlak se v systému udržoval tak, že výstupní jehla byla spojena s vodním manostatem s 5 cm vody, ve kterém se udržovalo konstantní probublávání.

Studie měřící agregaci trombocytů indukovanou ADP byly provedeny po expozici testovací kyvety obsahující 450 μl upravené PRP plynne směsi NO po dobu 10 minut. Během měření agregace indukované ADP se pokračovalo s podáváním plynu. Agregace trombocytů se studovala za použití různých

poměrných částí PRP vystavené 20, 80, 200 a 400 ppm NO, v náhodném pořadí. Aby se stanovila stabilita preparátů PRP, byly před a po podávání NO provedeny kontrolní studie agregace trombocytů indukované ADP bez NO. Všechny pokusy byly dokončeny během 4 hodin po odběru krevních vzorků.

Analýza dat

Arteriální průchodnost byla definována jako část celkové doby pozorování, během které byl průtok větší než 25% základního průtoku poté, co byla vytvořena počáteční stenóza. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ SEM, není-li uvedeno jinak. Významnost rozdílu mezi skupinami byla určována příslušným Studentovým t-testem, párovým či nepárovým. Významnost odpovědi na dávku při stanovení účinku NO na agregaci trombocytů indukovanou ADP byla stanovena dvoufaktorovou analýzou rozptylu. Za statisticky významnou se považovala hodnota $p < 0.05$.

Výsledky trombolýzy a reperfuze u modelu psů

V každé pokusné skupině vnější zaškrcení snížilo krevní průtok levou přední sestupnou arterií na $54 \pm 2\%$ základních hodnot, z 22 ± 2 na 10 ± 1 ml/min. Průměrný počet bolusů tPA nezbytný pro reperfuzi byl dva, s rozmezím od 1 do 4 (tabulka 1). Cyklus obnovení průtoku a reokluze doprovázený elektrokardiografickým důkazem myokardiálního poškození nastal u všech zvířat kromě jednoho, u kterého se neobjevila reokluze, toto zvíře bylo vyloučeno z další studie.

Tabulka 1

Základní hodnoty fyziologických parametrů

Měřený parametr	Skupina A 0 ppm NO (n=6)	Skupina B 20 ppm NO (n=6)	Skupina C 80 ppm NO (n=6)	Skupina D 200 ppm NO (n=6)
Průtok za stenózou (% před stenózou)				
Počet bolusů tPA	2,0±0,4	1,7±0,2	1,8±0,3	2,0±0,4
ACT (sek)	219±16	219±14	236±5,3	196±12,8
FiO ₂ (%)	29,0±1,1	27,5±1,0	32,2±1,5	31,6±3,0
Poměr (%)	55,7±8,5	50,6±6,9	48,8±2,9	45,2±5,6
Hb (mg/dl)	13,26±1,35	14,28±0,85	14,08±0,85	12,95±0,64
Počet trombocytů (x10 ³ /mm ³)	301±55	292±25	277±35	237±35
MethHb (%)	0,25±0,17	0,10±0,06	0,18±0,09	0,26±0,09

V tabulce 1: "Počet bolusů tPA" se týká počtu injikovaných bolusů, "ACT" se týká aktivovaného času srážení krve, "FiO₂" se týká vdechované frakce O₂, "Poměr" se týká neuzařené/uzavřené koronární arterie v základním stavu, "Počet trombocytů" se týká počtu trombocytů a "MethHb" se týká methemoglobinu (procento celkového hemoglobinu). Není žádný statisticky významný rozdíl mezi základními hodnotami poměrů průtoku při 0 ppm (kontroly), 20 ppm, 80 ppm a 200 ppm inhalovaného NO (n=6 pro každou skupinu).

Účinky inhalovaného NO na průchodnost arterií

Zvířatům, která dostávala 0 ppm inhalovaného NO (Skupina A), se průchodnost arterií během tří období léčby nezměnila (Obr. 1A). U zvířat, která dostávala 20 ppm inhalovaného NO (Skupina B), se průchodnost arterií zvýšila z $50,6 \pm 6,9\%$ během základního období před inhalací na $63,8 \pm 7,9\%$ během období inhalace ($p < 0,01$) (Obr. 1B). U zvířat, která dostávala 80 ppm inhalovaného NO (Skupina C), se průchodnost arterií zvýšila z $48,8 \pm 2,9\%$ během základního období před inhalací na $75,1 \pm 6,7\%$ během období inhalace ($p < 0,01$) (Obr. 1C). U zvířat, která dostávala 200 ppm inhalovaného NO (Skupina D), se průchodnost arterií zvýšila ze $45,27 \pm 5,6\%$ během základního období před inhalací na $54,8 \pm 10,4\%$ během období inhalace ($p = \text{NS}$) (Obr. 1D). Ve skupině C zvýšená průchodnost arterií pozorovaná během inhalačního období NO přetrvávala během 45-ti minutového období po inhalaci ($70,1 \pm 7,1\%$ proti základním hodnotám, $p < 0,05$).

Když byly výsledky průchodnosti arterií z inhalačního období ze skupin B, C a D sloučeny, zjistil se statisticky významný rozdíl mezi sloučenými léčenými skupinami a skupinou kontrolní ($p < 0,005$). Když byly výsledky průchodnosti arterií ze 45-ti minutového období po inhalaci ze skupin B, C a D sloučeny, také se zjistil statisticky významný rozdíl mezi sloučenými léčenými skupinami a skupinou kontrolní ($p < 0,005$).

Během nebo po podávání NO se v žádné skupině zvířat

nezměnil počet trombocytů ani krevní hemoglobin (tabulka 3). U psů, kteří dýchali 200 ppm inhalovaného NO, se hladiny methemoglobinu zvýšily z $0,2 \pm 0,1\%$ na $1,1 \pm 0,4\%$ (tabulka 3). Toto zvýšení přetrvávalo i poté, co bylo podávání NO zastaveno, a nebylo pozorováno u psů, kteří dostávali nižší dávky NO.

Systémový arteriální tlak se u všech skupin psů během této studie snížil a nelišil se mezi psy, kteří dostávali NO a těmi, kteří NO nedostávali (tabulka 2A). Během trvání studie byl tlak v levé předsíni ve všech skupinách zvířat nezměněn (tabulka 2B).

Tabulka 2A

Průměrný systémový arteriální tlak (SAP) (mmHg) před, během a po inhalaci NO

Léčba NO	Před	Během	Po
0 ppm NO (N=6) Skupina A	89±8	82±6	80±7
20 ppm NO (N=6) Skupina B	105±6	96±6	82±6
80 ppm NO (N=6) Skupina C	91±5	81±9	78±7
200 ppm NO (N=6) Skupina D	94±3	95±4	93±4

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry $\pm$ SEM.

Tabulka 2B

Průměrný tlak v levé předsíni (LAP) (mmHg) před, během a po inhalaci NO

Léčba NO	Před	Během	Po
0 ppm NO (N=6) Skupina A	5,5±0,6	5,4±0,7	5,4±0,7
20 ppm NO (N=6) Skupina B	5,2±1,6	4,7±1,4	4,6±1,1
80 ppm NO (N=6) Skupina C	5,3±0,6	5,2±0,6	4,9±0,6
200 ppm NO (N=6) Skupina D	4,6±1,1	4,2±0,9	3,7±0,8

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SEM.

Účinky NO na agregaci destiček in vitro indukovanou ADP

Přídavek 20, 80, 200 a 400 ppm NO k plynové směsi nad PRP vedlo ke snížení (v závislosti na dávce) maximální změny v propustnosti světla způsobeném ADP (obr. 3). Ve snížení propustnosti světla indukovaném ADP u dvou kontrolních agregčních křivek provedených na začátku a na konci každé studie nebyla žádná změna (30,57±5,57% proti 31,1±4,31%).

Tabulka 3

Hematologické hodnoty před, během a po inhalaci NO

Léčba NO	Měření	Před	Během	Po
0 ppm NO Skupina A (n=6)	Hb (mg/dl)	13,2±1,3	13,7±0,8	12,2±0,7
	Počet tromb. (x10 ³ /mm ³)	301±55	284±53	276±35
	MetHb (%)	0,22±0,2	0,2±0,1	0,2±0,2
20 ppm NO Skupina B (n=6)	Hb (mg/dl)	14,3±0,85	12,7±0,7	2±1
	Počet tromb. (x10 ³ /mm ³)	292±25	269±22	253±16
	MetHb (%)	0,1±0,1	0,4±0,2	0,1±0,02
80 ppm NO Skupina C (n=6)	Hb (mg/dl)	14,0±0,8	11,9±0,3	11,1±0,6
	Počet tromb. (x10 ³ /mm ³)	277±35	238±32	209±37
	MetHb (%)	0,2±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1

Výše uvedené výsledky prokazují, že inhalovaný NO zvyšuje průchodnost koronárních arterií po lýze trombu v místě kritické stenózy bez vytvoření jakéhokoli systémového hemodynamického účinku. Ukazují také, že antitrombotické účinky inhalovaného NO přetrvávají nejméně 45 minut po ukončení inhalace NO. Při koncentracích NO podobným koncentracím získaným in vivo, plyný NO výrazně inhiboval agregaci trombocytů indukovanou ADP in vitro.

Pokusy týkající se hyperplazie intimy

Při restenóze arterií u lidí je hlavní patologický proces hyperplazie buněk hladkých svalů v intimě (neointimální hyperplazie). Proto, aby se objasnil účinek inhalovaného NO na proces restenózy po vaskulárním intervenčním postupu jako je PTCA, byl studován účinek inhalovaného NO na hyperplazii intimy, za použití modelu arteriálního poranění karotidy krys (Cloves a kol.,

Laboratory Invest. 49: 327 (1983), což je standardní zvířecí model pro studium hyperplazie buněk hladkých svalů u lidí.

Arteriální poranění

Dospělí samci krys Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) prodělali poranění společné karotidy balonkem způsobem, u kterého bylo již dříve ukázáno, že je schopný vyvolat neointimální hyperplazii (Clowes a kol., výše). Krysám vážícím 300 až 350g byla podána anestézie intraperitoneální injekcí ketaminu (60-80 mg/kg) a acepromazinu (0,1 mg/kg). Jakmile bylo dosaženo uspokojivé anestézie, byl proveden podélný řez ve střední čáře a tupou disekcí byla izolována levá karotida. Po další opatrné disekci bifurkace interní a externí karotidy byl podvázán distální segment externí karotidy švem ze 4-0 hedvábí. V externí karotidě byla provedena malá arteriotomie za použití mikrodisekčních nůžek a otvorem byl vložen francouzský Fogartyho balonkový katetr č. 2 (Baxter Edwards LIS) a byl posunut vpřed přibližně dva centimetry pod bifurkaci karotid. Balonek byl naplněn fyziologickým roztokem tak, aby se způsobila viditelná distenze společné karotidy, a jemně vytažen zpět na úroveň bifurkace. Balonkový katetr byl poté vytažen a po krátkém krvácení arteriotomií, aby se vyloučil možný trombus a vzduchové bubliny, byla externí karotida podvázána proximálně od místa arteriotomie za použití hedvábného šití 4-0. Po vizuálním ohledání adekvátní pulzace společné karotidy byla chirurgická léze uzavřena a zvířata se nechala zotavit z anestézie.

Chronická inhalace NO

Chronická inhalace NO se prováděla ve speciálně připravených akrylových inhalačních komorách s objemem 40 l. Plynné směsi se míchaly za použití samostatně regulovaných a kalibrovaných měřičů průtoku pro kyslík, stlačený vzduch a zásobní plyny NO (800 ppm a 10 000 ppm NO v N₂, Airco, Murray Hill, NJ). Aby se zajistily stabilní hladiny FiO₂ a NO, byl plyn vycházející z komory během experimentálního období periodicky analyzován. FiO₂ byla měřena polarografickou elektrodou (Hudson Oxygen Meter 5590, Temecula, CA), koncentrace NO se měřila chemiluminiscencí (Model 14A, Thermo Environmental Instruments, Inc., Franklin, MA) a oxid dusičitý a dusík s vyšším stupněm oxidace (NO_x) byly měřeny chemoluminiscencí následující přeměnu NO_x na NO v zahřívané peci z nerezavějící oceli (850 °C) s účinností 98% (Model 100B NO_x generator, Thermo Environmental Instruments, Inc., Franklin, MA). V komorách bylo udržováno čerstvé natronové vápno, aby redukovalo NO_x. Koncentrace NO se udržovala na 20 až 80 ppm, v závislosti na pokuse. Pravidelná měření ukázala, že FiO₂ je 21% a NO_x 3 až 4 ppm. Plyny odcházející z expozičních komor, stejně jako plyny vypouštěné z chemiluminiscenčního přístroje, byly odsávány za použití difuzérového jímače udržovaného v negativním atmosférickém tlaku laboratorním centrálním vakuovým systémem.

Kontrolní zvířata byla chována ve filtrovaných klecích ve stejné místnosti jako zvířata ošetřovaná NO. Expozice NO začínala 30 až 120 minut před chirurgickým výkonem. Během

chirurgického výkonu byla skupina léčená NO vyňata z komory a exponována NO za použití modifikované obličejové masky plněné přítokovými trubicemi z komor. Analýza inhalovaného plynu prokázala hladiny NO 50 až 80 ppm během pokusů s 80 ppm a 10 až 20 ppm během chirurgických pokusů s 20 ppm. Celková doba, po kterou bylo zvíře venku z komory a pod obličejovou maskou, kolísala od 20 do 40 minut.

Morfometrická analýza

Za 1, 3 a 14 dnů po balonkovém poranění byly krysy usmrčeny letální intraperitoneální injekcí pentobarbitalu sodného nebo ketaminu. Do vzestupné aorty byl zaveden katetr o kalibru 16 cestou levého ventrikulárního apexu. Hrudní sestupná aorta byla podvázána. Zvíře bylo poté perfundováno za tlaku 100 mm Hg 100 ml normálního fyziologického roztoku, poté následovala perfuze 50 ml 2% paraformaldehydu ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem (PBS). Po fixaci in vivo 15 až 30 minut byly izolovány obě společné karotidy a prodělaly další fixaci přes noc ponořením do 1% paraformaldehydu v PBS. Tkáň byla dehydratována v postupně se zvyšujících koncentracích etanolu následovaného xylenem, a poté zalita do parafinu. Byly řezány příčné řezy (6 μ m) a barveny hematoxylinem a eosinem a/nebo elastinem pro analýzu. U každého zvířete byl k analýze použit jeden řez 7 až 8 mm proximálně od bifurkace karotid. Analyzovaný řez se fotografoval ve 100x zvětšení. Obrázek byl digitalizován za použití snímače Kodak 2135TM. Analýzy oblastí intimy a média se prováděly na počítači Power Macintosh 8100/80TM veřejně přístupným programem NIH Image (vytvořeného Waynem Rasbandem

v U.S. National Institutes Of Health a dostupného na Internetu anonymním ftp od zippy.nimh.nih.gov nebo na floppy disku od NTIS, 5285 Port Royal Rd., Springfield, VA 22161, číslo PB93-504868). Morfometrická analýza byla provedena badatelem, který nevěděl, která skupina je experimentální.

Statistická analýza

Statistická analýza se prováděla komerčně dostupným software Statview™ (Abacus Concepts) pro počítače Macintosh™. Experimentální skupina byla srovnávána s kontrolní skupinou nepárovým oboustranným t-testem. Za statisticky významnou se považovala hodnota $P < 0,05$. Všechna data jsou uvedena jako průměr $\pm$ SEM. Hodnota n se týká počtu zvířat ve skupině.

Výsledky restenózy na modelu hlodavců

Celkem 62 krys prodělalo výkon poranění karotid. Pět krys zemřelo v důsledku cévních komplikací během arteriotomie nebo balonkového poranění, což dává míru úmrtnosti při výkonu 8%. Nebylo nalezeno statisticky významné nerovnoměrné rozložení úmrtí mezi rozdílnými experimentálními skupinami. Nebyla žádná úmrtí po výkonu mezi 57 krysami, které přežily úvodní proceduru. Všechny krysy, bez ohledu na experimentální skupinu, projevovaly normální umývací pohyby a normální úroveň aktivity v průběhu studie. Kromě příležitostné ptózy na straně poranění karotidy neprojevovala žádná krysa velký neurologický deficit. Analýza menšího souboru z experimentálních skupin prokázala během expozice vzduchu, NO při 20 ppm a NO při 80 ppm přírůstek na váze bez statistického rozdílu.

V prvních sériích pokusů krysy, které prodělávaly balonkové poranění karotidy, byly vystaveny buď okolnímu vzduchu ($n=12$) nebo 80 ppm NO ($n=13$) ve vzduchu, během trvání studie. Zvířata byla usmrcena 14 dní po poranění pro morfometrickou analýzu poraněné karotidy. Vyšetření světelným mikroskopem odhalilo, že tři krysy ze skupiny dýchající vzduch (kontrolní) a jedna krysa ze skupiny vystavené NO měly trombotický uzávěr průsvitu poraněné karotidy. Tato zvířata byla vyloučena z další analýzy. Jak se očekávalo, krevní cévy obou skupin projevovaly ztrátu endotelu a vývoj neointimální hyperplazie. Vyšetření světelným mikroskopem neprokázalo kvalitativní rozdíl v buněčné morfologii neointimy (data neukázána). Avšak kvantitativní analýza prokázala, že léčba 80 ppm inhalovaného NO měla za následek 38% inhibici neointimální hyperplazie, tj. poměr intima/médie u zvířat z 80 ppm byl $0,932 \pm 0,13$, ve srovnání s $1,512 \pm 0,147$ u zvířat z 0 ppm NO (kontrolních) ($P=0,008$) (obr. 4).

V další sérii pokusů byl testován účinek expozice NO po dobu jednoho týdne. Experimentální skupina ($n=7$) byla vystavena 80 ppm NO po dobu 7 dnů, a poté přenesena na vzduch po dalších sedm dnů před usmrcením. Kontrolní skupina ($n=5$) byla vystavena vzduchu po celé období 14 dnů. Mezi skupinami nebyl kvalitativní morfologický rozdíl. Navíc kvantitativní analýza poměru intima/médie (obr. 4) neprokázala statisticky významný rozdíl v neointimální hyperplazii mezi skupinami, tj. $1,059 \pm 0,239$ u zvířat vystavených NO, ve srovnání s $1,217 \pm 0,309$ u kontrol ($P =$

nevýznamná).

Ve třetí sérii pokusů byla studována nízká dávka inhalovaného NO: krysy dýchaly buď 20 ppm NO (n=8) nebo vzduch (n=8). Opět nebyl nalezen žádný kvantitativní nebo kvalitativní rozdíl ve stupni neointimální hyperplazie mezi 2 skupinami, tj. poměr intima/médie byl $0,917 \pm 0,233$ pro zvířata vystavená 20 ppm NO, ve srovnání s $0,985 \pm 0,149$ pro kontroly dýchající vzduch (P = nevýznamná) (obr. 4).

Výše uvedené výsledky dokazují, že inhalace 80 ppm NO po dobu dvou týdnů významně inhibuje neointimální hyperplazii následující po poranění karotid vyvolaném balonkem v modelu hlodavců.

Další ztělesnění vynálezu jsou v následujících patentových nárocích.

Průmyslová využitelnost

Předkládaný vynález se týká použití plynného oxidu dusnatého pro přípravu léčiva pro léčbu, inhibici nebo prevenci vaskulární trombózy a arteriální restenózy, která plyne z nadměrné hyperplazie intimy. Trombóza nebo arteriální restenóza se ovlivňuje inhalací terapeuticky účinného množství oxidu dusnatého. Oxid dusnatého je možno kombinovat s další sloučeninou, která doplňuje nebo zvyšuje jeho léčebný účinek.

P A T E N T O V É N Á R O K Y:

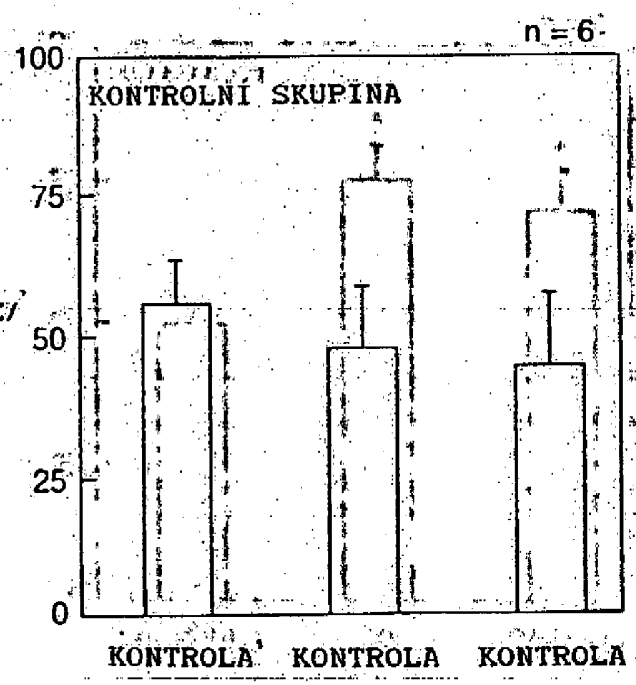
1. Použití plynného oxidu dusnatého pro přípravu léčiva pro léčení nebo prevenci vaskulární trombózy a arteriální restenózy vyplývající z nadměrné hyperplazie intimy u savce.
2. Použití plynného oxidu dusnatého podle nároku 1 v kombinaci s druhou sloučeninou, která potencuje léčebný účinek plynného oxidu dusnatého.
3. Použití podle nároku 2, kde druhá sloučenina je vybrána ze skupiny obsahující inhibitor fosfodiesterázy a superoxid dismutázu.
4. Použití podle nároku 3, kde inhibitor fosfodiesterázy je vybrán ze skupiny obsahující 2-o-propyloxyfenyl-8-azapurin-6-on, dipyridamol a teofylin.
5. Použití podle nároku 1 až 4, kde savec je člověk.
6. Použití podle nároku 1 nebo 4, kde savec prodělal nebo se připravuje podstoupit vaskulární intervenční výkon.
7. Použití podle nároku 6, kde vaskulární intervenční výkon je vybrán ze skupiny skládající se z angioplastiky, chirurgického výkonu na koronárních arteriích a stentů koronární arterie.

8. Použití podle nároku 7, kde výkon je perkutánní transluminální koronární angioplastika .

C. 100
 100 100 100 100 100
 100 100 100 100 100
 100 100 100 100 100
 100 100 100 100 100

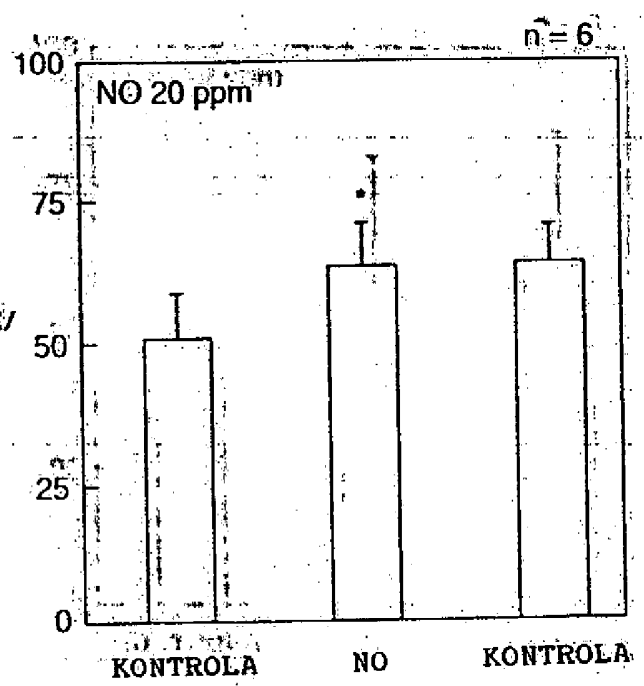
OTEVŘENÁ ARTERIE/
 CELKOVÁ DOBA (%)

FIG. 1A



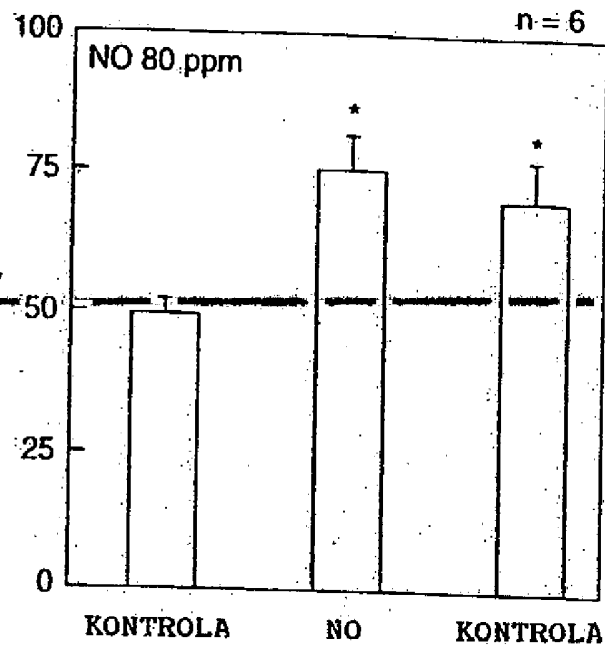
OTEVŘENÁ ARTERIE/
 CELKOVÁ DOBA (%)

FIG. 1B



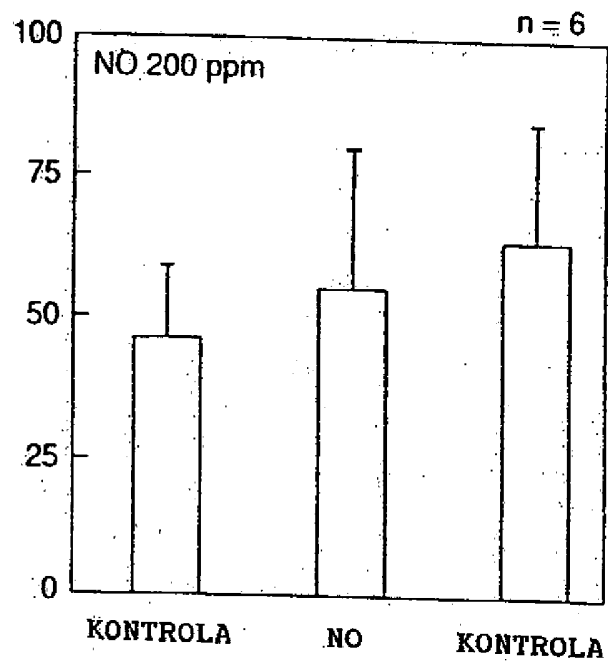
OTEVŘENÁ ARTERIE/
CELKOVÁ DOBA (%)

FIG. 1C



OTEVŘENÁ ARTERIE/
CELKOVÁ DOBA (%)

FIG. 1D



12.12.97

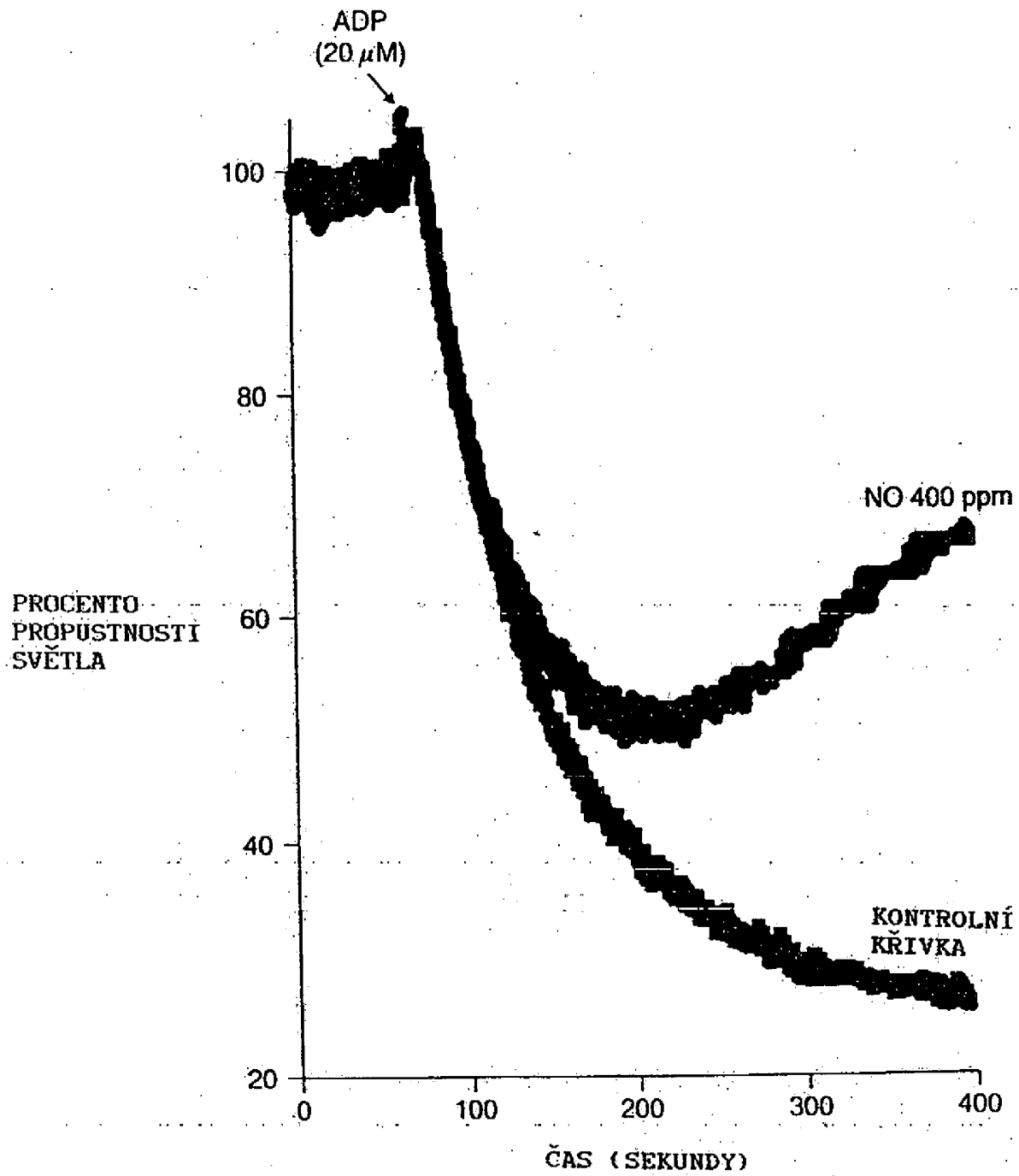


FIG. 2

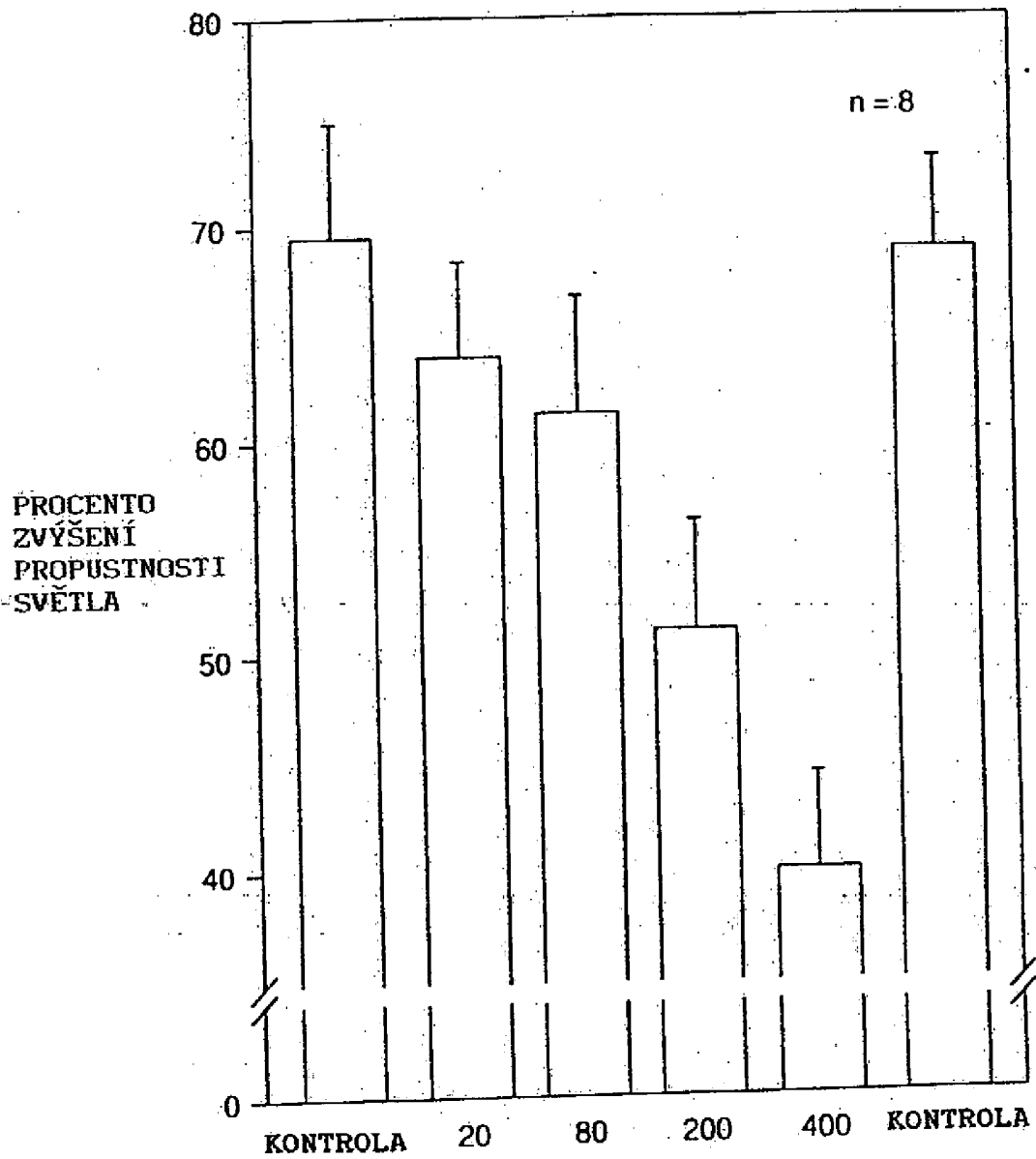


FIG. 3

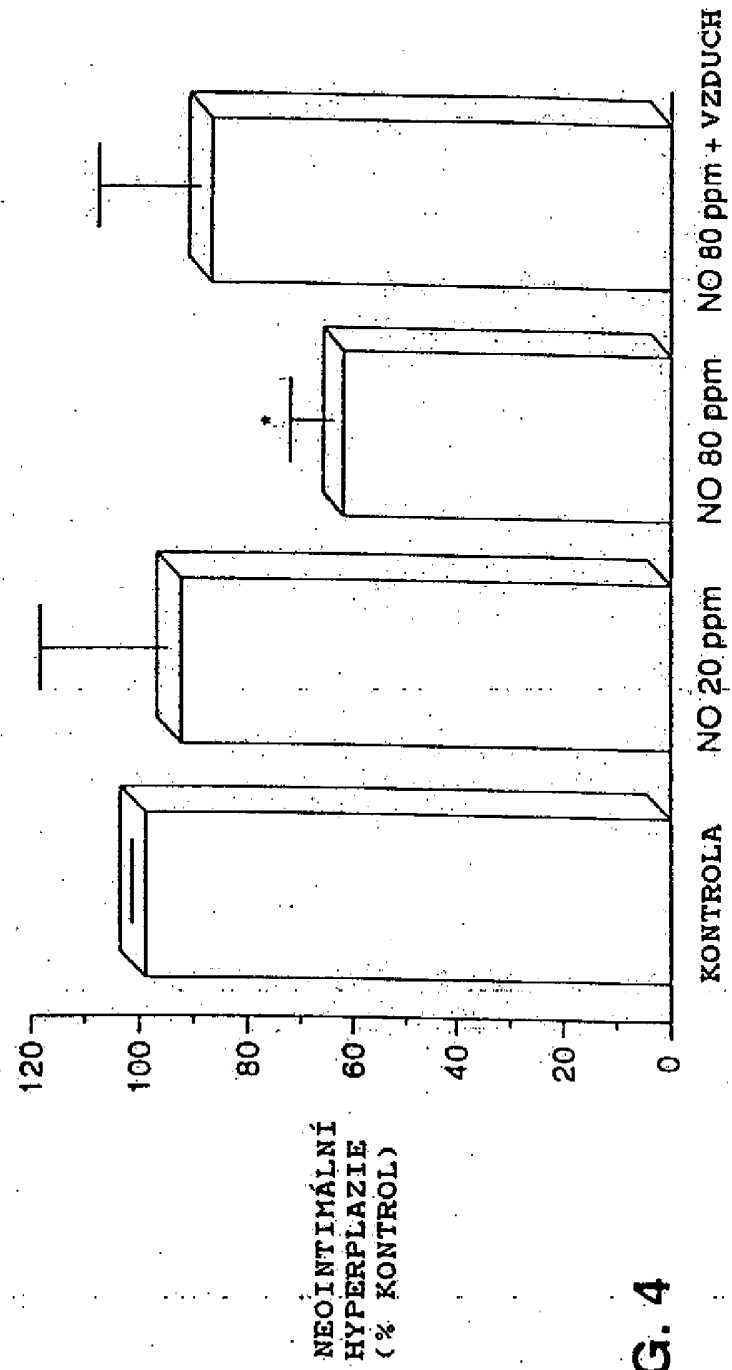


FIG. 4