



(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

80960

C (11) Patentansökningsbeskrivning
I 1118 111818 10 00 1000

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

G 01N 33/96

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	854328
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	04.11.85
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag	04.11.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	06.05.86
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.04.90

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

05.11.84 US 667947 P

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(71) Hakija - Sökande

1. Akzo N.V., Velperweg 76, Arnhem, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Jacobson, Walter, 276 Summit Drive, Denville, N.J., USA, (US)
2. Riggio, Stephen C., Rd 2 Box 338, Milford, N.J., USA, (US)
3. Turner, James E., 27 Puddingstone Drive, Boonton, N.J., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä stabiloida nisäkkään erytrosyyttejä käytettäväksi verikaasu-hemoglobiini-analyysissä vertailuaineena sekä verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäytetuote
Förfarande för stabilisering av däggdjurserythrocyter för användning som kontroll vid blodgas-hemoglobin-analys och kontrollprodukt för blodgas-hemoglobin-analys

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 2850627 (G 01 N 33/16)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on verikaasu (veren pH, PCO₂ ja PO₂) -hemoglobiini-analyysin vertailunäytteenä käyttökelpoinen tuote, joka simuloi ihmisen kokoverta. Tuote koostuu puskuroidusta suspensioväliaineesta, joka sisältää erytrosyyttejä, jotka on stabiloitu proteiineja silloittavalla imidoesterillä, samalla kun ne on saatettu kosketukseen puhdasta happea tai puhdasta hiilimonoksidia sisältävän kaasun kanssa.

Keksintö koskee myös menetelmää erytrosyyttien stabiloimiseksi käytettäväksi verikaasu-hemoglobiini-analyysissä vertailuaineena, sekä vertailunäytepakkausta, joka sisältää edellä mainittua tuotetta.

Uppfinningen avser en blodgas (blodets pH, PCO₂ och PO₂)-hemoglobin-analyskontrollprodukt, vilken simulerar människans helblod. Produkten består av ett buffrat suspensionsmedium, vilket innehåller erythrocyter som stabiliserats med ett imidoesterproteinförnätningsmedel medan de kontaktats med en gas, vilken består av rent syre eller ren kolmonoxid.

Uppfinningen avser även ett förfarande för stabilisering av erythrocyter så att de kan användas som blodgas-hemoglobinanalyskontrollmedel, samt en kontrollförpackning, vilken innehåller den ovannämnda produkten.

Menetelmä stabiloida nisäkkään erytrosyyttejä käytettäväksi verikaasu-hemoglobiini-analyysissä vertailuaineena sekä verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäytetuote

5 Keksintö koskee menetelmää stabiloida nisäkkään erytrosyyttejä käytettäväksi verikaasu-hemoglobiini-analyysissä vertailuaineena sekä verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäytetuotetta ja pakkausta.

10 Verikaasuanalyyseja tehdään useimmissa sairaalalaboratorioissa tarkoituksena diagnosoida ja hoitaa epänormaaleja keuhkojen toimintaa ja happo/emäs-tasapainoja. Mittattavat kolme parametria ovat veren pH, CO₂:n osapaine (P_{co₂}) ja hapen osapaine (P_{o₂}). Lisäksi voidaan tehdä myös hemoglobiinitestejä. Nämä testit käsittävät kokonaisdeoksihemoglobiinin, oksihemoglobiinin, karboksihemoglobiinin ja methemoglobiinin määrittäminen.

15 Tehtäessä pH-, P_{o₂}- ja P_{co₂}-analyysejä potilaasta otetaan verinäyte ja se johdetaan erikoislaitteeseen, jossa on mitattaville parametreille spesifiset elektrodit. Koska veri pilaantuu nopeasti ja koska liuenneilla kaasuuilla on taipumusta tulla ulos liuoksesta, näyte pitää analysoida välittömästi tai muutaman tunnin kuluessa, jos veri on ollut jäädytettynä jäällä.

20 On tietysti itsestään selvää, että analyysitulokset eivät voi olla parempia kuin käytetty laitteisto. Niinpä on välttämätöntä valvoa laitteen oikeaa kalibrointia ja toimintaa. Vaikka ulkopuolista kaasulähdettä voidaan käyttää standardoimaan veren kaasun mittauslaitetta, testeissä käytettävät elektrodit ovat herkkiä analyysiväliaineelle. Kun esimerkiksi käytetään happea kaasumaisessa tilassa standardina, saadaan mittarin lukema, joka on erilainen kuin se, mikä saataisiin käytettäessä standardina nestettä, joka sisältää liuennutta happea. Tämä nesteen ja kaasun ero johtuu eroista hapen diffuusionopeuksissa läpi kaasumaisen tai nestemäisen väliaineen, johon se on yhdistetty.

Kun on pyritty lievittämään matemaattisten korjauksen tarvetta tämän nesteen ja kaasun eron kompensoimiseksi on havaittu, että nestemäinen vertailuaine on suositeltavampi kuin kaasumainen vertailuaine. Edullisin neste olisi tietysti veri, koska se sisältää kaikki ainekset, joille analyysilaitteisto joutuu alttiiksi. Veri kuitenkin pilaantuu nopeasti ja menettää liuenneet kaasut. Lisäksi solujen metabolian seurauksena P_{CO_2} kasvaa kun taas P_{O_2} ja pH laskevat. Koska ei ole mitään tunnettua menetelmää es-
tää näitä muutoksia, jotka tapahtuvat säilytettäessä kokoverta, se on hylätty vertailuaineena.

Ensimmäiset nestemäiset veren kaasujen vertailunäytteet olivat puskuroituja vesiliuoksia, jotka sisälsivät liuenneita kaasuja. Vaikka näillä liuoksilla vältettiin nesteiden ja kaasujen eron aiheuttamat ongelmat, niistä puuttui muita veren komponentteja, jotka vaikuttavat analyysilaitteiston herkkiin elektrodikomponentteihin.

Ensimmäisenä askeleena ratkaistaessa tätä ongelmaa valmistettiin vertailunäytteitä, jotka sisälsivät liukoista hemoglobiinia. Näistä vertailunäytteistä kuitenkin puuttui methemoglobiinin reduktasientsyymi, joka verisoluissa pelkistää raudan Fe^{2+} -muotoon. Kun hemoglobiinin rauta on aina Fe^{3+} -muodossa siitä seuraa, että hemoglobiini on methemoglobiinia. Niinpä näitä vertailunäytteitä voidaan käyttää vain kokonaishemoglobiinin analyysiin. Nyttemmin on kehitetty vertailunäytteitä, jotka läheisemmin muistuttavat kokoverta.

US-patenttijulkaisussa 3 859 049 kuvataan menetelmää stabiloida kokoverta ja kokoveren komponentteja käyttäen fluorideja, sitraatteja, fluorietikkahappoa ja jodietikkahappoa. Tyypillisesti lisätään kokovereen natriumfluoridia, natriumsitraattia ja fluorietikka- tai jodietikkahappoa. Seos jäädytetään ja sen annetaan seistä riittävän pitkään, jotta P_{CO_2} -, P_{O_2} - ja pH-tasot stabiloituvat. Valitettavasti tuotteella on lyhyt elinikä, noin yksi

kuukausi. Tuotteita, joilla on pitempi elinikä, on valmistettu käsittelemällä veren komponentteja aldehydillä.

5 US-patenttijulkaisussa 3 973 913 kuvataan menetelmä stabiloida punaisia verisoluja erottamalla ne kokoverestä ja stabiloimalla ne käsittelemällä aldehydillä, esim. formaldehydillä tai glutaraldehydillä. Nämä stabiloidut solut lisätään puskuroituun liuokseen, joka sisältää glukosia, neomysiiniä ja kloramfenikolia bakterisideina, ja suolaa aikaansaamaan isotoninen liuos, jolla on sama osmolaalisuus kuin verellä. Tämän tuotteen elinikä on kuitenkin 10 vain kaksi kuukautta, ja solut menettävät nopeasti hemoglobiinin, joka hapettuu methemoglobiiniksi.

Se mitä tarvitaan on parempi stabilointitekniikka, jolla saadaan pysyvämpiä verikaasu- ja hemoglobiinianalyysiin 15 tarkoitettuja vertailunäytteitä, jotka simuloivat kokoverta.

Tässä julkaisussa käytetyllä termillä "hemoglobiinanalyysi" tarkoitetaan sellaisia hemoglobiinitestejä, jotka mittaavat kokonaihemoglobiinin ja oksihemoglobiinin, 20 karboksihemoglobiinin ja methemoglobiinin prosenttiosuuden. Muut parametrit kuten tilavuus-% O₂ ja CO₂ voidaan laskea havaituista arvoista.

Dimetyyliadipimidaattia on esitetty ristisilloittavana aineena erytrosyyttimembraaneissa; katso Niehaus, 25 W.G., et al. "Cross-Linking of Erythrocyte Membranes With Dimethyl Adipimidate", Biochem. Biophys. Acta 196: 170-175 (1970).

Muissa tutkimuksissa dimetyyliadipimidaattia (DMA) on kuvattu sirppiytymisen estoaineena punaisille verisoluille; katso "Dimethyl Adipimidate: A New Antisickling 30 Agent", Lubin, B.H., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, (1): 43-46, (1975) ja "Antisickling Nature of Dimethyl Adipimidate", Waterman, M.R. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm., 63 (3): 580-587 (1975).

35 Äskettäin DMA:n ristisilloittavien vaikutusten on

osoitettu inhiboivan entsyymiaktiivisuutta; katso "The Effects of Crosslinking Reagents on Red-Cell Shape", Mentzer, W.C. ja Lubin, B.H., Seminars in Hematology 16: 115-127 (1979). Lisäksi DMA:n on osoitettu vaikuttavan ioniretentioon erytrosyyteissä, Krinsky, N.I., et al.

"Retention of K⁺ Gradients in Imidoester Crosslinked Erythrocyte Membranes" Arch. Biochem. Biophys., 160: 350-352 (1974).

DMA:n käyttöä erytrosyyttimembraanien ristisilloittamiseen verikaasujen vertailunäytteissä ei ole kuvattu aikaisemmin.

On yllättäen havaittu, että verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäyte voidaan valmistaa stabiloimalla punaisia verisoluja dimetyyliadipimidaatilla (DMA) ja suspendoimalla stabiloidut solut puskurointiväliaineeseen, joka sisältää proteiinia, joka simuloi plasman proteiinin vaikutusta verikaasun mittauksiin. Edullinen plasman proteiini on härän seerumin albumiini.

Käsittelemällä punaiset solut erikseen hapella tai hiilimonoksidilla DMA-ristisilloituksen aikana voidaan valmistaa vertailunäytteitä käytettäväksi hemoglobiinin määrityksissä. Puskuroitu punasolujen suspensio pakataan ampulleihin ja varastoidaan jäädytettynä. Edullisia puskurointiaineita ovat N-(tris-hydroksimetyyli)metyyli-2-aminoetaanisulfonihappo (TES) tai N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N-2-etaanisulfonihappo (HEPES).

Tämä keksintö kohdistuu vertailunäytteeseen, jota voidaan käyttää sekä verikaasujen että hemoglobiinin määrityksissä. Keksinnön mukaiselle verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäytetuotteelle on tunnusomaista, että se sisältää:

- (a) puskuroidun suspensioväliaineen, joka koostuu puskurointiaineen vesiliuoksesta, kyseisen väliaineen pH:n ollessa välillä noin 6,8 - 8,0; ja
- (b) stabiloituja erytrosyyttejä, jotka on valmistettu pa-

tenttivaatimuksessa 1 esitetyn menetelmän mukaisesti, jolloin kyseisten erytrosyyttien määrä suspensioväliaineessa on sellainen, että suspensioväliaineen kokonaishemoglobiinin konsentraatio on noin 3-24 g/dl; kyseisen hemoglobiinin sisältäessä noin 60-100 % oksihemoglobiinia ja noin 0-35 % karboksihemoglobiinia. Käytännössä voidaan tässä keksinnössä käyttää mitä tahansa nisäkkäältä peräisin olevia erytrosyyttejä, edullisten erytrosyyttien ollessa ihmisen erytrosyyttejä.

Tämän keksinnön mukaista vertailunäytettä voidaan valmistaa erilaisina pitoisuuksina kunkin kokeellisesti mitattavan parametrin suhteen, näitä ovat pH, P_{O_2} , P_{CO_2} , kokonaishemoglobiinipitoisuus (THb), oksihemoglobiininprosenttiosuus (O_2Hb), karboksihemoglobiinin prosenttiosuus (COHb) ja methemoglobiinin prosenttiosuus (MetHb). Niinpä kukin näistä parametreista voidaan valita simuloimaan kliinistä asidoosia, normaalitilannetta ja laktoosia joko metabolisella tai respiratorisella perusteella. Parametrien vaihteluvälit, jonka sisällä vertailunäyte voidaan valmistaa, ovat:

25	<u>Parametri</u>	<u>Vaihteluväli</u>	<u>Edullinen vaihteluväli</u>	<u>Erittäin edullinen vaihteluväli</u>
	pH	6,6-8,0	6,8-7,8	7,0-7,7
	P_{O_2} mmHg	20-200	30-180	40-150
	P_{CO_2} mmHg	10-150	15-75	15-65
30	THb, g/dl	3-24	5-21	9-17
	% O_2Hb , %	0-100	50-100	60-98
	%COHb, %	0-100	0-50	0-35
	%MetHb, %	0-30	0-10	<3

Tyypillinen vaihteluväli parametrien konsentraatioissa on pH:lla noin 6,8-8,0; konaishemoglobiinilla noin 3-24 g/dl; oksihemoglobiinilla noin 60-100 %, karboksihe-

moglobiinilla noin 0-35 % ja methemoglobiinilla alle 3 %. Nämä vaihteluvälit on valittu, koska ne kuvaavat näiden parametrien fysiologisesti tavattuja vaihteluvälejä.

5 Erytrosyyttejä juuri otetusta verestä samoin kuin erytrosyyttejä seisseestä verestä, esim. verisoluja, joita on seisotettu aina 11 viikkoa, voidaan käyttää. Suurempi stabiilisuus voidaan saavuttaa käyttämällä seisotettuja soluja. Edullisesti verisoluja seisotetaan ainakin kuusi viikkoa, edullisimmin ainakin 10 viikkoa.

10 Valmistettaessa tämän keksinnön mukaista vertailunäytettä erytrosyytit stabilidaan reaktiolla DMA:n kanssa ja suspendoidaan puskurointiväliaineeseen. Neljä kriteeriä määrää sopivan puskurin valinnan käytettäväksi esillä olevassa keksinnössä:

- 15 1. Puskurilla täytyy olla riittävä puskurointikapasiteetti halutulla pH-välillä.
2. Puskurilla täytyy olla pH vastaan lämpötila-kerroin, joka riittävän hyvin simuloi tuoreen kokoveren vastaavaa kerrointa.
- 20 3. Puskuria täytyy voida käyttää konsentraationa, joka on riittävä takaamaan pH:n stabiilisuuden ja kuitenkin on riittävän herkkä havaitsemaan virhelähteet pH-mittaussysteemissä.
- 25 4. Puskuria ei saa vaikuttaa haitallisesti erytrosyytteihin.

Alan ammattimiehille on selvää, että suuri joukko puskureita täyttää nämä vaatimukset. Tässä julkaisussa käytetyllä termillä "puskurointiaine" tarkoitetaan pus-

30 kuriyhdistettä, joka täyttää edellä esitetyt vaatimukset. Havainnollistavina, ei rajoittavina esimerkkeinä puskureista, joita voidaan käyttää tässä keksinnössä, ovat N-(tris-hydroksimetyyli)metyyli-2-aminoetaanisulfonihappo (TES) ja N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N-2-etaanisulfonihappo (HEPES). Puskuria käytetään konsentraationa välillä

35 noin 0,01 - 0,10 M; edullisesti noin 0,025 - 0,09 M; edul-

lisemmin noin 0,035 - 0,08 M; edullisimmin noin 0,05 - 0,07 M.

pH-mittarin ja verikaasulaitteiston oikea toiminta vaatii lämpötilan, jossa mittaukset suoritetaan, tarkkaa säätöä. Koska tarkoituksena on simuloida kokoveren käyttäytymistä termostoidussa systeemissä, on toivottavaa, että vertailunäytteellä on sama pH vastaan lämpötila-kerroin kuin kokoverellä (-0,015 pH-yksikköä/°C). Niinpä tämän keksinnön mukaisen vertailunäytteen pH vastaan lämpötila-kerroin on edullisesti ainakin -0,015 pH-yksikköä/°C.

Vertailunäytteen, jossa käytetään HEPES:a puskurointiaineena konsentraationa noin 0,05 - 0,07 M, pH vastaan lämpötila-kerroin on -0,015 pH/°C.

Valmistettaessa tämän keksinnön mukaista vertailunäytettä stabiloidut erytrosyytit suspendoidaan nestemäiseen puskurointiväliaineeseen, joka voi olla puskurointiaineen deionisoituun veteen muodostettu liuos. Verikaasujen mittauksissa plasman proteiinit voivat kuitenkin vaikuttaa määrityksiin seurauksena siitä, että ne muodostavat päällysteen elektrodeille. Tätä vaikutusta voidaan simuloida lisäämällä puskuroituun nestemäiseen suspensioväliaineeseen proteiinia, joka ei (1) muodosta saostumaa, (2) muodosta fibriinihiyytymiä tai (3) aiheuta erytrosyyttien agglutinaatioita. Proteiinissa ei saa olla epäpuhtautena jäännösesensyymejä, jotka voisivat vaikuttaa vertailunäytteen stabiilisuuteen.

Ihmisen plasman proteiinikonsentraatio on noin 4,0 - 6,0 % (paino/tilavuus). Sopiva standardi voidaan valmistaa käyttäen proteiinikonsentraatiota noin 0,4 - 8,0 % (paino/tilavuus). Alle 0,4 %:n konsentraatiolla ei oleellista päällystysvaikutusta havaita, kun taas yli 8,0 %:n konsentraatio on suurempi kuin mitä voidaan tavallisesti odottaa ihmisen verinäytteen sisältävän. Proteiinikonsentraatio, jota käytetään valmistettaessa tämän keksinnön mukaisia vertailunäytteitä, on edullisesti noin 2-

7 % (paino/tilavuus); edullisemmin noin 3 - 6,5 % (paino/tilavuus); edullisimmin 4,0 - 6,0 % (paino/tilavuus). Mitä tahansa inerttiä veteen liukenevaa proteiinia voidaan käyttää proteiinin lähteenä tämän keksinnön mukaisissa vertailunäytteissä. Näiden proteiinien yhteydessä käytettynä termillä "inertti" tarkoitetaan sitä, että proteiinit eivät hajota erytrosyyttejä tai muuten aiheuta niiden huonontumista. Täten entsyymit eivät yleensä ole sopivia proteiinien lähteitä.

10 Vaikkakin nisäkkäiden seerumialbumiinit yleensä ovat sopivia proteiinin lähteitä tämän keksinnön mukaisiin vertailunäytteisiin, edullisimmat seerumialbumiinit ovat ihmisen seerumialbumiini ja härän seerumialbumiini. Härän seerumialbumiini on edullisin, koska sitä on helposti saatavissa puhdistetussa muodossa kohtuulliseen hintaan. Vaihtoehtoisesti voidaan myös gelatiinia käyttää proteiininä.

15 Alan ammattimiehille on ilmeistä, että mitä tahansa aikaisemmin tunnettua verikaasun vertailunäytettä voidaan parantaa ja tehdä enemmän kokoverta muistuttavaksi lisäämällä näihin nestemäisiin vertailunäytteisiin nisäkkään albumiinia edellä esitetyn mukaisesti.

20 Verikaasun vertailunäytteen täytyy sisältää sopivat O_2 - ja CO_2 -konsentraatiot, jotta analyysilaitteisto saadaan standardoitua näiden kaasujen suhteen. Halutut P_{O_2} - ja P_{CO_2} -pitoisuudet saavutetaan levittämällä kaasuseosta puskuroidulle nestemäiselle väliaineelle. Edullisesti kaasu levitetään tämän keksinnön mukaiselle vertailunäytteelle juuri ennen kuin nestemäinen suspensio suljetaan ampulleihin tai muihin sopiviin säiliöihin.

30 Riippuen liuoksen pH:sta ja lämpötilasta hiilidioksidi voi olla joko liuoksen kaasun muodossa tai muodostaa hydrattuja muotoja läsnä olevien bikarbonaatti- ja karbonaatti-anionien kanssa.

35 Koska kaasun kokonaispaine suljetussa vertailunäyt-

teessä pitää voida säilyttää tiettyjen käytännön rajojen sisällä, on välttämätöntä lisätä bikarbonaatti-ioneja, edullisesti natriumbikarbonaatin muodossa, jolloin varmistetaan riittävä P_{CO_2} -pitoisuus. Suljetut vertailunäytteet muodostavat suljetun systeemin saatavissa olevan CO_2 :n kokonaismäärän suhteen. Tästä syystä pH ja P_{CO_2} edustavat tasapainoa solususpension päälle levitettyssä kaasuseoksessa olevan CO_2 :n määrän, puskuroituun liuokseen lisättyjen bikarbonaatti- ja karbonaatti-ionien konsentraation ja eikarbonaatti-pohjaisten protonien ja hydroksyyli-ionien puskuroidun liuoksen pH:hon myötävaikutuksen välillä.

Tämän keksinnön mukaisen vertailunäytteen valmistuksessa käytettävä bikarbonaatti-ionien määrä vaihtelee välillä noin 0,005 - 0,2 M, jolloin varmistetaan, että P_{CO_2} on halutulla alueella. Edullisesti lisätyn bikarbonaatti-ionin konsentraatio vaihtelee välillä noin 0,01 - 0,12 M. Samaan aikaan CO_2 :n konsentraatio kaasuseoksessa on noin 2-15 til/til-%; edullisesti noin 5-10 til/til-%, jolloin saadaan ylläpidettyä sopiva P_{CO_2} suljetussa vertailunäytteessä.

P_{O_2} :een vaikuttaa hapen konsentraatio kaasuseoksessa, hapen-liukoisuus puskurointiliuokseen ja vapaata happea sitovan pelkistetyn hemoglobiinin saatavuus. Sopiva hapen konsentraatio valmistettaessa tämän keksinnön mukaista vertailunäytettä on noin 2-30 til/til-%; edullisesti noin 7-20 til/til-%. Niinpä sopiva lisättävän kaasuseoksen koostumus, esim. tämän keksinnön mukaisen vertailunäytteen puskuroidun liuoksen päällä olevassa vapaassa tilassa on noin 2-30 til/til-% happea ja noin 2-15 til/til-% hiilidioksidia, lopun ollessa typpeä tai muuta inerttiä kaasua.

Suspensiossa olevat stabiloimattomat erytrosyytit menettävät hemolyysin seurauksena hemoglobiinin nestemäiseen suspensioväliaineeseen. Koska tämä solusta vapaa hemoglobiini ei ole enää liittynenä methemoglobiinireduk-

taasientsyymiin, kuten se on solussa, se hapettuu nopeasti methemoglobiiniksi. Paitsi hemolyysiin liittyvää haitallista kosmeettista vaikutusta, hemoglobiinin hapettuminen methemoglobiiniksi aiheuttaa epästabiilisuutta hemoglobiiniparametreissa. Tämän ongelman voittamiseksi voidaan käyttää stabilisaattoreita.

Keksintö kohdistuu siten myös menetelmään stabiloida erytrosyyttejä käytettäväksi verikaasu-hemoglobiini-analyysissä vertailuaineena. Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että

(a) suspendoidaan kyseiset erytrosyytit puskuroituun kiinnitysväliaineeseen, joka koostuu puskurointiaineen vesiliuoksesta, väliaineen pH:n ollessa välillä noin 7,3 - 11,3;

(b) saatetaan erytrosyytit kosketuksiin kaasun kanssa, joka kaasu on happea tai hiilimonoksidia, imidoesterin läsnäollessa lämpötilassa välillä noin 20°C - 30°C reaktioajan ollessa noin 15-60 minuuttia; ja (c) otetaan talteen stabiloidut erytrosyytit.

Edullinen imidoesteri erytrosyyttien stabilointiin käytettäväksi tämän keksinnön yhteydessä on dimetyyliadi-pimidaatti (DMA). DMA:n hydrokloridit, esim. dimetyyliadi-pimidaatin dihydrokloridi, ovat myös käyttökelpoisia.

Reaktio-olosuhteet DMA:n ja amiinien väliseen reaktioon vesipitoisissa liuoksissa ovat hyvin tunnettuja. Alhaisessa pH:ssa DMA hydrolysoituu. Niinpä tarvitaan suuri ylimäärä DMA:a, jotta reaktioon aminoryhmien kanssa olisi riittävästi DMA:a. Lisäksi useimmat aminoryhmät protonoituvat alhaisessa pH:ssa. Tämä tekee ne vähemmän reaktiivisiksi kuin ei-protonoidut aminoryhmät.

Korkeassa pH:ssa hydrolyysi estyy. Yleensä mitä korkeampi pH, sitä alhaisempi konsentraatio DMA:a tarvitaan imidoimaan proteiini, sitä nopeampi imidoointireaktio ja sitä vähemmän DMA:n sivureaktioita, esim. hydrolyysiä.

Kuitenkin, mitä korkeampi on reaktion pH, sitä suu-

rempi on todennäköisyys, että erytrosyytit vahingoittuvat. Täten täytyy löytää tasapaino sen välillä, että käytetään korkeaa pH-tasoa edullisten reaktio-olosuhteiden takia ja että lasketaan pH-tasoa erytrosyyttien vahingoittumisen estämiseksi.

Erytrosyyttien imidointiaste riippuu pH:sta, reaktioajasta ja lämpötilasta. Ellei imidoinnin anneta edetä riittävän pitkälle, erytrosyytit eivät stabiloidu ja menettävät hemoglobiinin hemolyysin seurauksena. Toisaalta jos imidointia jatketaan liian kauan, erytrosyytit kovettuvat liikaa. Hemoglobiinitestejä tehtäessä solulyysin täytyy tapahtua analyysilaitteessa. Niinpä imidointia täytyy säädellä, jotta vältettäisiin sekä hemolyysille alttiiden heikkojen solujen tuotanto että kovettuneet solut, joissa lyysiä ei enää voi tapahtua.

Tätä imidointitasapainoa säädellään asettamalla imidointireaktion olosuhteet seuraavasti:

1. DMA-konsentraatio pidetään välillä noin 0,77 - 8,00 g/l, edullisesti välillä noin 0,85 - 4,0 g/l, esim. 0,9 g/l:ssa.

2. Imidointiliuoksen pH pidetään välillä noin 7,3 - 11,3, edullisesti välillä 8-10, erittäin edullisesti välillä noin 8,5 - 10, edullisimmin välillä noin 8,5 - 9,5, esim. 9,2:ssa. pH-säätö suoritetaan parhaiten käyttämällä epäorgaanista emästä kuten natriumbikarbonaattia tai natriumkarbonaattia. Amiinipuskureita täytyy välttää, koska ne reagoivat DMA:n kanssa.

3. Reaktioaika voi vaihdella välillä 15-60 minuuttia, edullisesti välillä 18-40 minuuttia, erittäin edullisesti välillä 20-30 minuuttia, esim. 25 minuuttia.

4. Imidointireaktio suoritetaan lämpötilassa, joka vaihtelee välillä noin 20-30°C, edullisesti välillä noin 22-28°C, erittäin edullisesti välillä noin 24-26°C, esim. 25°C.

Edellä esitetyissä olosuhteissa erytrosyyttien lu-

kumäärä, joka voidaan tehokkaasti käsitellä, vaihtelee välillä noin 1×10^4 - 1×10^7 per μl . Niinpä erytrosyyttien määränä käytetään noin 1×10^4 - 1×10^7 per μl , ja edullisesti noin $5,8 \times 10^5$ - $6,2 \times 10^5$ per μl .

- 5 Tämän keksinnön mukainen menetelmä erytrosyyttien stabiloimiseksi voidaan yhteenvetona esittää seuraavasti:
1. Erytrosyytit, jotka on saatu vanhenneesta ihmisen verestä, pestään fysiologisella suolaliuksella, sentrifugoidaan ja suspendoidaan uudelleen kiinnittävään puskuriin, joka on 0,1 M natriumkarbonaatin ja natriumbikarbonaatin liuos, joka sisältää natriumkloridia;
 - 10 2. Erytrosyyttien lukumäärä säädetään sopivaksi joko lisäämällä tai poistamalla kiinnittävää puskuria;
 3. DMA lisätään ja reaktion annetaan tapahtua samalla se-
 - 15 koittaen;
 4. Samalla kun reaktio on käynnissä, joko puhtaan hapen tai puhtaan hiilimonoksidin annetaan kuplia solususpension läpi. Tämän vaikutuksesta solunsisäiseen hemoglobiiniin kerääntyy sopivaa kaasua, jolloin sitä seuraava hemoglobiinin reaktio DMA:n kanssa kiinnittää hemoglobiinin hap-
 - 20 pea tai hiilimonoksidia kantavaan muotoon, täten "lukiten" kaasun hemoglobiiniin ja lisäten O_2Hb - ja COHb -parametrien stabiilisuutta;
 5. Stabiloidut solut sentrifugoidaan sitovien reagenssien poistamiseksi ja suspendoidaan uudelleen HEPES-bikarbonaatti-suolaliuos-puskuriin, jonka pH on 7,13, pH:n alen-
 - 25 tamiseksi;
 6. O_2Hb - ja COHb -tyyppiset solupopulaatiot yhdistetään tilavuuden perusteella, jolloin saadaan haluttu vertailuta-
 - 30 so;
 7. Yhdistetyt solut sentrifugoidaan HEPES-bikarbonaatti-suolaliuos-puskurin poistamiseksi;
 8. Sentrifugoidut solut suspendoidaan uudelleen lopulliseen puskuriliuokseen sellaisena tilavuutena, että haluttu
 - 35 THb saavutetaan fysiologisella alueella olevassa pH:ssa.

pH:n, P_{O_2} :n ja P_{CO_2} :n stabiilisuus riippuu siitä, es-
tetäänkö erytrosyyttejä hengittämästä. Tähän päämäärään
pääsemiseksi proteiiniin perustuvasta puskurista tehtiin
5 sellainen, ettei se sisältänyt oleellista määrää ravin-
teita, ja erytrosyytit valittiin siten, että ne olivat
niin vanhoja kuin mahdollista, jotta ne olisivat käyttä-
neet loppuun solunsisäiset ravinteet. Kuitenkin, kun solut
on näin kulutettu loppuun, ne eivät pysty tehokkaasti pel-
kistämään methemoglobiinia, jota muodostuu soluissa hemo-
10 globiinin spontaanin hapettumisen seurauksena, takaisin
hemoglobiiniksi.

Vaikka tätä keksintöä käytettäessä suurin osa hemo-
globiinista on stabiloitu oksi- tai karboksimuotoon sta-
biloituja erytrosyyttejä valmistettaessa, osa tästä hemo-
15 globiinista menettää kaasunsa ajan myötä huolimatta DMA-
käsittelystä, ja saatu hemoglobiini voi hapettua methemo-
globiiniksi. Tätä hapettumisprosessia voidaan ehkäistä
lisäämällä antioksidanteja, tai aineita, jotka itse hel-
posti hapettuvat, stabiloiden täten vertailunäytesysteem-
20 in.

Antioksidanttiyhdisteille, jotka ovat sopivia käy-
tettäväksi tämän keksinnön yhteydessä, on tyypillistä,
että ne hapettuvat spontaanisti hitaalla nopeudella, nii-
den hapetuspotentiaali on riittävän korkea, jotta ne hel-
25 posti pelkistävät biologisessa systeemissä, ja niillä on
hyväksyttävät hajuominaisuudet. Havainnollistavia, ei ra-
joittavia esimerkkejä tällaisista antioksidanteista ovat
ditioerytritoli (DTE) ja ditiotreitoli (DTT), DTE:n op-
tinen isomeeri. Antioksidanttia käytetään noin 0,001 -
30 0,006 M laskettuna koko suspensioväliaineen määrästä,
edullisesti noin 0,002 - 0,005 M, erittäin edullisesti
noin 0,003 - 0,005 M.

Jatkuva ongelma valmistettaessa vertailunäytteitä,
joilla on pitkä elinikä, on mikrobikontaminaatio. Neomy-
35 siinin ja kloramfenikolin yhdistelmä suojaa riittävästi

materiaalia bakteereja vastaan mutta ei sienten kasvua vastaan. Lisäämällä bakterisideihin dinatriumetyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA) saadaan sienten vastainen vaikutus.

5 Neomysiinisulfaattia käytetään noin 0,10-0,12 g/l, edullisesti noin 0,11 g/l, ja kloramfenikolia käytetään noin 0,10-0,72 g/l, edullisesti noin 0,15-0,66 g/l, erittäin edullisesti noin 0,3-0,4 g/l, esim. 0,33 g/l.

10 Tämän keksinnön mukaisena verikaasujen vertailunäytteenä käytettävän puskuroidun proteiiniliuoksen tyypilliset aineosien vaihteluvälit ovat:

<u>Aineosa</u>	<u>Määrä litraa kohti</u>
Härän seerumialbumiini	40-60 g
15 Hepes-puskuri	11,92-16,68 g
Natriumbikarbonaatti	0,84-10,08 g
Natriumkloridi	1,00-3,00 g
Ditioerytritoli	0,07-0,77 g
Neomysiinisulfaatti	0,10-0,12 g
20 Kloramfenikoli	0,32-0,34 g
Dinatriumetyleenidiamiini-tetraetikkahappo	0,37-3,72 g
Deionisoitu vesi	Q.S.

25 Vaikkakin on edullista käyttää seerumialbumiinia valmistuksessa, jotta vertailunäyte muistuttaisi kokoverta niin paljon kuin mahdollista, voidaan seerumialbumiini jättää pois, jos halutaan valmistaa halvempi vertailunäyte.

30 Jotta taattaisiin tämän keksinnön mukaisen verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäytteen hyvä varastointikestävyys, erytrosyyttien suspendoitinväliaineella on edullisesti oleellisesti sama osmolaalisuus kuin ihmisen kokoverellä, eli noin 280-350 mOsm/kg, edullisesti
35 320 mOsm/kg \pm 5 mOsm/kg. Liuoksen osmolaalisuutta säädel-

lään lisäämällä natriumkloridia vertailunäytteen puskurointiväliaineeseen.

5 Vaikka DMA edellä olevassa kuvauksessa on esitetty edullisena imidoesterinä on kuvauksen perusteella ilmeistä, että mitä tahansa sopivaa imidoesteriä voidaan käyttää proteiinia ristosilloittavana aineena, esim. dime-

10 tyylisuberimidaattia.
On tietysti välttämätöntä pakata vertailunäyte varastointia, kuljetusta ja käyttöä varten. Vaikka tässä kuvauksessa viitataan "ampulleihin", on alan ammattimiehelle kuvauksen perusteella ilmeistä, että mikä tahansa nestettä läpäisemätön materiaali, joka sulkee kaasun tiiviisti, kelpaa. Esimerkiksi lasipullo, jossa on kuminen septumi ja joka on suljettu ilmatiiviisti, on sopiva säiliö. Kumisen septumin täytyy olla suunniteltu siten, että se on helpos-
15 ti leikattavissa pois analyysitarkoituksiin. Tässä julkaisussa käytetyllä termillä "ampulli" on tavanomainen merkitys, mutta se pitää sisällään minkä tahansa vertailunäytteelle sopivan säiliön kuten edellä on kuvattu, esimerkiksi suljetut pullot, ohuet metallipussit jne.

20 Kun vertailunäyte pakataan ampulleihin, tulee jättää tyhjä tila kaasuseoksen lisäämiseksi, joka tuottaa edellä mainitut P_{O_2} - ja P_{CO_2} -parametrit. Vaikkakaan vapaan tyhjän tilan suhde nestemäisen suspension tilavuuteen ei
25 ole kriittinen, tyhjän tilan tilavuuden ja nesteen tilavuuden suhteita, jotka ovat yli 2, tulee välttää, koska pinta-ala ampullin sisällä tulee niin suureksi, ettei ole enää mahdollista sekoittaa ja käsitellä vertailunäytettä riittävän hyvin käytössä. Vastaavasti tämä suhde voi olla
30 nolla, jos solususpensio on esitasapainotettu kaasuseoksella ennen ampullin sulkemista. On kuitenkin edullista, että kaasun ja nesteen tilavuussuhde on ainakin 0,75. Täten edullisena suoritusmuotona ampulli täytetään siten nesteellä, että kaasun ja nesteen tilavuussuhde on noin
35 0,75 - 2; edullisemmin noin 0,9 - 1,5, esim. 1,0.

Sen jälkeen kun haluttu määrä solususpensiota on lisätty ampulliin, sopivan koostumuksen omaava happi/hiilimonoksidi/inertti kaasu-seos puhalletaan ampulliin korvaamaan ilma, joka jo täyttää tyhjän tilan. Kaasu tulee levittää nestesuspension päälle niin, että vältetään suspension vaahtoaminen. Ilman annetaan korvautua riittävän ajan kuluessa, ja ampulli suljetaan normaalipaineessa.

Punaisten verisolujen määrä on tärkeä parametri kiinnitysprosessin aikana keksintöä käytettäessä, koska määrä on perustana määrittäessä tarvittavan ristisilloittavan aineen stökiometrinen määrä.

Valmistettaessa tämän keksinnön mukaisia vertailunäytteitä merkittävin parametri ei kuitenkaan ole solujen määrä vaan kokonaihemoglobiinin määrä soluissa esitettynä grammoina desilitraa kohti.

Solujen hemoglobiinin määrä voidaan määrittää alan ammattimiehen tuntemalla menetelmällä. Suspension, jossa on tunnettu määrä punaisia verisoluja, annetaan esimerkiksi reagoida syanidin kanssa liuoksessa, joka sisältää hapestavaa ainetta ja ainetta, joka aiheuttaa solujen lyyysin. Hemoglobiinin syanidijohdannaisella on tunnettu ekstinktiokerroin. Niinpä käyttäen laboratoriospektrometriä voidaan määrittää näytteen hemoglobiinipitoisuus.

Tämän keksinnön edut ovat helpommin ymmärrettävissä seuraavien esimerkkien avulla. Kaikki kuvatut toimenpiteet suoritetaan aseptisesti steriileissä olosuhteissa.

Esimerkki I

Erytrosyyttien erotus kokoverestä

Annos vanhaa kokoverettä pestiin kolmessa vaiheessa 0,9 % suolaliuoksella käyttäen IBM Model 2991-1 sentrifugia. Kussakin vaiheessa käytettiin noin yksi litra pesuliuosta. Nahkamainen kalvo poistettiin ja pestyt punaiset verisolut suspendoitiin suolaliuokseen.

Esimerkki II

Steriilien verisolujen kiinnitys

Valmistettaessa oksihemoglobiini- ja karboksihemoglobiinisoluja tämän keksinnön mukaisesti valmistettiin
 5 kiinnittävä puskuriliuos, jonka pH oli 9,2 käyttäen seuraavaa koostumusta:

Taulukko I

<u>Aineosat</u>	<u>Määrä 5 litraa kohti</u>
10 Natriumkarbonaatti	7,22 g
Natriumbikarbonaatti	1,48 g
Deionisoitu vesi	Q,S.
Natriumkloridi	Q,S.

Valmistettaessa kiinnittävää puskuria pH säädettiin
 15 käyttäen 0,1 M natriumkarbonaatin ja natriumbikarbonaatin liuoksia, karbonaattia käytettiin nostamaan pH:a ja bikarbonaattia laskemaan pH:a, tarpeen mukaan, jotta pH saatiin arvoon $9,2 \pm 0,5$. Natriumkloridia lisättiin säätämään liuoksen osmolaalisuus arvoon $320 \text{ mOsm/kg} \pm 5 \text{ mOsm/kg}$.
 20 Natriumkloridia tarvitaan noin 5 g/l.

A. Oksihemoglobiinisolut

Pestyt punaiset verisolut (RBCs), jotka oli valmistettu esimerkissä I kuvatulla tavalla yhdestä yksiköstä kokoverta, suspendoitiin kiinnitettävään puskuriin ja solujen määrä säädettiin arvoon $6,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5 \text{ RBCs}/\mu\text{l}$.
 25 Kiinnittävää puskuria tarvittiin suunnilleen kolme litraa. Kiinteää dimetyyliadipimidaatin hydrokloridia lisättiin niin, että sen konsentraatio oli 0,9 g/l. Välittömästi tämän jälkeen annettiin hapen kuplia suspension läpi
 30 samalla seosta sekoittaen. Sekoitusta ja kaasutusta jatkettiin 25°C :ssa inkuboiden 25 minuuttia. Inkubointijakson jälkeen solut sentrifugoitiin ja pestiin puskurilla. Pesupuskurin koostumus oli seuraava:

Taulukko II

<u>Aineosat</u>	<u>Määrä 2 litraa kohti</u>
HEPES	28,56 g
Natriumbikarbonaatti	3,38 g
5 Deionisoitu vesi	Q.S.

Puskurin pH säädettiin arvoon $7,15 \pm 0,4$ 5N NaOH:lla, ja osmolaalisuus säädettiin arvoon 320 mOsm/kg \pm 5 mOsm/kg NaCl:lla (suunnilleen 6 g/l.). Pesuliuos suodattettiin steriilin 0,22 μ m Millipore-suodattimen läpi. Pesyt solut kerättiin suureen pulloon.

B. Karboksihemoglobiinisolut

Menetelmä, jolla valmistettiin oksihemoglobiinisoluja, toistettiin korvaamalla happi hiilimonoksidilla karboksihemoglobiinisolujen valmistamiseksi.

Esimerkki III

Verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäytteiden valmistus

Valmistettiin kolme verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäytettä kolmena pitoisuutena kuvaten veren fysiologisia tiloja: Pitoisuus I -asidoosi, pitoisuus II -normaali ja pitoisuus III -alkaloosi. Pitoisuudella II käytettiin vain oksihemoglobiinia sisältäviä soluja, kun taas pitoisuuksilla I ja III käytettiin oksihemoglobiinisolujen ja karboksihemoglobiinisolujen seosta. Kullekin pitoisuudelle käytetyn suspensioväliaineen kooostumus on esitetty taulukossa III.

30

35

Taulukko III

		<u>Määrä 1 litraa kohti</u>		
<u>Aineosa</u>		<u>Pitoi- suus I</u>	<u>Pitoi- suus II</u>	<u>Pitoi- toisuus III</u>
5	Härän seerumialbumiini	60 g	60 g	60 g
	HEPES-puskuri	14,28 g	14,28 g	14,28 g
	Ditioerytritoli	0,154 g	0,154 g	0,154 g
	Neomysiinisulfaatti	0,110 g	0,110 g	0,110 g
	Kloramfenikoli	0,330 g	0,330 g	0,330 g
10	EDTA	2,23 g	2,23 g	2,23 g
	Natriubikarbonaatti	0,845 g	2,895 g	9,10 g
	Deionisoitu vesi	Q.S.	Q.S.	Q.S.
	Natriumkloridi	Q.S.	Q.S.	Q.S.
	pH	7,15±04	7,4±04	7,65±04

15

Kullakin pitoisuudella pH säädettiin käyttämällä 5 N NaOH:a. Liuoksen osmolaalisuus säädettiin arvoon 320 mOsm/kg ± 5 mOsm/kg suunnilleen 2 g/l:lla NaCl:a.

20

Vertailunäytteet valmistettiin 1000 ampullin erissä testausta varten. Kukin 3 ml:n ampulli täytettiin 1,7 ml:lla materiaalia. Ampulleja valmistettaessa käytettiin taulukossa IV esitettyjä sekoituksia.

25

30

35

Taulukko IV

Aineosa	Verikaasun vertailunäyte- ampullin valmistus		
	I	II	III
5 Suspensioväliaine ¹	2,9 l ³	3,4 l ³	3,5 l ³
Oksihemoglobiinisol ²	958 ml ⁴	1,7 l	1303 ml ⁴
Karboksihemoglobiini- sol ²	217 ml	-	1050 ml
Kaasuseos %O ₂ - %CO ₂ ,			
10 tasapaino N ₂	20-5	12-5	7-10
P _{CO₂} mm Hg	20±7	35±7	60±7
P _{O₂} mm Hg	140±10	100±10	50±10
Kokonaishemoglobii- ni (g/dl)	9±1	13±1	17±1
15 % Oksihemoglobiini	83±3	96±2	63±3
% Karboksihemoglobiini	15±2	<5	32±3
% Methemoglobiini	<3	<3	<3

1. Taulukossa III kuvattu suspensioväliaine.

20 2. Valmistettu esimerkeissä IIa ja B kuvatulla tavalla.

3. Likimääräiset arvot.

25 4. Sekoitettu pesuliuoksessa olevien solujen suspensioista (taulukko II). Karboksihemoglobiinia sisältävien solujen määrä on valittu ja sopiva määrä oksihemoglobiinia sisältäviä soluja on lisätty.

30 Kolmen vertailuaineen pitoisuustason on tarkoitettu kattavan alueen, jolle testilaitteisto kalibroidaan, esim. kokonaishemoglobiini 6-20 % (paino/tilavuus). Kokonaishemoglobiinin normaalitaso on noin 12 %, kun taas alhainen taso (pitoisuus I) on 8-9 % ja korkea taso (pitoisuus III) on noin 18-19 %.

35 Ampullit, joiden tilavuus oli 3 ml, täytettiin 1,7 ml:lla suspensiota. Ennen täyttämistä ampulleihin annettiin virrata sopivaa kaasuseosta ilman korvaamiseksi. Kaasun annettiin levittyä nesteen pinnalle ilman että neste olisi vaahdonnut.

Verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäytteet todettiin stabiileiksi noin 155-430 päivän ajan varastoidessa 4°C:ssa. Vertailun vuoksi valmistettujen formaldehydillä stabiloitujen erytrosyyttien, valmistettu US-patenttijulkaisussa 3 973 913 kuvatulla tavalla ja modifioitu alla kuvatulla tavalla, stabiilisuus oli vähemmän kuin 60 päivää. Em. patenttijulkaisun menetelmää modifioitiin seuraavasti:

- (1) natriumkarbonaattia ei lisätty sen jälkeen, kun solut oli kiinnitetty P_{CO_2} -pitoisuuksien säätämiseksi,
- (2) lopullinen puskuri oli 0,75 ml HEPES 0,075 M NaCl, pH 7,4, ja (3) pH:a ei enää säädetty ennen ampulleihin laittamista. Kaupallisesti saatavan tuotteen, joka oli valmistettu formaldehydillä kiinnitetyistä erytrosyyteistä, eliniäksi todettiin noin 60 päivää.

Esimerkki IV

Proteiinia ristosilloittavien aineiden vertailu Suoritettiin vertailevia tutkimuksia vertailunäytteillä, jotka oli valmistettu soluista, jotka oli ristosilloitettu formaldehydillä, natriumtetrationsaatilla, diamidilla, dietyylioksidiformaatilla ja dimetyylisuberimidaatilla. Formaldehydi oli tehokas kiinnittävä aine, mutta sillä ei saavutettu samaa stabiilisuutta kuin DMA:lla. Vaikka dimetyylisuberimidaatti oli tehokas ristosilloitettava aine, siinä oli suurempia päivittäisiä ja ampullikohtaisia vaihteluita kuin DMA:lla kiinnitetyillä soluilla.

Diamidilla ja natriumtetrationsaatilla kiinnitys suoritettiin menetelmällä, jonka Haest, C.W.M., et al. ovat kuvanneet, "Intra and Intermolecular Cross-Linking of Membrane Proteins In Intact Erythrocytes and Ghosts by SH-Oxidizing Agents", Biochem. Biophys. Act. 469: 226-230 (1977), tiettyjä modifikaatioita lukuunottamatta. Inkubointiaika pidennettiin kolmeen tuntiin ja punaisten verisolujen pesu suoritettiin Haemonetics 15M solujen pesusysteemillä, joka korvasi panospesuprosessin.

Erytrosyytit, jotka oli kiinnitetty diamidilla tai natriumtetrationsaatilla, olivat äärimmäisen pysymättömiä, ja hajosivat täysin kolmen viikon säilytyksen jälkeen 4°C:ssa tai 25°C:ssa. Hajonneiden solujen jatkettu varastointi 25°C:ssa johti liuoksen geeliytymiseen kahdessa kuukaudessa.

Valmistettaessa dietyylioksidiformaattilla stabiloituja soluja suolaliuosta sisältävä suspensioväliaine korvattiin 0,1 M NaCl - 0,5 M Tris-puskurilla pH:ssa 9,0. 0,4 ml dietyylioksidiformaattia lisättiin 125 ml:aan suspensiota, ja seosta sekoitettiin kaksi tuntia 25°C:ssa.

Vertailunäytteet, jotka oli valmistettu dietyylioksidiformaatin avulla, olivat myös epätyytyttäviä. P_{O_2} oli stabiili ainakin viisi kuukautta, kun suspensiota varastoitettiin 4°C:ssa, mutta P_{CO_2} :n päivittäiset ja ampullikoh-
taiset vaihtelut eivät olleet hyväksyttäviä.

Esimerkki V

Methemoglobiinin stabilointireagenssit

Nystatiinin, maitohapon, kolesterolin, natriumfuma-
raatin ja ksylitolin lisääminen ei parantanut hemoglobi-
nin stabiilisuutta verrattuna vertailunäytteisiin, jotka
sisälsivät ditioerytritolia. Tulokset on esitetty taulu-
kossa V.

Taulukko V

<u>Methemoglobiinin stabilointi</u>		
<u>Stabilisaattori</u>	<u>alkuperäinen⁽¹⁾</u>	<u>175 päivää⁽¹⁾</u>
% MetHb.1. Nystatiini	0,1	4,0
2. Ksylitoli	0,2	4,8
3. Fumaraatti	0,3	5,8
4. Kolesteroli	1,4	3,4
5. Laktaatti	0,3	3,1
6. Vertailu	0,4	5,9
7. Ditioerytritoli	0,3	2,5 ⁽²⁾

⁽¹⁾ arvot ovat keskiarvoja kolmesta määrittäyksestä

⁽²⁾ arvot saatu 196 päivän jälkeen

Kuvauksen perusteella on alan ammattimiehelle ilmeistä, että tämän keksinnön mukaiset tuotteet kaikkein edullisimmin valmistetaan pakkauksen muotoon. Edullisesti pakkaus sisältää ainakin yhden ampullin kutakin pitoisuustasoa (asidoosi, normaali ja alkaloosi) edustavaa vertailunäytettä. Fysiologiset pH:n vaihteluvälit kullekin tasolle ovat: asidoosi -7,0 -7,3; normaali - 7,4 ± 0,1; alkaloosi - 7,6 ± 0,1.

Termeillä "stabiloidut oksihemoglobiinia sisältävät erytrosyytit" ja "stabiloidut karboksihemoglobiinia sisältävät erytrosyytit" tarkoitetaan erytrosyyttejä, jotka on stabiloitu tämän keksinnön mukaisella menetelmällä, jossa kaasua, johon erytrosyytit ovat kosketuksissa stabiloinnin aikana, on vastaavasti happi ja hiilimonoksidi. On ymmärrettävä, että kun tässä julkaisussa viitataan hemoglobiiniin, oksihemoglobiiniin ja karboksihemoglobiiniin, tarkoitetaan näitä sisältäviä erytrosyyttejä, ellei toisin ole mainittu.

Kun keksintö on näin kuvattu, on ilmeistä, että sitä voidaan vaihdella monilla tavoilla. Tällaisia variaatioita ei tule pitää poikkeamisena keksinnön hengestä ja piiristä, ja kaikkien tällaisten modifikaatioiden katsotaan sisältyvän patenttivaatimusten piiriin.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä stabiloida nisäkkään erytrosyyttejä
käytettäväksi verikaasu-hemoglobiini-analyysissä vertailu-
aineena, t u n n e t t u siitä, että:

(a) suspendoidaan kyseiset erytrosyytit puskuroituun kiin-
nitysväliaineeseen, joka koostuu puskurointiaineen vesi-
liuoksesta, väliaineen pH:n ollessa välillä noin 7,3 -
11,3;

(b) saatetaan erytrosyytit kosketuksiin kaasun kanssa, jo-
ka kaasu on happea tai hiilimonoksidia, imidoesterin läs-
näollessa lämpötilassa välillä noin 20°C - 30°C reak-
tioajan ollessa noin 15-60 minuuttia; ja

(c) otetaan talteen stabiloidut erytrosyytit.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että erytrosyytti on ihmisen eryt-
rosyytti.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että imidoesteri on dimetyyliadipi-
midaatti tai dimetyylisuberimidaatti.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kaasu on happi.

5. Patenttivaatimuksessa 1 esitetyn menetelmän mu-
kaisesti valmistettu stabiloitu erytrosyytti.

6. Verikaasu-hemoglobiini-analyysin vertailunäyte-
tuote, t u n n e t t u siitä, että se sisältää:

(a) puskuroidun suspensioväliaineen, joka koostuu pusku-
rointiaineen vesiliuoksesta, kyseisen väliaineen pH:n ol-
lessa välillä noin 6,8 - 8,0; ja

(b) stabiloituja erytrosyyttejä, jotka on valmistettu pa-
tenttivaatimuksessa 1 esitetyn menetelmän mukaisesti, jol-
loin kyseisten erytrosyyttien määrä suspensioväliaineessa
sellainen, että suspensioväliaineen kokonaihemoglobiinin
konsentraatio on noin 3-24 g/dl; kyseisen hemoglobiinin
sisältäessä noin 60-100 % oksihemoglobiinia ja noin 0-35 %
karboksihemoglobiinia.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen tuote, t u n -
n e t t u siitä, että suspensioväliaine sisältää ditio-
erytritolia konsentraationa noin 0,07 - 0,77 grammaa sus-
pensioväliaineen litraa kohti.

5 8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen tuote, t u n -
n e t t u siitä, että erytrosyytit ovat joko oksihemoglo-
biinia sisältäviä erytrosyyttejä, karboksihemoglobiinia
sisältäviä erytrosyyttejä tai näiden seoksia.

10 9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen tuote, t u n -
n e t t u siitä, että se on suljettu ampulliin, ampullin
ilmakehä koostuu hapesta, hiilimonoksidista ja inertistä
kaasusta, hapen osapaine on noin 20-400 mmHg ja hiilimo-
noksidin osapaine on noin 10-75 mmHg.

15 10. Pakkaus, t u n n e t t u siitä, että se sisäl-
tää ainakin yhden ampullin patenttivaatimuksen 9 mukaista
tuotetta.

Patentkrav

1. Förfarande för stabilisering av däggdjurserythrocyter för användning som kontroll vid blodgas-hemoglobin-analys, k ä n n e t e c k n a t därav, att

5 (a) erythrocyterna suspenderas i ett buffrat fixeringsmedium, som omfattar en vattenlösning av buffertmedel och har ett pH-värde av cirka 7,3-11,3;

10 (b) erythrocyterna bringas i kontakt med en gas, som är syre eller kolmonoxid, i närvaro av en imidoester vid en temperatur av cirka 20-30°C för en reaktionstid av cirka 15-60 minuter; och

(c) de stabiliserade erythrocyterna tillvaratas.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
15 t e c k n a t därav, att erythrocyten är en humanerythrocyt.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att imidoestern av dimetyladiipimidat eller dimetylsuberimidat.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att gasen är syre.

5. Stabiliserad erythrocyt som framställts i enlighet med förfarandet i patentkravet 1.

6. Kontrollprodukt för blodgas-hemoglobin-analys, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller:

25 (a) ett buffrat suspensionsmedium som omfattar en vattenlösning av buffertmedel och har ett pH av cirka 6,8-8,0; och

30 (b) stabiliserade erythrocyter, som framställts i enlighet med förfarandet i patentkravet 1, varvid halten av nämnda erythrocyter i suspensionsmediet är sådant, att den totala koncentrationen av hemoglobin i suspensionsmediet är cirka 3-24 g/dl; och varvid nämnda hemoglobin innehåller cirka 60-100 % oxihemoglobin och cirka 0-35 % karboxihemoglobin.

7. Produkt enligt patentkravet 6, k ä n n e -
35 t e c k n a t därav, att suspensionsmediet innehåller di-

tioerytritol i en koncentration av cirka 0,07-0,77 g/l suspensionsmedium.

5 8. Produkt enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att erythrocyterna är oxihemoglobin-
nehållande erythrocyter, karboxihemoglobinnehållande
erythrocyter eller blandningar av dessa.

10 9. Produkt enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den är innesluten i en ampull
vars atmosfär omfattar syre, kolmonoxid och inert gas,
syrets deltryck är cirka 20-400 mmHg och kolmonoxidets
deltryck är cirka 10-75 mmHg.

15 10. Förpackning, k ä n n e t e c k n a d därav, att
den innehåller åtminstone en ampull av produkten enligt
patentkravet 9.