



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104159591 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201280066237. 9

A61M 1/36(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 11. 06

(30) 优先权数据

61/556, 661 2011. 11. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/063690 2012. 11. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/070592 EN 2013. 05. 16

(71) 申请人 通用医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 W. M. 扎波尔 B. 于

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

A61K 35/18(2006. 01)

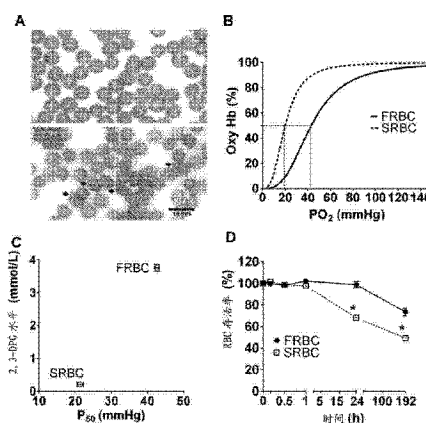
权利要求书2页 说明书18页 附图14页

(54) 发明名称

红细胞的处理

(57) 摘要

本申请公开了处理红细胞的组合物和方法。所述方法包括使红细胞样品活体外与,足以使得红细胞样品中存在的至少部分胞外亚铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白的量的、氧化氮或者释放氧化氮的化合物接触。在经所述的活体外处理后将红细胞施用于哺乳动物,降低了所施用的红细胞对被施用的哺乳动物的副作用。



1. 处理红细胞样品的方法,所述方法包括使红细胞样品活体外与足以使得红细胞样品中存在的至少部分胞外亚铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白的量的、氧化氮或者释放氧化氮的化合物接触。

2. 权利要求1的方法,其中,所述的红细胞样品在与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,已活体外经历过血液透析,术中血液抢救,或心切开吸引术。

3. 权利要求1的方法,其中,所述的红细胞样品在与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,已活体外经历过一种或以上的泵、膜或气泡。

4. 权利要求1的方法,其中,从供体中移除后、与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,所述的红细胞样品已活体外保存了至少24小时。

5. 权利要求1的方法,其中,从供体中移除后、与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,所述的红细胞样品已活体外保存了至少7天。

6. 权利要求1的方法,其中,从供体中移除后、与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,所述的红细胞样品已活体外保存了至少14天。

7. 权利要求1的方法,其中,从供体中移除后、与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,所述的红细胞样品已活体外保存了至少28天。

8. 权利要求1的方法,其中,从供体中移除后、与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,所述的红细胞样品已活体外保存了至少42天。

9. 前述任一项权利要求的方法,其中所述红细胞样品中的至少20%的胞外亚铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白。

10. 前述任一项权利要求的方法,其中所述红细胞样品中的至少50%的胞外亚铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白。

11. 前述任一项权利要求的方法,其中所述红细胞样品中的至少80%的胞外亚铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白。

12. 前述任一项权利要求的方法,其中所述的红细胞样品与含气态氧化氮的治疗性气体接触。

13. 权利要求12的方法,其中所述的治疗性气体中气态氧化氮的浓度是至少20ppm。

14. 权利要求12的方法,其中所述的治疗性气体中气态氧化氮的浓度是至少40ppm。

15. 权利要求12的方法,其中所述的治疗性气体中气态氧化氮的浓度是至少80ppm。

16. 权利要求12的方法,其中所述的治疗性气体中气态氧化氮的浓度在100ppm到800ppm的范围。

17. 权利要求12的方法,其中所述的治疗性气体中气态氧化氮的浓度在40ppm到200ppm的范围。

18. 权利要求12的方法,其中所述的治疗性气体中气态氧化氮的浓度在40ppm到3,000ppm的范围。

19. 权利要求12到18任一项所述的方法,其中所述的红细胞样品与所述的治疗性气体接触不到5秒。

20. 权利要求12到18任一项所述的方法,其中所述的红细胞样品与所述的治疗性气体接触至少15分钟。

21. 权利要求12到18任一项所述的方法,其中所述的红细胞样品与所述的治疗性气体

接触至少 1 小时。

22. 权利要求 12 到 18 任一项所述的方法,其中所述的红细胞样品与所述的治疗性气体接触至少 2 小时。

23. 权利要求 1 到 11 任一项所述的方法,其中所述的红细胞样品与释放氧化氮的化合物接触。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述的释放氧化氮的化合物包括亚硝酸盐。

25. 权利要求 23 的方法,其中所述的释放氧化氮的化合物是超短作用的释放氧化氮的化合物。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述的超短作用的释放氧化氮的化合物是 1-[2-(羧基)吡咯烷-1-基]二氮烯-1-鎓-1,2-二氧化物(diolate)或(Z)-1-[N-甲基-N-[6-(N-甲基铵基己基)氨基]]二氮烯-1-鎓-1,2-二氧化物。

27. 前述任一项权利要求的方法,其中所述方法在无菌条件下进行。

28. 防止或降低施用红细胞后哺乳动物中的血管收缩的方法,所述方法包括给哺乳动物施用,已活体外与足以使得红细胞样品中存在的至少部分胞外亚铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白的量的、氧化氮或者释放氧化氮的化合物接触的红细胞样品。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述的红细胞样品包含自体红细胞。

30. 权利要求 28 的方法,其中所述的红细胞样品包含同种异型的红细胞。

31. 权利要求 28 到 30 任一项所述的方法,其中所述的红细胞样品在用氧化氮或释放氧化氮的化合物处理之前经冻融。

32. 权利要求 28 到 31 任一项所述的方法,其中所述的红细胞样品与作为顺序输注系统的一部分的氧化氮接触,其中所述的红细胞样品从含有所述红细胞样品的容器流出,和连接着氧化氮源的透气材料接触,使红细胞样品暴露于氧化氮,并在暴露于氧化氮之后递送至所述哺乳动物。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述的氧化氮源是含压缩氧化氮气体的罐。

34. 权利要求 32 的方法,其中所述的氧化氮是电动氧化氮发生器。

35. 前述任一项权利要求的方法,其中所述的哺乳动物是人。

红细胞的处理

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 11 月 7 日提交的美国临时专利申请 No. 61/556, 661 的优先权, 所述在先申请的全部内容通过参考的形式全部并入本申请。

技术领域

[0003] 本发明涉及在施用于哺乳动物之前处理红细胞的组合物和方法。

[0004] 发明背景

[0005] 储存长达两周以上的红细胞输血与感染率提高、住院时间延长, 以及重症监护治疗病房和正接受心血管手术的患者死亡率升高相关 (Triulzi 等人, Transfus Apher Sci2010 ;43:95-106)。延长的红细胞储存引起红细胞中显著的生化、机械的以及功能性的改变, 总称为“储存性损伤 (storage lesion)”。(Kim-Shapiro 等人, Transfusion2011 ; 51:844-51)。需要用于降低或去除用储存红细胞输血的副作用的组合物和方法。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明至少部分地基于下述发现, 即用氧化氮活体外 (ex vivo) 处理储存的红细胞可使得胞外亚铁血红蛋白氧化成为高铁血红蛋白, 此种处理防止储存的红细胞在被施用于哺乳动物后诱导血管收缩。氧化氮或释放氧化氮的化合物预处理储存的红细胞, 可用作减少或消除与用储存的血液输血相关的副作用的手段。在施用于哺乳动物之前对血液进行处理, 可免除为了解决由用储存的血液输血所导致的副作用, 而对输血后的哺乳动物进行治疗的需要。

[0008] 本申请公开了, 通过使红细胞样品活体外与, 足以使得红细胞样品中存在的至少部分胞外亚铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白的量的、氧化氮或者释放氧化氮的化合物接触, 对红细胞样品进行处理的方法。胞外亚铁血红蛋白包括无细胞血红蛋白和含胞外血红蛋白的微颗粒 (参见 Donadee 等人, Circulation2011 ;124:465-76)。

[0009] 本申请还公开了, 通过对哺乳动物施用下述的红细胞样品以防止或减少在施用红细胞后哺乳动物中的血管收缩, 所述的红细胞样品已活体外与, 足以使得红细胞样品中存在的至少部分胞外亚铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白的量的、氧化氮或者释放氧化氮的化合物接触。

[0010] 在本申请所公开的方法的一些具体实施方案中, 所述的方法并不显著地氧化样品中的红细胞或减弱它们的携氧能力 (例如, 红细胞中低于 20%, 低于 15%, 低于 10%, 或低于 5% 的血红蛋白被转化成高铁血红蛋白)。

[0011] 本申请所公开的方法的一些具体实施方案中, 所述的红细胞样品在与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前, 已经历过一种或以上活体外, 泵 (例如, 负压泵吸引), 膜, 和/或气泡 (air bubbles) 处理。在本申请所公开的方法的一些具体实施方案中, 所述的红细胞样品在与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前, 已或活体外经历过, 血液透析, 术中血液抢救, 心切开吸引术。在这些方法中, 所述的红细胞在遭受使其需要经本申请所公开的方法进行处理的损伤之前, 仅需要处于哺乳动物体外, 一小段时间 (例如, 几秒或几分钟)。

[0012] 红细胞样品包含红细胞和上清液或血浆。所述的红细胞样品可以是,例如,全血或浓缩红细胞。

[0013] 所述红细胞样品可活体外储存,例如,在从供体中移除后、与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,至少 24 小时。在一些具体实施方案中,所述红细胞样品从供体中移除后、与氧化氮或释放氧化氮的化合物接触前,活体外储存至少 7 天,至少 14 天,至少 28 天,至少 42 天或更长时间。所述红细胞样品在储存之前可任选地用储存溶液稀释。

[0014] 施用于哺乳动物之前,红细胞可来源于自体或同种异型供体。因此,所述红细胞样品可包含自体红细胞或同种异型的红细胞。所述红细胞样品可储存于多种储存介质(例如,Adso1)。在用氧化氮或释放氧化氮的化合物处理之前,所述红细胞样品可任选地被冻融。

[0015] 本申请所公开的方法的一些具体实施方案中,所述的处理使得所述红细胞样品中至少 20% (或至少 50%,或至少 80%) 的胞外亚铁血红蛋白被转化成高铁血红蛋白。

[0016] 在本申请所公开的方法的一些具体实施方案中,所述红细胞样品与用惰性气体稀释的、含气态氧化氮的治疗性气体接触。治疗性气体中所述气态氧化氮的浓度可以是,例如至少 20ppm,至少 40ppm,至少 50ppm,至少 80ppm,至少 100ppm,至少 200ppm,至少 300ppm,或至少 500ppm。在一些具体实施方案中,所述治疗性气体中气态氧化氮的浓度在 50ppm 到 800ppm (例如,40ppm 到 200ppm,80ppm 到 200ppm,80ppm 到 500ppm,100ppm 到 800ppm,或 40ppm 到 3,000ppm) 的范围。所述红细胞样品可与治疗性气体在不同长度的时间段(例如,至少 1 秒,低于 5 秒,低于 30 秒,至少 1 秒但低于 5 秒,至少 1 秒但低于 30 秒,至少 1 分钟,至少 2 分钟,至少 3 分钟,至少 4 分钟,至少 5 分钟,至少 6 分钟,至少 7 分钟,至少 8 分钟,至少 9 分钟,至少 10 分钟,至少 1 小时,至少 2 小时,或更长的时间)内相接触。

[0017] 在本申请所公开的方法的一些具体实施方案中,所述红细胞样品与释放氧化氮的化合物接触。所述释放氧化氮的化合物任选地包含亚硝酸盐。所述释放氧化氮的化合物可以是超短作用 (ultra-short-acting) 释放氧化氮的化合物(例如,1-[2-(羧基)吡咯烷-1-基]二氮烯-1-鎓-1,2-二氧化物 (diolate) 或 (Z)-1-[N-甲基-N-[6-(N-甲基铵基己基)氨基]]二氮烯-1-鎓-1,2-二氧化物)或释放二醇二氮烯鎓 (nonoate) 的中间物。

[0018] 本申请所公开的方法的一些具体实施方案中,所述方法在无菌条件下进行。所述红细胞样品在其从供体获得,乃至用氧化氮或释放氧化氮的化合物进行处理的整个过程中,均保持在无菌条件之下。

[0019] 在本申请所公开的方法的一些具体实施方案中,所述红细胞样品与作为顺序 (in-line) 输注 (infusion) 系统的一部分的氧化氮接触,其中,所述的红细胞样品从含所述样品的容器流出,和与惰性气体中的氧化氮源相连的层流设备或第二流式气体交换设备中的透气材料(例如微孔膜)接触,使红细胞样品暴露于氧化氮,并在暴露于氧化氮之后递送至所述哺乳动物。所述的氧化氮源可以是例如,含压缩的氧化氮气体的罐或电动氧化氮发生器(含或不含 NO₂ 净化剂)。

[0020] 经本申请所描述的方法治疗的哺乳动物可以是人,或非人灵长类,或另外的哺乳动物,如狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、大鼠、小鼠、豚鼠、兔或仓鼠。

[0021] 本申请所提及的全部的出版物,专利申请,专利,序列,数据条目以及其他参考文

献,均以参考的形式全文并入本申请。除非另外定义,本申请所用的全部技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员通常所理解的含义。存在分歧时,包括定义在内,以本说明书为准。下文中描述了用于本发明的材料和方法,但是类似或等价于本申请所描述的其他合适的材料和方法也可以用于实施或检验本发明。所述的材料、方法和实施例仅作为示例,并非旨在进行限定。

[0022] 本发明的其它特征和有益效果,在下述的详细描述以及权利要求中显而易见。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1A-1D 提供,在体外鼠 RBC 中储存诱导的形态,生化和功能改变。(A) 新鲜红细胞 (FRBC, 上部的图) 和储存的红细胞 (SRBC, 下部的图) 的染色涂片,下部图中的箭头显示储存两周后增多的异型 RBC 数量。(B) FRBC 和 SRBC 的氧解离曲线 (ODC)。P₅₀, 定义为 Hb50% 饱和时的氧分压,由所述的 ODC 计算出来。所述 SRBC 的 ODC 向左偏移,其 P₅₀ 为 21±1mmHg, 相比之下,FRBC 的 P₅₀ 是 43±0mmHg。(C) FRBC (n = 5) 和 SRBC (n = 5) 与 P₅₀ 的 FRBC (n = 3) 和 SRBC (n = 3) 的 2,3-DPG 水平变化比较。(D) 通过 WT 小鼠中输血后 24 小时测定的、GFP- 标记的 RBC 百分比除以在 0 时间 GFP- 标记的 RBC 的百分比,确定 FRBC (n = 6) 或 SRBC (n = 6) 存活率。FRBC, 新鲜红细胞 (≤ 24h); SRBC, 储存的红细胞 (2 周)。*P<0.01, 与 FRBC 相比的差异。

[0025] 图 2A-2C 是显示用 FRBC 或 SRBC 输血 2 小时后,清醒的 WT (A), 给予 HFD 的 WT (B) 以及 db/db (C) 小鼠中的血清铁水平的图表。对照,没有输血 (n = 4/ 组); FRBC, 用 FRBC (n = 6/ 组) 输血; SRBC, 用 SRBC (n = 6/ 组) 输血。*P<0.05, 与对照和 FRBC 相比的差异。

[0026] 图 3A-3C 是显示用 FRBC 或 SRBC 输血 2 小时后,清醒的 WT (A), 给予 HFD 的 WT (B) 以及 db/db (C) 小鼠中, IL-6 (A), Hp (B), 和 Hx (C) 的血浆水平的图表。对照,没有输血 (n = 4/ 组); FRBC, 用新鲜 RBC (n = 6/ 组) 输血; SRBC, 用储存的 RBC (n = 6/ 组) 输血。*P<0.05, 与对照相比的差异; †P<0.01, 与 FRBC 相比的差异。

[0027] 图 4A-4C 是显示用 FRBC 或 SRBC 输血 2 小时后,清醒的 WT (A), 给予 HFD 的 WT (B) 以及 db/db (C) 小鼠中, 肝 HO-1 mRNA 水平的图表。对照,没有输血 (n = 4/ 组); FRBC, 用新鲜 RBC (n = 6/ 组) 输血; SRBC, 用储存的 RBC (n = 6/ 组) 输血。*P<0.05, 与对照和 FRBC 相比的差异。

[0028] 图 5A-5E 是显示经历不同类型的输血 (10% 估算血容量) 后,清醒的 WT, 给予 HFD 的 WT, 或 db/db 小鼠中的体循环血压 (SBP, mmHg) 的图表。(A) 清醒的 WT 小鼠中以 FRBC (n = 5) 或 SRBC (n = 6) 输血。(B) 清醒的给予 HFD 的 WT 小鼠中以 FRBC (n = 6) 或 SRBC (n = 6) 输血。(C) 清醒的 db/db 小鼠中, 以呼吸了 (n = 12)、或没有呼吸 (n = 9) 氧化氮 (iNO, 80ppm) 的 FRBC (n = 9) 或 SRBC 输血。(D) 清醒的 db/db 小鼠中, 以来自 FRBC (SFRBC, n = 11) 的上清液, 来自 SRBC (SSRBC, n = 7) 的上清液, 或氧化的 SSRBC (n = 6) 输血。(E) 清醒的 db/db 小鼠中以洗过的 FRBC (n = 9) 或洗过的 SRBC (n = 6) 输血。FRBC, 新鲜红细胞; SRBC, 储存的红细胞。*P<0.05, 与 FRBC 和 SRBC+iNO 相比的差异。

[0029] 图 6A-6B 是显示比较用 FRBC (SFRBC, n = 6) 上清液, SRBC (SSRBC, n = 6) 上清液, FRBC (n = 7) 或 SRBC (n = 7) 输血之前之后, 经麻醉的 db/db 小鼠中体循环血流动力测定结果的变化的图表。(A) 输血前和输血 10 分钟后 LVESP (mmHg) 的变化。(B) 输血前和输血 10 分钟后 SVRI (%) 的变化。LVESP, 左心室收缩期末压力; SVRI, 体循环血管阻力指标,

* $P < 0.05$, 与 FRBC 上清液或 FRBC 组相比的差异。

[0030] 图 7 是显示在添加溶液-1(additive solution-1) 中储存的、白细胞减少的(leukoreduced) 羊 PRBC 的体内存活率的图表。y- 轴显示循环中的生物素化的 PRBC。输血后第一个 24 小时 $96 \pm 4\%$ 的生物素化的新鲜 PRBC 存活, 而 $76 \pm 7\%$ 的生物素化的储存 PRBC 在输血后 24 小时在循环中。* $P = 0.001$, 与新鲜 PRBC 相比的差异值, † $P = 0.002$, 与新鲜 PRBC 相比的差异值, # $P < 0.001$, 与新鲜 PRBC 相比的差异值, § $P = 0.002$, 新鲜 PRBC 与储存 PRBC 相比的差异值。PRBC = 浓缩的红细胞。所有数据平均值 $\pm$ SD。

[0031] 图 8A-8B 是显示用新鲜的和储存的 PRBC 输血过程中和之后, 在清醒的小羊羔中测定的 (A) 肺动脉平均压, 和 (B) 肺血管阻力指标的图表。一些小羊羔在用储存的 PRBC 输血过程中和之后接受了吸入的氧化氮。* $P < 0.05$, 储存的 PRBC 值与新鲜 PRBC 和储存的 PRBC+iNO, ANOVA 的差异。iNO = 吸入的氧化氮; PAP = 肺动脉平均压; PRBC = 浓缩的红细胞; PVRI = 肺血管阻力指标。全部数据平均值 $\pm$ SD。

[0032] 图 9A-9C 是显示用新鲜的和储存的 PRBC 输血过程中和之后测定的 (A) 肺动脉平均压, (B) 肺毛细血管楔压, 和 (C) 肺血管阻力指标的图表。一些小羊羔在用储存的 PRBC 输血过程中和之后接受了吸入的氧化氮。* $P < 0.05$, 储存的 PRBC 值与新鲜 PRBC 和储存的 PRBC+iNO, ANOVA 的差异。L-NAME 在输血前施用以诱导内皮功能不良 († $P < 0.05$, 各组中, 在第 -60 分钟 (L-NAME 之前) 的测定值, 与第 -50 分钟和第 -10 分钟之间的测定值的差异)。iNO = 吸入的氧化氮; L-NAME = NG- 硝基-L- 精氨酸甲基- 酯; PAP = 肺动脉平均压; PCWP = 肺毛细血管楔压; PRBC = 浓缩的红细胞; PVRI = 肺血管阻力指标。全部数据平均值 $\pm$ SD。

[0033] 图 10 是显示用新鲜的和储存的 PRBC 输血之前和之后, 在健康的清醒的小羊羔中测定的血浆血红蛋白水平的图表。一些小羊羔在用储存的 PRBC 输血过程中和之后接受了吸入的氧化氮。* $P < 0.05$, 新鲜 PRBC 值与储存的 PRBC 和储存的 PRBC+iNO, ANOVA 的差异。iNO = 吸入的氧化氮; PRBC = 浓缩的红细胞。全部数据平均值 $\pm$ SD。

[0034] 图 11A-11B 是显示用新鲜的和储存的 PRBC 输血之前和之后, 在清醒的小羊羔中测定的血浆 (A) 硝酸盐和 (B) 亚硝酸盐水平的图表。* $P < 0.05$, 储存的 PRBC+iNO 值与新鲜 PRBC 和储存的 PRBC, ANOVA 的差异。iNO = 吸入的氧化氮; PRBC = 浓缩的红细胞。全部数据平均值 $\pm$ SD。

[0035] 图 12 是显示红细胞上清液中血红蛋白种类的相对浓度的图表, 所述的红细胞上清液, 经由微孔气体交换器, 用氮气中的气态氧化氮处理过。

[0036] 图 13 是显示红细胞中高铁血红蛋白相对浓度的图表, 所述的红细胞, 经由微孔气体交换器, 用氮气中的气态氧化氮处理过。

[0037] 图 14A-14B 是显示 MAHMA/NO 处理对人和鼠储存的红细胞的作用的图表。A) 无细胞上清液血红蛋白与胞内高铁血红蛋白红细胞水平的氧化比较, B) 上清液 ([Hb], μ M) 和红细胞 (Hct, %) 中的血红蛋白浓度。

[0038] 图 15 是显示在将储存的红细胞 (储存 2 周) 和经 1mM MAHMA/NO, 5% v/v, 预处理的储存的红细胞输注到清醒的 db/db 小鼠之前和之后, 通过非侵入性的尾部套囊测定的收缩压 (mmHg), * $P < 0.05$, 与用 MAHMA/NO 预处理的 SRBC 相比的差异。

[0039] 图 16 显示用于气体-气体转移实验的含膜设备。

[0040] 图 17 是显示不同的气流比例（数据以平均值 $\pm$ SD 表示, $n = 6$; G1/G27:1, 气流比例 7:1; G1/G214:1, 气流比例 14:1）通过微孔的 (MP) 和聚甲基戊烯 (PMP) 膜的氧化氮浓度的图表。

[0041] 发明详述

[0042] 将储存的红细胞施用于哺乳动物引起血管收缩以及其他的副作用。本发明提供用于减少和消除施用储存的红细胞后所出现的副作用的组合物和方法。如所附的实施例中详细描述, 通过将其暴露于氧化氮, 氧化储存的红细胞上清液, 将胞外活性的亚铁血红蛋白转化成无活性的高铁血红蛋白, 消除由于施用储存的红细胞所出现的血管收缩。

[0043] 红细胞

[0044] 红细胞可来源于自体或同种异型的供体, 接下来, 将其施用于受体。红细胞的储存导致在将储存所血液施用于受体后诱导血管收缩 (Reynolds 等人 (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. 104:17058-62; Bennett-Guerrero 等人 (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. 104:17063-68)。根据本申请所描述的方法, 在向供体输注前, 可在多种时间段 (例如, 至少 1, 2, 3, 4, 5, 6, 或 12 小时, 或至少 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 42 天, 或更长时间) 内储存人红细胞。红细胞可以, 例如全血或浓缩红细胞的形式施用。

[0045] 氧化氮

[0046] 根据诸如所述红细胞样品的大小, 流速, 暴露于氧化氮的时间长度, 相对于微孔气体渗析膜中的混合的层流程度之类的因素, 和 / 或治疗医师认为相关的其他因素, 合适用于处理红细胞样品的氧化氮浓度不尽相同, 例如, 从 20ppm 到 80ppm, 200ppm 到 500ppm, 500ppm 到 800ppm, 2, 800ppm, 3, 000ppm, 或更高。药品级的氧化氮是可商购的 (INO maxTM, Ikaria, Inc., Clinton, NJ)。

[0047] 用于处理红细胞样品的气态氧化氮可由储存的、压缩氧化氮气体源施用。所述的氧化氮源可以是 100% 氧化氮, 或是用 N_2 或任何其他惰性气体 (例如氩) 稀释的。所述的氧化氮可以, 以不含 O_2 或氮气的高价氧化物的混合物形式获得并储存。需要时, 可通过化学发光分析证明氧化氮的纯度。化学发光 NO- NO_x 分析仪是可商购的 (例如 Model 114A, Thermo Environmental Instruments, Franklin, MA)。混合物中氧化氮的最终浓度可通过化学的或化学发光技术 (参见例如, Fontijn 等人, Anal. Chem. 42:575 (1970)) 证明。另外, NO 和 NO_2 浓度可通过电化学分析仪方式监控。任何杂质, 如 NO_2 , 可通过暴露于 NaOH 溶液, 二氧化碳吸收剂 (baralyme) 或者碱石灰 (sodalime) 洗去。作为额外的对照, 还可以评估最终气体混合物中的 FeO_2 。

[0048] 将氧化氮气体施用于红细胞样品可通过, 例如, N_2 (或惰性气体) 中的压缩的氧化氮气体的罐和第二氮气 (或另一种惰性气体) 罐附加在设计用于将两种来源的气体混合的设备来实现。通过控制每一来源的气体的流速, 可将最终施用于所述红细胞样品的氧化氮浓度保持在最佳水平。也可以利用标准的低流量混合器 (例如, Bird Blender, Palm Springs, CA) 使氧化氮气体与室内空气 (room air) 混合。

[0049] 氧化氮可由 N_2 和 O_2 (即空气) 通过电动氧化氮发生器生成。此种发生器如 Zapol, U. S. Patent No. 5, 396, 882 中所描述。由此类设备形成的 NO_2 可在将血液样品暴露于 NO_2 之前, 通过净化所述的气体混合物来减少。

[0050] 用于将氧化氮递送到红细胞样品的气体递送设备可包含氧化氮计量器,以监控暴露于样品的氧化氮的总剂量。通过使用计量器,即可确定样品已经接受了所需量的氧化氮,由此可以逐渐停止或终止氧化氮的施用。计量器可将治疗性气体中的氧化氮浓度(由氧化氮浓度计测定)与气体流速(由气体流量计测定)整合,以确定暴露于所述红细胞样品的氧化氮的总量。

[0051] 可使用透气材料使得气态氧化氮扩散通过,与所述红细胞样品接触。此类材料的示例包括透气膜,如在血液氧合器中所使用的那些(例如,二甲聚硅氧烷或聚烷基砜),和微孔性材料,如 Gore-tex™ 或 Celgard™,其允许氧化氮之类的气体分子通过其微孔,溶解在液体中。一种示例性的氧合器(Living Systems Instrumentation Inc., St. Albans, Vermont)的使用在后附的实施例中有描述。所述透气材料的部件可被设置成,一面与所述红细胞样品接触,另一面与氧化氮源接触,使红细胞和氧化氮源相分离,但允许氧化氮气体的单个分子通过并扩散到所述的样品中。在输注过程中,氧化氮可任选地与红细胞样品接触,由此,使从包含所述红细胞样品的容器流出的红细胞样品暴露于通过所述透气材料(其允许氧化氮扩散到红细胞样品中)的氧化氮,并最终施用于所述的受体。也可以使用具有第二流量(secondary flows)的气体交换器(参见,例如,Zapol 和 Qvist, Artificial Lungs for Acute Respiratory Failure, New York, Academic Press, 1976)。

[0052] 可制备包含氧化氮的水溶液,用于将氧化氮递送给红细胞样品。在引入到所述红细胞样品之前,所述的氧化氮可溶解于药品可接受的载液(carrier liquid)中。可用于此种目的的载液包括标准的盐溶液和小份(aliquots)的所述红细胞样品,以及液体,如氧化氮在其中展现高水平溶解度的碳氟化合物或有机的溶剂(Shaw 和 Vosper J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1. 73:1239-1244, 1977; Young, Solubility Data Series 8:336-351, 1981),由此大量聚集的氧化氮可以在小容量的载体中递送。

[0053] 释放氧化氮的化合物

[0054] 作为所使用的氧化氮的替代(或另外的选择),根据本申请所描述的方法可将释放氧化氮的化合物暴露于红细胞样品。适用于本申请的方法的释放氧化氮的化合物包括:亚硝基或亚硝酰化合物(S-亚硝基-N-乙酰青霉胺, S-亚硝基-L-半胱氨酸,和亚硝基胍),其以氧化氮组分自发释放、或在生理条件下由所述化合物转移出来为特征;化合物,其中的氧化氮是过渡金属复合物上的配体,因此可以容易地释放或在生理条件下由所述化合物转移出来(例如,硝普盐,氧化氮-铁氧还原蛋白或氧化氮-血红素复合物);和酶代谢产生氧化氮自由基的含氮化合物(例如,精氨酸,三硝酸甘油,亚硝酸异戊酯,亚硝酸钠,无机亚硝酸盐叠氮化物,和羟胺)。另外的释放氧化氮的化合物包括硝酸甘油和 SIN-1。

[0055] 释放氧化氮的化合物可以是超短作用释放氧化氮的化合物,例如 1-[2-(羧基)吡咯烷-1-基]二氮烯-1-鎓-1,2-二氧化物(“PROLI/NO”), 1-羟基-2-氧代-3-(N-甲基-3-氨基丙基)-3-甲基-1-三氮烯(“NOC-7”; Zhang 等人 (1996) Circulation 94:2235), N,N'-二甲基乙二胺的氧化氮加合物(“DMHD/NO”; Kaul 等人 (1997) J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 19972(3):181), 或 (Z)-1-[N-甲基-N-[6-(N-甲基氨基己基)氨基]二氮烯-1-鎓-1,2-二氧化物(“MAHMA/NO”)。在一些具体实施方案中,所述的超短作用释放氧化氮的化合物具有低于 90 分钟(或低于 60 分钟,低于 30 分钟,低于 20 分钟,低于 10 分钟,低于 5 分钟,低于 2 分钟,或低于 1 分钟)的半寿期。

[0056] 已知的化合物或据信可以释放氧化氮的化合物（例如，超短作用释放氧化氮的化合物）可使用本申请所述的动物模型直接试验其效力。此外，此种化合物可首先根据其激发鸟苷酸环化酶的能力进行筛选，在如 Ishii 等人 (1991) Am. J. Physiol. 261:H598-H603 所描述的体外试验中，氧化氮结合鸟苷酸环化酶并由此发挥其生物学活性。

[0057] 以下是实施本发明的实施例。所述实施例不以任何形式构成对本发明范围的限制。

实施例

[0058] 实施例 1: 小鼠中糖尿病加剧 (Augments) 以及氧化氮防止同基因的 (Syngeneic) 储存血液输血后的不良血流动力影响

[0059] 动物

[0060] 所有的动物研究均得到位于 Massachusetts General Hospital, Boston, MA 的动物研究委员会的许可。对 8-10 周龄的雄性 C57BL/6J 野生型 (WT) 小鼠和 B6. Cg-m⁺/+Leprdb/J (C57BL/6J 背景) 糖尿病 (db/db) 小鼠进行了研究。另外的 WT 小鼠饲喂高脂饮食 (60kcal % 脂肪; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) 4-6 周 (给予 HFD 的 WT)。8-10 周龄的，在其红细胞上表达 GFP 的、雄性、绿荧光蛋白 (GFP) 转基因 C57BL/6-Tg(UBC-GFP) 30Scha/J (C57BL/6J 背景) 小鼠用于测定 RBC 存活率。全部的小鼠均由 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) 获得。

[0061] 鼠血液收集与储存

[0062] 在无菌条件下，通过开胸心脏穿刺将 C57BL/6J WT 小鼠的血液 (~ 1ml/ 小鼠) 收集到含 CPDA-1 的注射器 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 中。CPDA-1 的终浓度是 14%。收集后，使血液通过新生儿白细胞减少滤器 (neonatal leukoreduction filter) (Pall Biomedical Products Co., East Hills, NY)，减少白细胞。减少了白细胞的血液 600g 离心 15min，去除血浆调节血细胞比容 (Hct) 70-75%，于 4°C 下储存于 Eppendorf 管。利用鲎变形细胞溶解物试验 (LAL) (参见 Novitsky 等人 J Clin Microbiol 1985; 21:211-6) 测定新鲜的白细胞减少的鼠 RBC (FRBC) 或储藏的白细胞减少的鼠 RBC (SRBC) 样品中脂多糖 (LPS) 水平。

[0063] 储存的 RBC 组分的制备

[0064] 将 FRBC 或 SRBC 在 4°C，以 400g 离心 10min 后获得上清液。为使得因洗涤导致的溶血降至最低，用 10 倍体积的 1.5% 氯化钠轻柔洗涤 FRBC 和 SRBC，并于 4°C 下 400g 离心 10min。输血前，洗过的 FRBC 或 SRBC 重悬于新鲜的鼠血浆以获得最终 70-75% 的 Hct。

[0065] 为氧化 SRBC 上清液中的亚铁 Hb，将所述的上清液暴露于经由氧合器 (Living Systems Instrumentation Inc., St. Albans, Vermont) 的、于氮气中的 800ppm 氧化氮气体 2 小时，以产生 metHb (Yu 等人, Circulation 2008; 117:1982-90)。将上清液 (2ml) 以 3L、0.9% 盐水透析 3 次 (Spectra/Por 分子多孔膜 MWCO: 12-14, 000, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA) 以减少低分子量的氧化氮代谢物。

[0066] 储存的鼠 RBC 中的生化，血液学和形态改变

[0067] 测定 (ABL800FLEX, Radiometer, Westlake, OH) FRBC 和 SRBC 中的血气张力 (PCO₂ 和 PO₂)，pH，以及标准碱过剩 (SBE)。FRBC 和 SRBC 中的电介质浓度 (钠，钾，钙，氯化物，HCO₃⁻)

和乳酸盐也进行了测定 (Critical Care Xpress, Nova Biomedical, Waltham, MA)。

[0068] 为确定上清液中的 Hb 水平, 在 4℃ 下, 将 FRBC 或 SRBC, 以 1700g 离心 8min, 用 QuantiChromHb 分析试剂盒 (BioAssaySystems, Hayward, CA) 测定上清液 Hb 水平。利用下述标准公式计算溶血 (%) : 溶血 (%) = [上清液 Hb × (1-% Hct)] / 总 Hb × 100 (参见 Kamel 等人, Blood Transfus2010 ;8:260-6)。

[0069] 为研究储存对于 RBC 形态的影响, 将 FRBC 或 SRBC 涂片并用 Hema3 手工染色系统 (Fisher Diagnostics, Middletown, VA) 染色, 利用配 Plan Fluor60x 干物镜的 Nikon EDIPSE80i 立式显微镜 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) 获得图像。

[0070] 用 Hemox- 分析仪 (TCS Scientific Corp., New Hope, PA) 确定 FRBC 和 SRBC 的氧解离曲线 (ODC) (向 5ml 含有 20 μ l 添加剂 -A (additive-A) 和 10 μ l 消泡剂的 Hemox- 溶液中添加 20 μ l 的 RBC)。P50, 定义为 Hb 为 50% 时的氧分压, 由 ODC 计算。FRBC 和 SRBC 中的 2, 3-DPG 水平利用 2, 3-DPG 试剂盒 (RocheDiagnostics, Mannheim, Germany) 测定。

[0071] 测定鼠 RBC 存活率

[0072] Gilson 等人 (Gilson 等人, Transfusion2009 ;49:1546-53) 报道的 GFP- 标记的 RBC 法, 用于测定经输血的鼠 RBC 存活率。简要地说, 通过心脏穿刺由 UBC-GFP 和 WT 小鼠收集血液到含 CPDA-1 的 1ml 注射器中, 制备含 40% 来自 UBC-GFP 小鼠的 RBC 和 60% 来自 WT 小鼠的 RBC 的血液混合物, 减少白细胞, 离心, 于 4℃ 下储存 <24 小时 (FRBC), 和 2 周 (SRBC)。用含有 GFP- 标记的 RBC 的 100 μ L FRBC 或 SRBC, 通过尾静脉, 向 WT 小鼠输血。在输血 10min, 30min, 1 小时, 24 小时, 和 8 天后, 从后眼窝获取血样, 收集到肝素化的玻璃毛细管中。GFP- 阳性 RBC 的百分比通过正向散射 / 侧向散射 (FSC/SSC) 在 5Laser LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA) 上确定。在不同的获取天数通过 Sphero 彩虹荧光颗粒 (Spherotech Inc., Lake Forest, IL) 将流式细胞仪校准到相同的设置。用输血 24 小时后测定的 GFP- 阳性 RBC 的百分数除以 0 时刻 GFP- 阳性 RBC 的百分数, 计算输血 24 小时后的 RBC 存活率 (%)。根据第 10 分钟, 第 30 分钟和 1 小时的数据, 由线性回归外推 0 时刻的荧光。

[0073] 输血 2 小时后的生化分析

[0074] FRBC 或 SRBC 输血后, 在第 2 小时腹膜内注射戊巴比妥 (200mg/kg)。通过心脏穿刺由每只小鼠收集约 1ml 血液到肝素化的注射器中, 在 4℃ 下, 4000rpm 离心 8 分钟。获得肝素化的血浆, 以进行血液化学、白介素-6 (IL-6)、触珠蛋白 (Hp), 和血红素结合蛋白 (Hx) 水平的测定。获取血清以测定铁水平。肝脏样品在液氮中速冻, 用于接下来确定血红素加氧酶-1 (HO-1)。

[0075] 为比较 FRBC 或 SRBC 输血的急性生化影响, 在输血后 10 分钟, 腹膜内注射戊巴比妥 (200mg/kg), 将 12 只 WT 和 12 只 db/db 小鼠处死。通过心脏穿刺获得全血, 以进行血液化学测定。

[0076] 血清铁水平测定

[0077] 利用 Iron/Unsaturated Iron Binding Capacity Assay (Thermo Fisher Scientific, Middletown, VA) 确定血清铁水平。

[0078] 血浆 IL-6, Hp, 和 Hx 水平的测定

[0079] 利用 Duoset 小鼠 IL-6 Elisa 试剂盒 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 确定血

浆 IL-6 水平。分别利用小鼠 Hp 和 Hx Elisa 试剂盒 (Life Diagnostics, Inc., West Chester, PA) 测定血浆 Hp 和 Hx 水平。

[0080] 组织 mRNA 水平的定量

[0081] 利用 Trizol 试剂 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 从鼠肝脏提取总 mRNA。通过反转录酶反应 (MMLV-RT, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 合成 cDNA。转录物的实时扩增, 以 SYBR 法利用 Eppendorf Mastercycler Realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany) 进行。靶转录物的相对表达归一化至 18S rRNA 的水平, 并利用相对 CT 方法进行分析。

[0082] FRBC 或 SBRC 输血后在清醒的 WT, 给予 HFD 的 WT, 和 db/db 小鼠中进行非侵入性血压测定

[0083] FRBC, SRBC, 洗过的 FRBC 和 SRBC, 来自 FRBC 和 SRBC 的上清液, 和经氧化的来自 SRBC 的上清液, 经尾静脉输入 (transfused) 到 (总输入体积是预估血容量的 10%) WT, 给予 HFD 的 WT, 或 db/db 小鼠。利用非侵入性血压系统 (XBP1000, Kent Scientific, Torrington, CT) (Yu 等人, Circulation 2008; 117:1982-90; Yu 等人, Anesthesiology 2010; 112:586-94) 测定收缩压。全部的尾静脉注射在 1 分多钟 (over one minute) 的时间内进行。一组 db/db 小鼠接受了 SRBC, 并且从输血前 10 分钟到输血后 2 小时, 利用 Yu 等人, Circulation 2008; 117:1982-90 中所描述的方法, 呼吸空气中的 80ppm 氧化氮 (Medical-Technical Gases, Inc., Medford, MA)。

[0084] 在经麻醉的小鼠中侵入性的血流动力测定

[0085] 侵入性的血流动力测定, 如 Yu 等人, Anesthesiology 2010; 112:586-94 所描述的进行。在基线, 和用 FRBC, SRBC, 来自 FRBC 的上清液, 或来自 SRBC 的上清液输血 5 分钟 (预估血容量的 10%, 以 75 μ L/min 的速度在 3 分多钟 (over 3min) 的时间内通过置于右颈静脉中的单独的导管输入) 后测定左心室压力-容积环和心输出量 (CO) 以及平均动脉血压 (MAP)。

[0086] 统计分析

[0087] 所有的数值以平均值 $\pm$ SEM 表示。数据通过带有 Tukey 修正的单向 ANOVA (SigmaStat 3.0.1; Systat Software, Inc., San Jose, CA) 进行分析。在清醒的小鼠中的收缩压测定通过重复测定带有相互作用的双向 ANOVA 进行分析。概率值低于 0.05 被认定为显著。

[0088] 储存的鼠血液的表征

[0089] 储存 ≤ 24 小时的 FRBC 与储存 2 周的 SRBC 进行比较。在 SRBC 中, pH, PO_2 , HCO_3^- , 和 SBE 显著降低, 然而, SRBC 中的 PCO_2 , 和乳酸盐比 FRBC 中的高 (表 1)。此外, SRBC 中的钠水平较 FRBC 中的低, 而 SRBC 中的钾水平比 FRBC 中的高。SRBC 中的溶血水平显著高于 FRBC 中的溶血水平。类似地, SRBC 中的上清液 Hb 水平比 FRBC 中的高。在 FRBC 和 SRBC 的上清液中测定的 MetHb 水平不到上清液 Hb 的 1%。

[0090] 表 1. FRBC (≤ 24 h) 和 SRBC (2 周) 中的血液化学比较

[0091]

	FRBC (n = 5)	SRBC (n = 5)

pH	7.06 ± 0.03	$6.53 \pm 0.03^*$
PCO ₂ (mmHg)	16 ± 1	$35 \pm 4^*$
PO ₂ (mmHg)	217 ± 9	$140 \pm 12^*$
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	4 ± 0	$3 \pm 0^*$
SBE (mmol/L)	-24 ± 0	$-30 \pm 1^*$
Na ⁺ (mmol/L)	152 ± 0	$137 \pm 1^*$
K ⁺ (mmol/L)	3.7 ± 0.4	$34.4 \pm 2.6^*$
Cl ⁻ (mmol/L)	121 ± 1	120 ± 1
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	0.06 ± 0	0.05 ± 0
乳酸盐 (mmol/L)	2.2 ± 0.3	$18.3 \pm 2.0^*$
Hb (g/dl)	14.1 ± 1.6	12.9 ± 0.2
上清液 Hb (mg/dl)	64 ± 6	$571 \pm 51^*$
溶血 (%)	0.1 ± 0	$0.8 \pm 0^*$

[0092] 数值是平均值 $\pm$ SEM。FRBC, 新鲜红细胞 ;SRBC, 储存的红细胞 ;SBE, 标准的碱过剩 ;Hb, 血红蛋白。

[0093] * $P < 0.01$, 相对于 FRBC 的差异

[0094] 在 FRBC 中, 细胞形态以盘状细胞为主 (图 1A, 上部的图)。储存 2 周后, 大部分的 RBC 形状异常 (例如棘红细胞或棘球状红细胞, 如图 1A, 下部的图中箭头所指)。在鼠 RBC 中观察到储存诱导的形态改变, 类似于储存的人 RBC 的有关报道 (Makley 等人, Shock2010 ; 34:40-5)。

[0095] RBC 的主要功能是运送氧 ;因此对储存后的 RBC 的 Hb- 氧亲和力改变进行了测定。与 FRBC 相比, SRBC 的 ODC 明显左移 (分别为, 21 ± 1 对 43 ± 0 mmHg, 图 1B, $n = 5$, $P < 0.01$)。红细胞 2, 3-DPG 水平由 FRBC 中的 3.8 ± 0.1 mmol/L 降低至 SRBC 中的 0.2 ± 0.1 mmol/L (图 1C)。由于小鼠中氧亲和力通过 2, 3-DPG 对 Hb 的变构抑制结合效应调整, 与在经储存的人 RBC 中所观察到的情况类似地, 储存使 2, 3-DPG 减少, 显著地增强了 (augmented) 氧亲和力。这些结果显示鼠 RBC 在 2 周的储存过程中发生了生化, 血液学, 和形态的改变。

[0096] 同基因的输血后储存持续时间对 RBC 存活率的影响

[0097] 为追踪输入的 FRBC 和 SRBC 的存活率, 研究了储存对 GFP- 标记的 RBC 的影响。输血 GFP- 标记的 FRBC 24 小时后, GFP- 标记的红细胞部分是输入后 0 时刻计算出的 GFP- 标记红细胞的 $99 \pm 3\%$ (图 1D)。输血 GFP- 标记的 SRBC 24 小时后, GFP- 标记的红细胞部分是输入后 0 时刻计算出的 GFP- 标记红细胞的 $68 \pm 1\%$ (图 1D)。从输血后 24 小时开始, 在

FRBC 和 SRBC 中, GFP- 标记的红细胞的减少速率相似。这些结果与 Gilson 及其同事所报道的一致 (Gilson 等人, Transfusion 2009; 49: 1546-53), 并且显示储存的血液中的储存性损伤对红细胞具有各种各样的 (heterogeneous) 影响。

[0098] 在 WT、给予 HFD 的 WT、和 db/db 小鼠中, FRBC 和 SRBC 输血对 Hct, Hb 和血浆 Hb 的影响

[0099] 在输血 FRBC 或 SRBC 后 10 分钟 (WT 和 db/db 小鼠) 和 2 小时 (WT、给予 HFD 的 WT、和 db/db 小鼠), 从小鼠抽取动脉血样品。在所研究的所有小鼠中, 输血后 10 分钟和 2 小时, 输血 FRBC 或是 SRBC 均提高 Hct 和总 Hb 水平。在所研究的各组小鼠中, 输血 SRBC 而非 FRBC 后 10 分钟和 2 小时, 血浆 Hb 水平升高。这些结果显示输血 SRBC 后血浆 Hb 水平的升高很可能是由于在储存过程中和输血后 Hb 的释放。

[0100] 输血后血清铁水平

[0101] 由于 SRBC 具有缩短的寿命, 很快地从循环中被清除, 它们可以从其血红素贡献铁, 以增强反应性氧种类 (oxygen species) 的生成。在输血 FRBC 或 SRBC 2 小时后, 测定了小鼠中的血清铁水平 (图 2)。输血 SRBC 到 WT、给予 HFD 的 WT、和 db/db 小鼠中 2 小时后, 血清铁水平更高, 但是输血 FRBC 后的情况不是这样。这些结果表明, 输血 SRBC 比输血 FRBC 更多地升高血清铁。

[0102] 输血后的炎症

[0103] 为了研究输血 FRBC 或 SRBC 后, 是否在小鼠中诱导系统性炎症应答 (systemic inflammatory response), 输血 2 小时后, 测定了从 WT, 给予 HFD 的 WT、和 db/db 小鼠收集的的血浆样品中的 IL-6 水平 (图 3A)。输血 SRBC 而非 FRBC 提升 WT、给予 HFD 的 WT、和 db/db 小鼠中的血浆 IL-6 水平 ($P < 0.05$)。由于储存细胞中约 97% 的白细胞 (WBC) 已通过白细胞减少处理去除了, 且在输入样品中没有检测到内毒素 (例如 LPS), 升高的 IL-6 水平很可能是由于输血 SRBC 所造成的。

[0104] 输血后的血浆 Hp, Hx 和肝 HO-1

[0105] 针对胞外 Hb 的主要保护机制通常称为“抗氧化蛋白”, 例如 Hp, Hx 和 HO-1。胞外 Hb 与循环中的 Hp 结合。Hb-Hp 复合物的清除发生在循环和肝脏 (巨嗜细胞) 中, 最终经由 HO-1 导致血红素破裂 (Buehler 等人, Antioxid Redox Signal 2010; 14: 1713-28)。Hx 是主要的血浆血红素载体, 通过将血红素运送至肝脏参与血红素的清除 (Gutteridge 等人, Biochem J 1988; 256: 861-5)。HO-1 是可诱导的血红素降解同种型, 并针对炎症损伤起到保护作用 (Immenschuh 等人, Curr Drug Targets 2010; 11: 1541-50)。

[0106] 在测定了 SRBC 输血后升高水平的血浆 Hb 之后, 研究了输血 FRBC 和 SRBC 对负责清理血浆 Hb 的机制的影响。在输血 FRBC 或者 SRBC 后 2 小时, 血浆 Hp 水平下降 (图 3B)。在输血 SRBC 2 小时的时候, 给予 HFD 的 WT 和 db/db 小鼠中血浆 Hx 水平下降, 但在 WT 小鼠中情况不是这样 (图 3C)。输血 FRBC 并不改变 Hx 水平。输血后 2 小时, 输血 SRBC 的 WT、给予 HFD 的 WT、和 db/db 小鼠中肝 HO-1 mRNA 水平更高, 但是在输血 FRBC 后情况不是这样 (图 4, $P < 0.05$)。这些结果显示由于小鼠中基线的 Hp 水平很低, 响应 FRBC 输血释放的少量 Hb 足以显著地降低 Hp 水平, 而 Hx 水平更高并仅在输血后 2 小时适当减少。输血 SRBC 诱导的肝 HO-1 mRNA 水平是由 SRBC 释放的、增加的血红素造成的。

[0107] 输血 FRBC 和 SRBC 的血流动力影响

[0108] 输血含低于 1% Hb 四聚体的血液替代品可产生全身性血管收缩效果 (Yu 等人, *Anesthesiology*2010 ;112:586-94)。为了检测输血 FRBC 和 SRBC 对收缩压的作用, 通过尾静脉将 FRBC 或 SRBC (以 10% 血容注射) 施用于清醒的小鼠。输血 FRBC 或是 SRBC 并没有改变清醒的 WT 小鼠中的收缩压 (图 5A)。具有内皮功能不良的小鼠 (例如给予 HFD 的 WT 或 db/db 小鼠) 对 Hb 四聚体的引起的血管收缩作用更加敏感 (参见 Yu 等人, *Anesthesiology*2010 ;112:586-94)。在清醒的、给予 HFD 的 WT 小鼠中, 输血 FRBC 或是 SRBC 并没有改变收缩压 (图 5B)。相比之下, 输血 SRBC 而非 FRBC 使清醒的 db/db 小鼠中收缩压升高 (从基线的 111 ± 2 mmHg 到第 10 分钟的 127 ± 3 mmHg, $P < 0.05$, 图 5C)。由于氧化氮呼吸防止小鼠中由于四聚体 Hb 的输注引起的全身性血管收缩 (Yu 等人, *Circulation*2008 ;117:1982-90), 对吸入氧化氮防止向 db/db 小鼠输入 SRBC 的血管收缩作用的能力进行了研究。在输血前 10 分钟呼吸 80ppm 的氧化氮, 并持续 2 小时, 完全阻止了, 将 SRBC 输血到 db/db 诱导的系统性高血压 (图 5C)。

[0109] 为研究是 SRBC 中的哪种组分负责其血管收缩作用, 将由 SRBC 或洗过的 SRBC 获得的上清液输入到清醒的 db/db 小鼠中。输入 SRBC 的上清液 (db/db 小鼠 38 预估血体积的 10% 或 250 μ L, 相当于通过输入 250 μ L 的 SRBC 获得的上清液体积的 4 倍) 使全身血压升高 (由 112 ± 4 到 132 ± 4 mmHg, $P < 0.05$), 其持续了 40 分钟 (图 5D 和 5E)。

[0110] 为了使洗涤引起的溶血最小化, 将 SRBC 悬浮于 1.5g% 氯化钠中。将洗过的 SRBC 输血到 db/db 小鼠没有使全身血压升高 (图 5E)。

[0111] 在经麻醉的 db/db 小鼠中获得的侵入性的血流动力测定确认了在清醒的 db/db 小鼠中的发现。输血 SRBC 或来自 SRBC 的上清液升高左心室 (LV) 收缩期末压力 (LVESP, 图 6A) 以及体循环血管阻力指标 (SVRI, 图 6B), 而输血 FRBC 或来自 FRBC 的上清液不改变这些血流动力参数。在来自 SRBC 的上清液通过暴露于氧化氮气体被氧化 (由此将亚铁 Hb 转化成高铁 Hb), 随后透析去除低分子量的组分 (例如亚硝酸盐和硝酸盐) 之后, 将其输血到清醒的 db/db 小鼠中, 没有引起其全身性血压升高 (图 5D)。这些血流动力结果表明, 输注来自 SRBC 的上清液引起全身性血管收缩, 其很可能是由于在储存的 2 周时间里上清液所释放的 Hb 的输注造成的 (Donadee 等人, *Circulation*2011 ;124:465-76; Yu 等人, *Anesthesiology*2010 ;112:586-94)。

[0112] 实施例 2: 输入储存的血液的小羊羔中的肺高血压

[0113] 血液产品的加工

[0114] 全部试验均得到位于 Massachusetts General Hospital, Boston, MA 的动物护理研究委员会的许可。对 36 只 3- 到 4- 月大的 Polypay 小羊羔 (New England Ovis, Dover, NH), 重 32 ± 2 kg, 进行了研究 (Hulet 等人, *J Anim Sci*1984 ;58:15-24)。肌肉注射氯胺酮 HCl (15mg/kg; Hospira, Inc., Lake Forest, IL) 后, 由外部颈静脉提取血液 (450ml), 置于包含柠檬酸盐 - 磷酸盐 - 右旋糖溶液的 Double Blood-Pack Unit (Fenwal, Inc., Lake Zurich, IL) 中。利用整合的 RS2000 白细胞减少滤器, 在室温下减少血液中的白细胞。通过离心 (于 24°C 下, 600g, 10 分钟) 将红细胞从血浆中分离, 在含盐、腺嘌呤、葡萄糖和甘露醇的附加溶液 (addictive solution) (110ml) 中 (AS-1, Adsol Solution, Fenwal, Inc.), 于 4°C 下, 储存 2 天或 40 天。

[0115] 羊红细胞的生物素化

[0116] 对 8 只小羊羔中,输入的浓缩的红细胞 (PRBCs) 的体内存活率利用 Mock 等人,Transfusion1999 ;39:156-6 所述方法的修饰形式进行了测定。在 AS-1 中储存了 2 天 ($n = 4$) 或 40 天 ($n = 4$) 后,从血液储存袋中提取 PRBC(60ml),通过 4℃ 下 600g,离心 15 分钟与上清液分离。上清液在 4℃ 下储存。将颗粒化的 PRBC 重悬于洗涤溶液 (60ml ;氯化钠 0.87%,碳酸氢钠 0.2%,右旋糖 0.2%和磷酸钠 0.1% ;Hospira, Inc.)。重复离心,弃去上清液。将洗过的 PRBC 重悬于含硫代 N- 羟基琥珀酰亚胺 - 维生素 ($10 \mu\text{g/ml}$;Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) 的洗涤溶液 (60ml) 中,在室温下温育 40 分钟。为去除未结合的硫代 N- 羟基琥珀酰亚胺 - 维生素,将 PRBC 用如上所述的洗涤溶液洗两次。在最后的洗涤步骤之后,将 PRBC 重悬于之前储存的上清液中。

[0117] 生物素化的 PRBC 经由置于外部颈静脉内的 16-G Angiocath (BD Infusion Therapy Systems, Inc., Sandy, UT) 输入绵羊供体。在 15 分钟,30 分钟,60 分钟,24 小时和 7 天后,提取静脉血样品到肝素化的 4-ml Vacutainers (BD, Franklin Lakes, NJ) 中。

[0118] 为了评估生物素化的 PRBC 的存活率,将血液样品 ($50 \mu\text{l}$) 与异硫氰胺荧光素 - 标记的链霉抗生物素蛋白 ($250 \mu\text{l}$ 含 $20 \mu\text{g/ml}$ 链霉抗生物素蛋白 - 异硫氰胺荧光素的洗涤溶液 ;Biolegend, San Diego, CA) 在室温下温育 20 分钟。在 LSRFortessa 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上正向对侧向散射 (FSC/SSC) 中检测异硫氰胺荧光素 - 标记的 PRBC。Sphero 彩虹荧光颗粒 ($3.0\text{--}3.4 \mu\text{m}$;Spherotech, Inc., Lake Forest, IL) 用于校正流式细胞仪在不同的获取日的设置。将 0 时刻的生物素化 PRBC 数量外延折合成 100%。总共 100,000 个事件中,计算输血后获得的血液样品中生物素化的细胞的百分数相对于通过计算所得的在 0 小时的时候出现的生物素化的细胞百分数的比率。

[0119] 动物准备和血流动力监控

[0120] 在 28 只小羊羔中进行侵入性的血流动力测定。经由面罩呼吸氧中的 5% 异氟烷进行麻醉。如之前所述的 (Yu 等人,Anesthesiology2010 ;112:586-94),气管插管后,动物经历气管造口,并通过机械方式安置颈动脉和肺动脉导管。在大动物束缚单元 (large-animal restraint unit) (Lomir, Malone, NY) 中,全身麻醉的两小时恢复期过后,利用 Gould6600 放大器系统 (Gould Electronics, Inc., Eastlake, OH) 连续监控平均动脉压 (MAP),肺动脉平均压 (PAP),和中央静脉压。每 10-30 分钟间歇性地测定肺毛细血管楔压 (PCWP) 和心率。静脉内快速浓注 (bolus-injection) 10ml 冰冷盐溶液后,经热稀释 (thermal dilution) 评估心输出量,以三次测定的平均数计。使用标准公式计算体循环血管阻力指标和肺血管阻力指标 (PVRI) 以及心脏指数。血流动力数据收集至输血结束后 4 小时。

[0121] 在清醒的小羊羔中储存的 PRBC 输血对血流动力的影响

[0122] 对 6 组清醒的小羊羔进行了研究。所有的动物接受了 PRBC 自体输血,相当于它们各自血容量的 14%,假设体重的 6.5% 是血容量 (Hansard 等人,Proc Soc Exp Biol Med1956 ;91:31-4)。将 PRBC 加温至 37℃ 在 30 多分钟的时间内输入,小羊羔同时经由气管造口自发地呼吸,吸入氧浓度 (FiO_2) 0.25。一组 ($n = 5$) 小羊羔接受了在输血前经过处理并储存了 2 天的 PRBC (新鲜 PRBC)。第二组小羊羔 ($n = 6$) 输入了在输血前储存了 40 天的 PRBC (储存的 PRBCs)。第三组 ($n = 4$) 小羊羔在输血储存的 PRBC 的过程中,以 0.25 的 FiO_2 呼吸 80ppm 的氧化氮 (Medical-Technical Gases, Medford, MA)。氧化氮呼吸在输血结束后持续 30 分钟。

[0123] 内皮功能不良羔羊模型中输入储存的 PRBC 对血流动力的作用

[0124] 在静脉内输注 NOS 抑制剂, N^G-硝基-L-精氨酸甲基-酯 (L-NAME, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 后, 对另外三组小羊羔进行了研究。25mg/kg 浓注 (a bolus of) L-NAME 在输血前 1 小时进行 IV 注射 (Weimann 等人, Anesthesiology 2000; 92:1702-12)。相伴随地, 开始输注 5mg/kg/h L-NAME 并在整个研究过程中持续进行。通过评估静脉内快速浓注乙酰胆碱 (Sigma-Aldrich) 诱导的全身血管舒张, 在施用 L-NAME 之前以及开始之后的 45 分钟和 5 小时证实了氧化氮所产生的部分抑制。也通过在每个实验的末尾静脉内注射硝普酸钠 (Sigma-Aldrich) 对与 NOS 无关的全身血管舒张进行了评估。L-NAME 处理后, 第四组小羊羔 (n = 4) 接受了新鲜 PRBC, 第五组 (n = 5) 接受了储存的 PRBC。在第六组 (n = 4) 中, L-NAME 注射后, 在输血储存的 PRBC 前 10 分钟开始以 0.25 的 FiO₂ 吸入 80ppm 氧化氮。氧化氮呼吸持续输血全过程以及输注结束后的 30 分钟。

[0125] 血样的生化分析

[0126] 在输血前以及输血后 30 分钟, 2 小时和 4 小时立即抽取动脉和静脉血样。从输血储存袋获取的样品 (10ml) 在输注血后立即处理以防止细菌感染。血气张力和 pH 用 ABL800Flex 血气分析仪 (Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark) 进行分析。

[0127] 血浆和上清液中的无细胞血红蛋白水平利用 QuantiChrom 血红蛋白分析试剂盒 (BioAssay Systems, Hayward, CA) 进行测定。将全血在毛细管 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 中以 400g 离心 10 分钟, 测定血细胞比容。根据下述公式计算溶血 (以百分比): 无细胞血红蛋白 [g/dl] • (100 - 血细胞比容 [%]) / 总血红蛋白 [g/dl]。

[0128] 血浆和上清液中的硝酸盐和亚硝酸盐浓度利用硝酸盐 / 亚硝酸盐荧光分析试剂盒 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) 测定。血浆促血栓素 B₂ (TXB₂) 水平用 EIA 试剂盒 (Cayman Chemical Company) 确定。2, 3-二磷酸甘油酸 (2, 3-DPG) 水平利用 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) 的试剂盒测定。血浆白介素 -6 (IL-6) 水平利用 Thermo Fisher Scientific 的牛 (bovine) 试剂盒测定。触珠蛋白 (Hp) 浓度利用牛 Hp ELISA 试剂盒 (Immunology Consultants Lab, Inc., Newberg, OR) 评估。

[0129] 储存了 2 天或 40 天的白细胞减少的血液氧解离曲线利用 Hemox- 分析仪 (TSC Scientific Corp., New Hope, PA) 确定。血红蛋白半饱和时的血气张力 (P₅₀) 由所述氧解离曲线计算。

[0130] 信使 RNA (mRNA) 水平定量

[0131] 在输血后 4 小时, 在异氟烷麻醉期间通过静脉内注射 50ml 的 20% 氯化钾溶液使动物安乐死。由肺和肝脏获取组织样品, 在液氮中速冻, 于 -80°C 保存以待进一步分析。

[0132] 利用 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 从组织中提取 RNA, 利用 MMLV-RT (Invitrogen) 合成互补 DNA。利用 Mastercycler ep Realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany) 检测转录物的实时扩增。靶转录物的相对表达归一化至 18S 调节 RNA 的水平。下述引物对是用于检测, 编码 IL-6 的引物对 CAGAAAATAAGCTGAACTTCCA, ATGTCAGTGTGTGTG GCTGGAG; 编码肿瘤坏死因子-α 的引物对, GGCTCTCCTGTCTCCCGT, GTTGGCTACAACGTGGGC; 和编码髓过氧化物酶的引物对, GCTGAGGCGGGACACAACCC, CCCAGTTCCGTTTCCGGGGC。

[0133] 统计分析

[0134] 所有数据以平均值 ± SD 表示。利用 GraphPad Prism5 软件

(GraphPadSoftware, Inc., La Jolla, CA) 进行统计分析。为了比较新鲜的和 AS-1- 存储后的储存的 PRBC, PRBC- 存活率试验, mRNA 水平比较, 应用双尾 (two-tailed)、双样品、独立 t- 试验比较两组之间的差异, 利用 Bonferroni 调整对多重比较进行校正。对于血流动力实验, 利用带有重复测定的双向 ANOVA 比较不同时间点的组间差异。但是, 当时间和条件之间的相互作用 P 值显著时, 利用带有 post-hoc Bonferroni- 调整的比较试验的单向 ANOVA 在每个单个的时间点进行比较。利用双尾配对 t- 试验进行组内比较。P 值 <0.05 被认为是显著。

[0135] 白细胞减少的且 AS-1- 储存的羊羔 PRBC 的化学特性

[0136] 于 AS-1 中储存 2 天或 40 天后, 对白细胞减少的 PRBC 和它们的上清液的化学特性进行了分析。新鲜 PRBC 上清液中的无细胞血红蛋白浓度是 $41 \pm 13 \text{ mg/dl}$, 得到计算溶血水平 $0.10 \pm 0.04\%$ 。在储存的 PRBC 上清液中, 无细胞血红蛋白浓度和溶血水平比新鲜 PRBC 上清液中的高 (分别为 $148 \pm 20 \text{ mg/dl}$ 和 $0.50 \pm 0.05\%$; $P < 0.001$, 对新鲜 PRBC 两参数的值差异) 但是, 所述的水平保持在 FDA (Food and Drug Administration) 对于储存的人血液所要求的值以下。

[0137] 储存的 PRBC 上清液中的钾和乳酸盐浓度比新鲜 PRBC 上清液中的高, 而储存的 PRBC 上清液中的 pH 比新鲜 PRBC 上清液中的低。储存的 PRBC 中的 PO_2 高于新鲜 PRBC 中的 PO_2 。如之前所述的 (Bunn, Science1971 ;172:1049-5), 在羊红细胞中测定的 2,3-DPG 水平很低。红细胞内的 2,3-DPG 水平在新鲜的和储存的 PRBC 之间没有差异。所述的 P_{50} 在新鲜的和储存的 PRBC 之间没有差异。白细胞减少后, 在 PRBC 中不能检测到白细胞。因而, 与之前对人 PRBC 储存的研究相比, 羊 PRBC 表现出很多在 AS-1 中的类似储存特性。

[0138] 白细胞减少的 AS-1- 储存的羊羔 PRBC 体内存活率

[0139] PRBC 是生物素化的, 在储存 2 天或 40 天后输入。循环中的生物素化 PRBC 存活率曲线如图 7 所示。将新鲜 PRBC 生物素化并输入时, $96 \pm 4\%$ 存活至少 24h, 而在输血后 24 小时, $76 \pm 7\%$ 的储存 PRBC 保持在循环中 ($P = 0.002$, 值差异)。几乎所有的生物素化的储存 PRBC 损失都出现在输血后的第 1 小时, 在输血 1 小时后仅保留有 $77 \pm 2\%$ 。在输血后 1 小时和 24 小时之间, 经标记的新鲜的和储存的 PRBC 循环水平保持稳定 (1 小时后, 储存的 PRBC: $77 \pm 2\%$, 24 小时后 $76 \pm 7\%$, $P = 0.72$; 1 小时后, 新鲜 PRBC: $99 \pm 2\%$, 24 小时后 $96 \pm 4\%$, $P = 0.26$)。输血后一周, 分别有 $80 \pm 8\%$ 和 $54 \pm 4\%$ 的生物素化的新鲜和储存的 PRBC 保持在循环中。因此, 羊 PRBC 在存储和输血后的体内存活率特性与在人 PRBC 中测定的情况类似。

[0140] 清醒的小羊羔中用储存的 PRBC 输血对血流动力的影响

[0141] 储存的 PRBC 输血对 PAP 和 PVRI 的作用与新鲜 PRBC 输血的作用不同 (单向 ANOVA, $P < 0.001$, 对于 PAP 和 $P = 0.02$ 对于 PVRI, 图 8)。新鲜 PRBC 的输血不使任何所测定的血流动力参数与基线相比发生改变。储存的 PRBC 的输血提高 PAP (基线 13 ± 1 对 (versus) $18 \pm 1 \text{ mmHg}$, $P < 0.001$) 和 PVRI (基线 108 ± 19 对 $156 \pm 35 \text{ dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot \text{m}^{-2}$, $P = 0.02$), 在输血结束时两参数均达到峰值 (图 8)。PAP 和 PVRI 在输血结束后 60 分钟回归到基线值 (图 8)。所测定的所有的其他血流动力参数在储存的 PRBC 输血后没有改变。因此, 输血储存的 PRBC 升高小羊羔中的肺部血管压力, 但不升高全身血管压力和阻力 (resistance)。

[0142] L-NAME- 诱导的内皮功能不良羊羔模型中储存的 PRBC 输血对血流动力的作用

[0143] 为研究是否内皮功能不良改变应答储存的 PRBC 输血的肺部血管收缩,用 L-NAME 对小羊羔进行预处理。一剂 L-NAME 输注引起 NOS 活性的部分抑制,反映为乙酰胆碱输注对诱导全身血管舒张的能力下降 50%。如所预计的,施用 L-NAME 没有改变血管扩张剂对静脉内浓注 (bolus infusion) 硝普酸钠的应答。输注 L-NAME 提高 MAP, PAP, 中心静脉压, 和 PCWP, 以及全身和肺部的血管阻力指标, 而心脏指数和心率均降低 (图 9)。

[0144] 输血新鲜 PRBC 没有改变任何测定的血流动力参数。相比之下, 在经 L-NAME- 处理的清醒的小羊羔中, 输血储存的 PRBC 升高 PAP (基线 17 ± 1 对 $26 \pm 4 \text{ mmHg}$, $P < 0.001$), PCWP (基线 7 ± 1 对 $10 \pm 2 \text{ mmHg}$, $P = 0.02$), 和 PVRI (基线 170 ± 34 对 $312 \pm 85 \text{ dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot \text{m}^{-2}$, $P = 0.009$) (图 9)。与不存在 L-NAME 相比, 存在 L-NAME 时由输入储存的 PRBC 诱导的 PAP 和 PVRI 更高 (ΔPAP , 无 L-NAME $5 \pm 1 \text{ mmHg}$ 与 ΔPAP 有 L-NAME $9 \pm 4 \text{ mmHg}$ 不同, $P = 0.03$; ΔPVRI 无 L-NAME $47 \pm 33 \text{ dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot \text{m}^{-2}$ 与 ΔPVRI 有 L-NAME $142 \pm 53 \text{ dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot \text{m}^{-2}$ 不同, $P = 0.006$)。MAP 在组间没有统计学差异 (单向 ANOVA, $P = 0.09$)。因此, NOS 的部分抑制强化了储存的 PRBC 对肺部的、非体循环的血管收缩作用。

[0145] 储存的 PRBC 输血过程中并行吸入氧化氮

[0146] 吸入氧化氮阻止 HBOC-201 输注过程中的肺部血管收缩 (Yu 等人, *Anesthesiology* 2009 ;110:113-2)。为了检测是否呼吸氧化氮阻止响应输血储存的 PRBC 的肺部血管收缩, 在输血的同时以及结束后的 30 分钟施用 80ppm 氧化氮。在小羊羔中, 其未经 L-NAME 预处理, 呼吸氧化氮阻止与输血 PRBC 相关联的 PAP (基线 12 ± 1 对 $13 \pm 1 \text{ mmHg}$, $P = 0.13$) 和 PVRI (基线 107 ± 14 对 $105 \pm 22 \text{ dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot \text{m}^{-2}$, $P = 0.87$) 的升高 (图 8)。

[0147] 用 L-NAME 预处理的小羊羔中, 同时吸入 80ppm 的氧化氮将 PAP 和 PVRI 降低至基线, 并阻止在用储存的 PRBC 输血时所观察到的肺部血管收缩。在输血结束后 30 分钟停止呼吸氧化氮之后, PAP 和 PVRI 逐渐上升, 氧化氮呼吸终止后 60 分钟回复到输血前的水平 (图 9A 和 9C)。如所预期的, 吸入氧化氮并没有改变 MAP (单向 ANOVA, $P = 0.89$)。因此, 小羊羔中氧化氮呼吸阻止与输血储存的 PRBC 相关联的肺部血管收缩。

[0148] 由输入储存的 PRBC 引起的肺高血压可能机制

[0149] 为阐明可能负责输血储存的 PRBC 后所观察到的肺部血管收缩的机制, 测定了输血新鲜的和储存的 PRBC 之前和之后的羊血浆中无细胞血红蛋白浓度。输血新鲜 PRBC, 不改变无细胞血红蛋白水平 (图 10)。相比之下, 输血储存的 PRBC, 在 60 分钟时无细胞血红蛋白水平升高, 并保持升高直至 4.5 小时。呼吸氧化氮并不改变输入储存的 PRBC 使无细胞血红蛋白升高的能力。

[0150] 与人相比, 绵羊具有低血红蛋白-净化剂 Hp 血浆浓度 (Kallapur 等人, *Am J Respir Crit Care Med* 2009 ;179:955-61)。输血新鲜的或是储存的 PRBC 之后, Hp 血浆水平降低。但是, 在输血储存的 PRBC 之后, 测定到更显著的 Hp 降低 (双向 ANOVA 经时比较新鲜 PRBC 与储存的 PRBC, $P = 0.002$)。

[0151] 促血栓素 B_2 (TXB₂) 是强效血管收缩剂, 促血栓素 A₂ 的稳定代谢产物。由肺部的血管内巨嗜细胞释放的促血栓素代谢产物可以诱导明显的肺高血压 (Staub, *Annu Rev Physiol* 1994 ;56:47-67)。为了确定由输入储存的 PRBC 引起的 PAP 和肺部的血管阻力升高

是否是由促血栓素代谢产物的血浆浓度升高所引起,测定了输血新鲜的和储存的 PRBC 之前和之后的 TXB₂ 水平。新鲜的或是储存的 PRBC 输血之前以及之后 30 分钟, TXB₂ 血浆浓度没有区别,为促血栓素不可能负责与输血储存的 PRBC 相关联的肺高血压提供了证据。

[0152] 亚硝酸盐可由亚硝酸盐还原酶转化成氧化氮 (Weitzberg 等人, *Anesthesiology* 2010 ;113:1460-75)。输血后血浆亚硝酸盐耗尽可能因此与输血储存的 PRBC 相关联。为检测是否输血 PRBC 导致血浆氧化氮代谢物改变,测定了输血新鲜的和储存的 PRBC 之前和之后的血浆硝酸盐和亚硝酸盐水平。血浆硝酸盐和亚硝酸盐水平在输血新鲜的和储存的 PRBC 之前和之后没有差异 (双向 ANOVA, $P = 0.37$ 对硝酸盐, $P = 0.21$ 对于亚硝酸盐;图 11)。

[0153] 输注白细胞减少的和 AS-1 存储的羊羔 PRBC 不诱导全身性炎症

[0154] 为确定输血自体 PRBC 是否导致炎症应答,测定了输血新鲜的和储存的 PRBC 之前和之后,血浆 IL-6 浓度,以及肺和肝中编码 IL-6、肿瘤坏死因子- α 、和髓过氧化物酶的 mRNA 水平。输入新鲜的或储存的 PRBC 不改变血浆 IL-6 水平,也不改变编码炎症介质的 mRNA 的水平。输血新鲜的和储存的 PRBC 之前和之后测定的白细胞浓度没有差异。由此,在该羊羔模型中,输注自体和白细胞减少的、新鲜的或储存的 PRBC,在输血后 4 小时内不诱导炎症应答。

[0155] 实施例 3: 氧化氮处理红细胞之后的高铁血红蛋白转化

[0156] 将含添加人血红蛋白的血浆加入到 adsol- 保鲜的 (preserved) 的人红细胞中。所述的红细胞泵送 (以 5, 7.5 的流速, 10ml/min) 通过膜气体交换器 (Living Systems Instrumentation Inc., St. Albans, Vermont), 其使得所述细胞暴露于 (单程通过所述的气体交换器) 氮气中的 2600ppm 氧化氮气体。所述的氧化氮处理导致大约 50% 的上清液氧血红蛋白转化成高铁血红蛋白 (图 12)。但是,由于人红细胞含大量的高铁血红蛋白还原酶,所述的氧化氮处理仅引起少量比例的人红细胞血红蛋白转化成高铁血红蛋白 (图 13)。

[0157] 实施例 4: 用释放氧化氮的化合物处理储存的红细胞

[0158] 人储存的红细胞 (储存, 46 天) 用 MAHMA/NO ((Z)-1-[N- 甲基 -N-[6-(N- 甲基铵基己基) 氨基] 二氮烯 -1- 鎓 -1, 2- 二氧化物) 处理。用 0.5mM MAHMA/NO 处理, 导致 99% 的上清液血红蛋白被氧化成高铁血红蛋白 (图 14A)。相比之下,只有 15% 的红细胞血红蛋白被所述处理氧化 (图 14A)。此外,在添加了 MAHMA/NO 之后没有另外的人储存的红细胞溶血发生 (图 14B)。

[0159] 用鼠储存的红细胞 (存储, 14 天) 进行的研究显示,提高被氧化的上清液量需要更大量的 MAHMA/NO (1mM MAHMA/NO 导致 70% 上清液高铁血红蛋白;图 14A)。这可能是由于在鼠红细胞存储中所观察到的更高溶血水平所导致。在基线水平,溶血比在人储存的红细胞中的要高,需要升高的 MAHMA/NO 浓度以完全氧化无细胞血红蛋白。鼠储存的红细胞上清液中的无细胞血红蛋白水平不尽相同,添加 MAHMA/NO (图 14B) 即使得所述水平降低。

[0160] 在输注到 db/db 小鼠中以前,用 1mM MAHMA 预处理鼠储存的红细胞。对总共 8 只 db/db 小鼠进行研究,分成两组: 储存的红细胞 ($n = 2$; SRBC), 经预处理的储存的红细胞 ($n = 6$; Mahma 处理的 SRBC)。用 MAHMA/NO 预处理储存的红细胞使得因输注储存的红细胞到 db/db 小鼠中所引起的高血压作用减弱 (图 15)。

[0161] 实施例 5: 在活体外用氧化氮处理红细胞中使用的膜

[0162] 利用微孔性 (MP) 膜 (Micro-1Rat Oxygenator, Kewei Rising, Shenzhen, Guangdong Province, China) 和聚甲基戊烯 (PMP) 膜氧合器 (Quadrox-iD Pediatric Oxygenators, MAQUET Cardiovascular, Wayne, NJ) 在气体对气体的研究中进行评估气态氧化氮通过可商购的膜的转运率。所述的评估利用下述 (i) 和 (ii) 的逆向流 (countercurrent streams) 进行, (i) 气相中的处于氮气中 (以防止氧化成 NO_2) 的 300 百万分率 (ppm) 氧化氮; (ii) 通常是血液的另一相的纯氮气 (图 16)。所述的 MP 膜允许穿过所述设备的氧化氮水平几乎总体平衡 (图 17)。所述的 PMP 在氧化氮水平接近 300ppm 气相氧化氮水平时依然运行良好 (图 17)。因此, PMP 和 MP 膜可用于使血液暴露于氧化氮, 作为氧化胞外高铁血红蛋白的手段。

[0163] 其他实施方案

[0164] 尽管本发明已结合本申请中的详细描述进行表述, 上述的描述仅旨在举例说明, 而非限定本发明的范围, 本发明由后附的权利要求的范围限定。其他的方面、有益之处和修改也包含在后附的权利要求的范围之内。

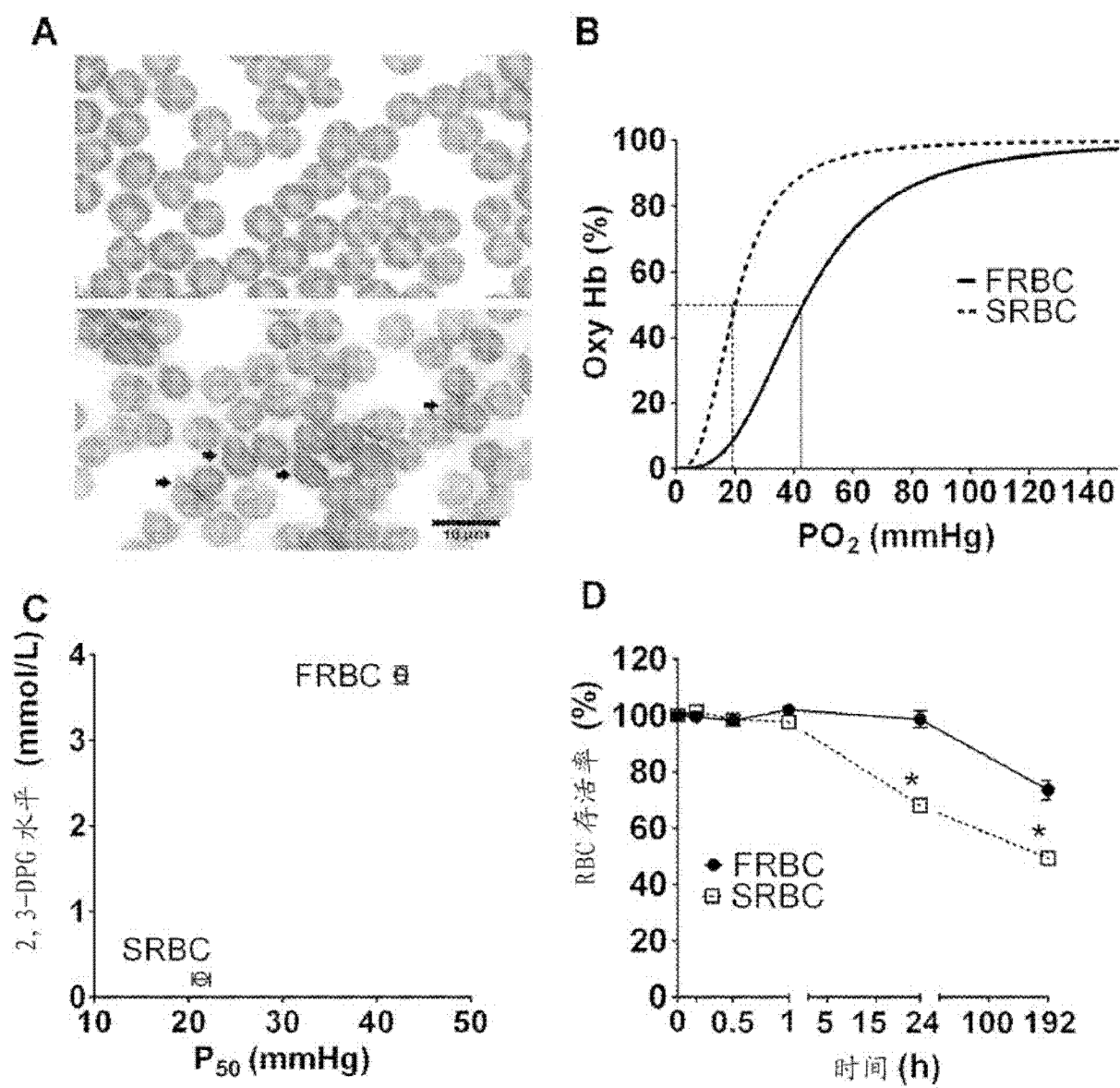


图 1

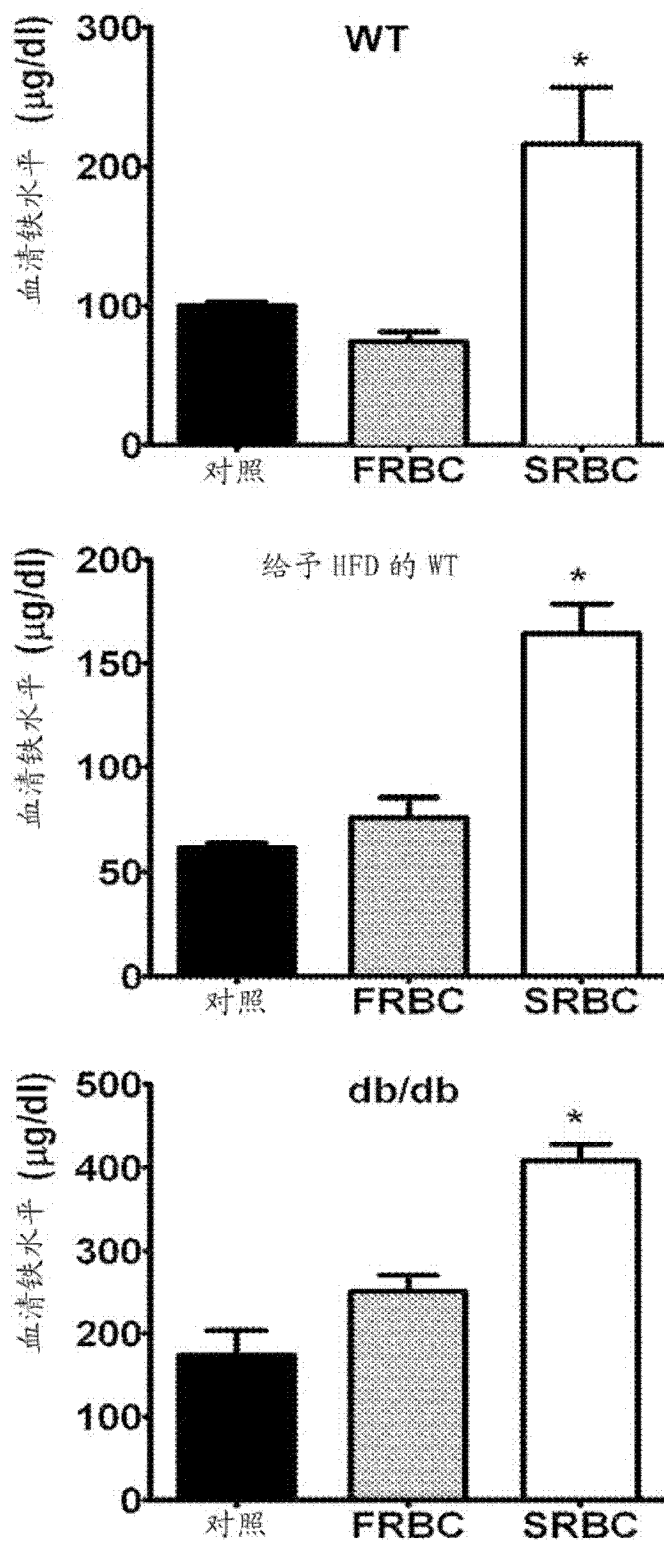


图 2

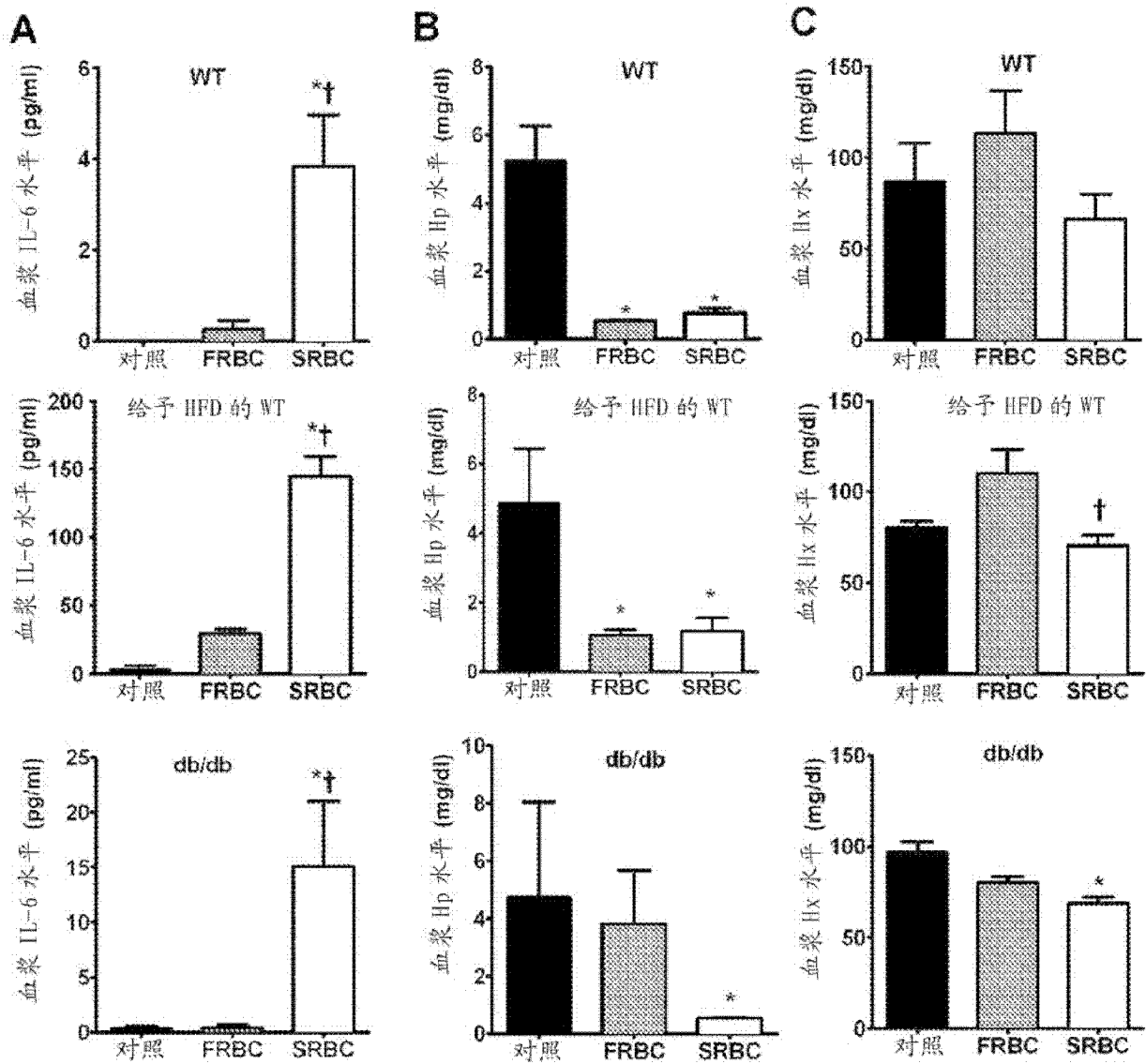


图 3

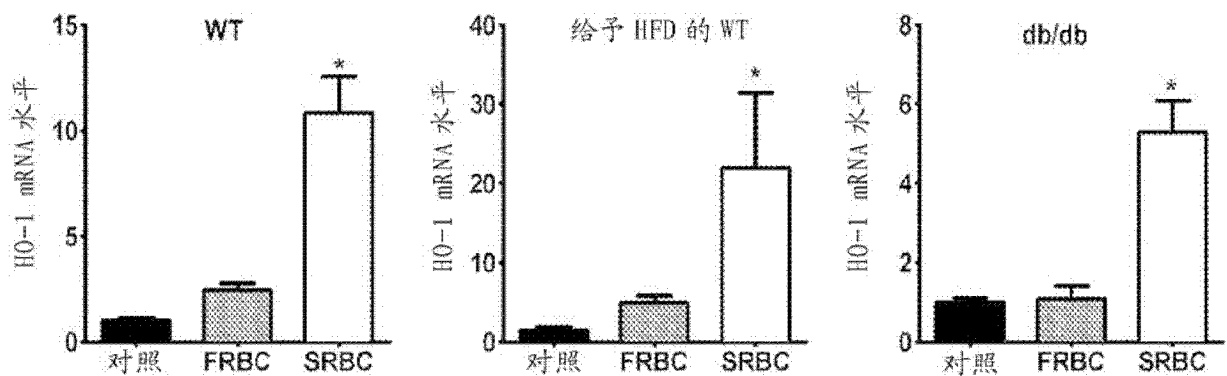


图 4

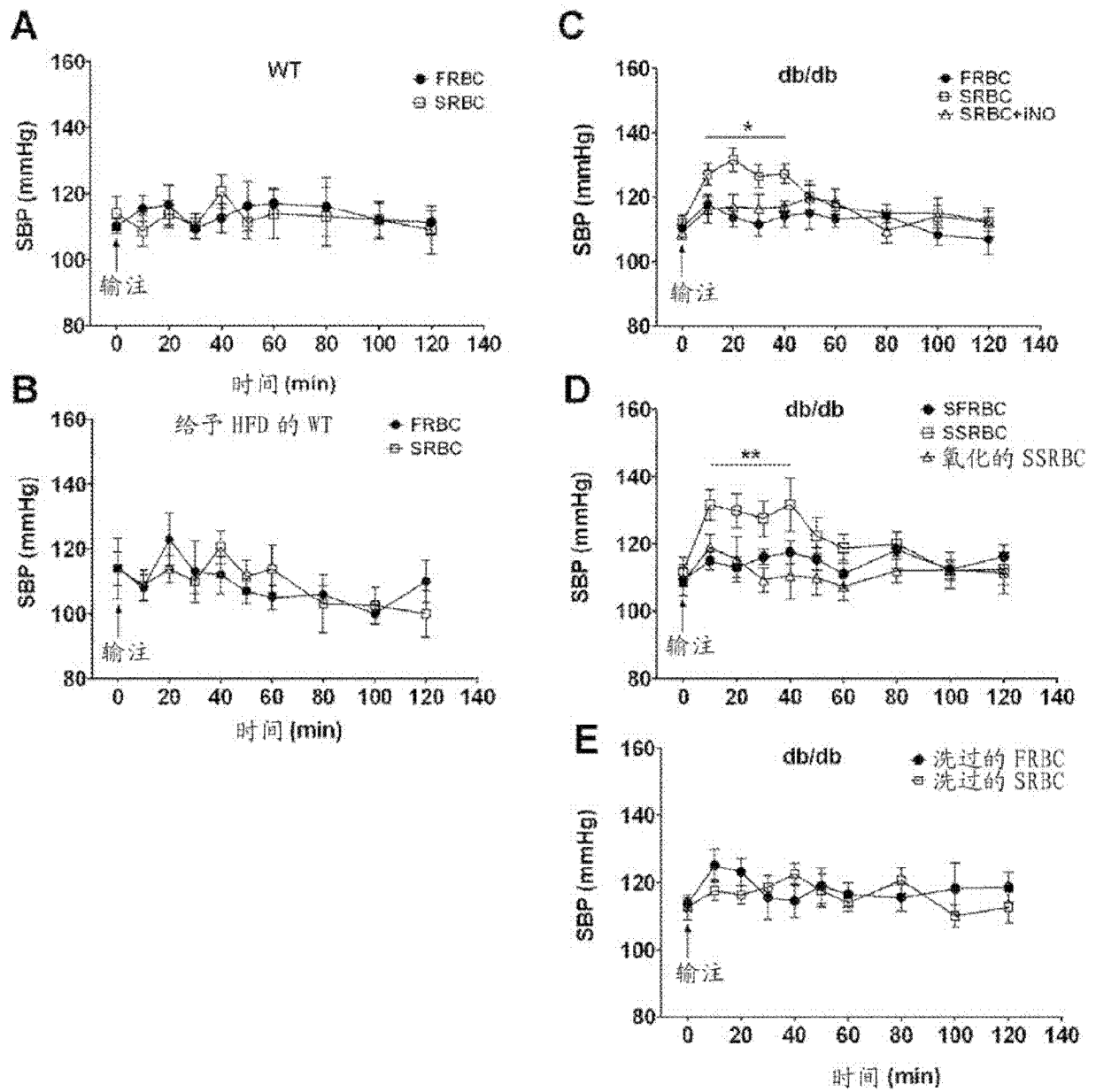


图 5

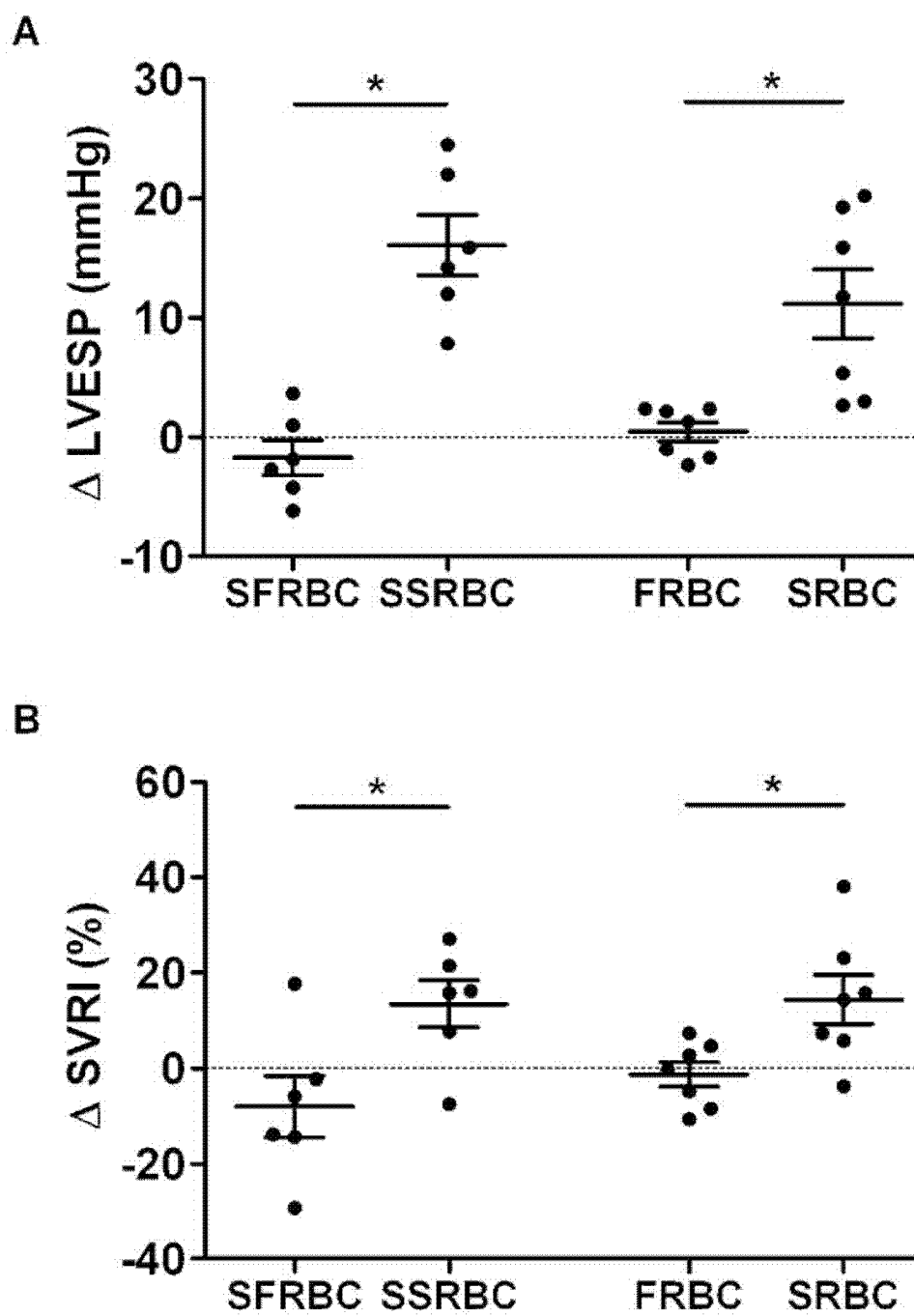


图 6

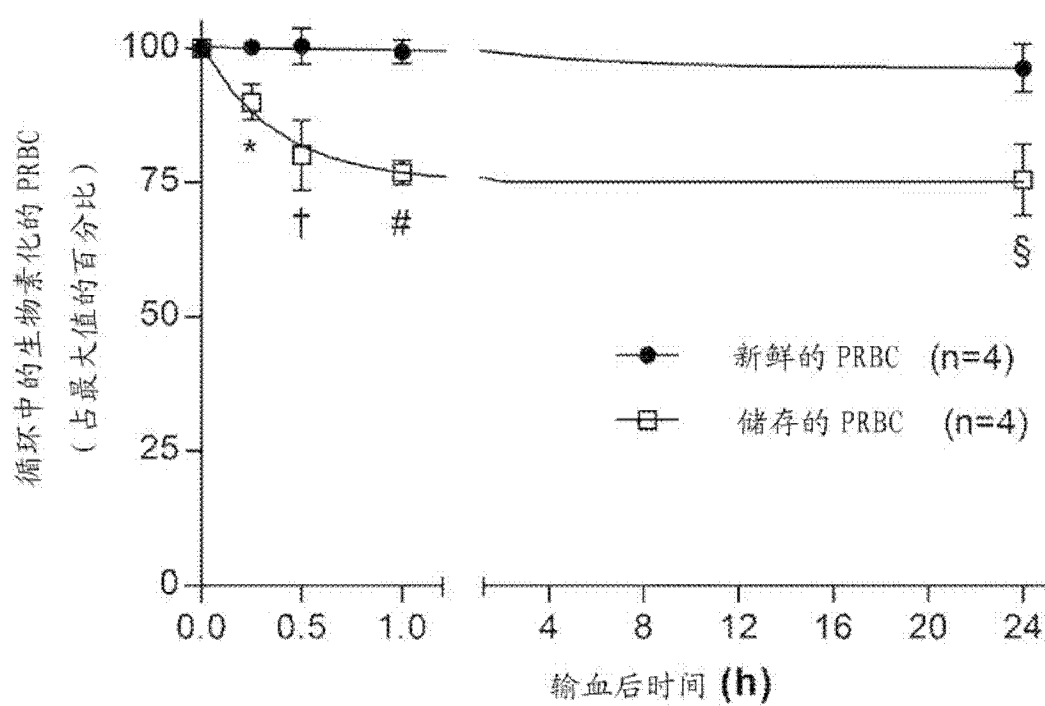


图 7

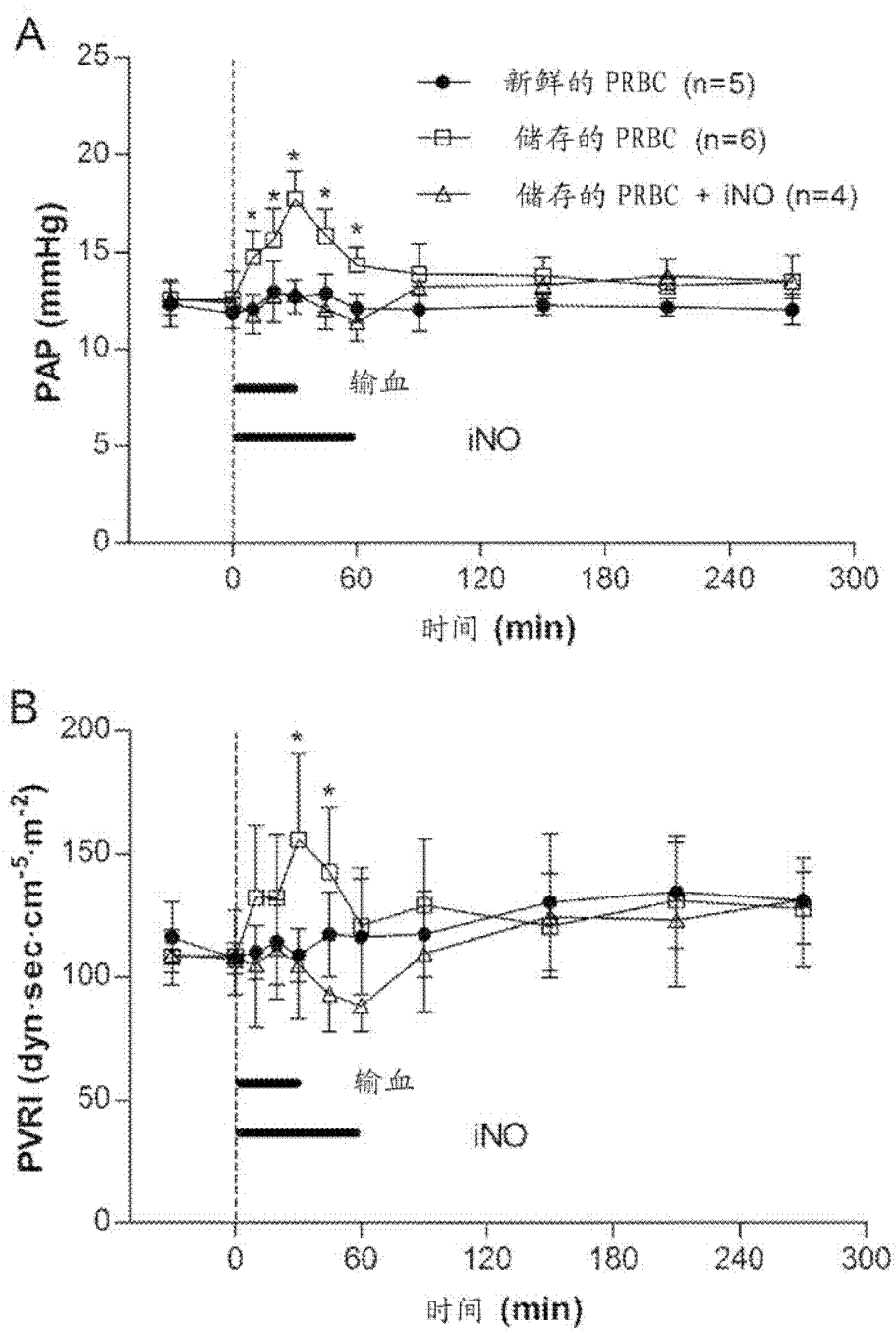


图 8

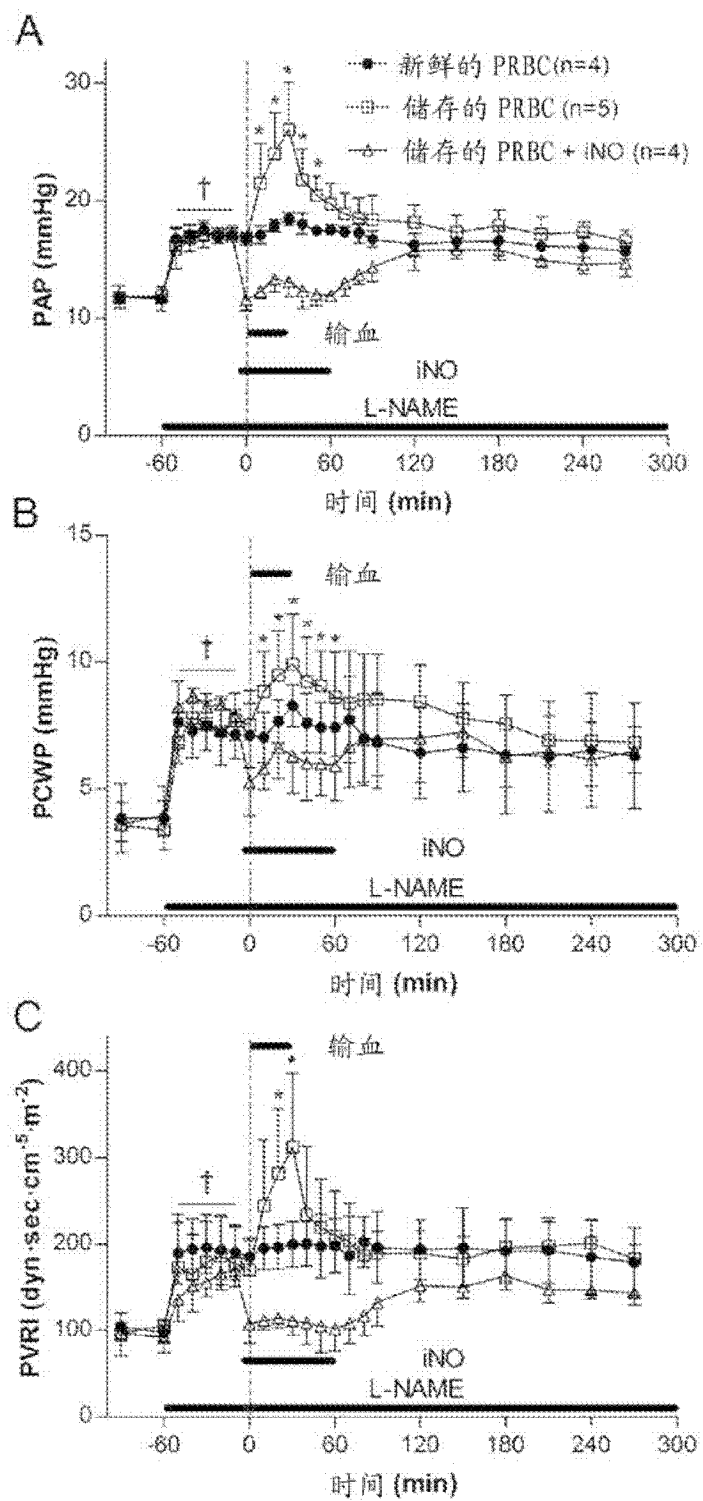


图 9

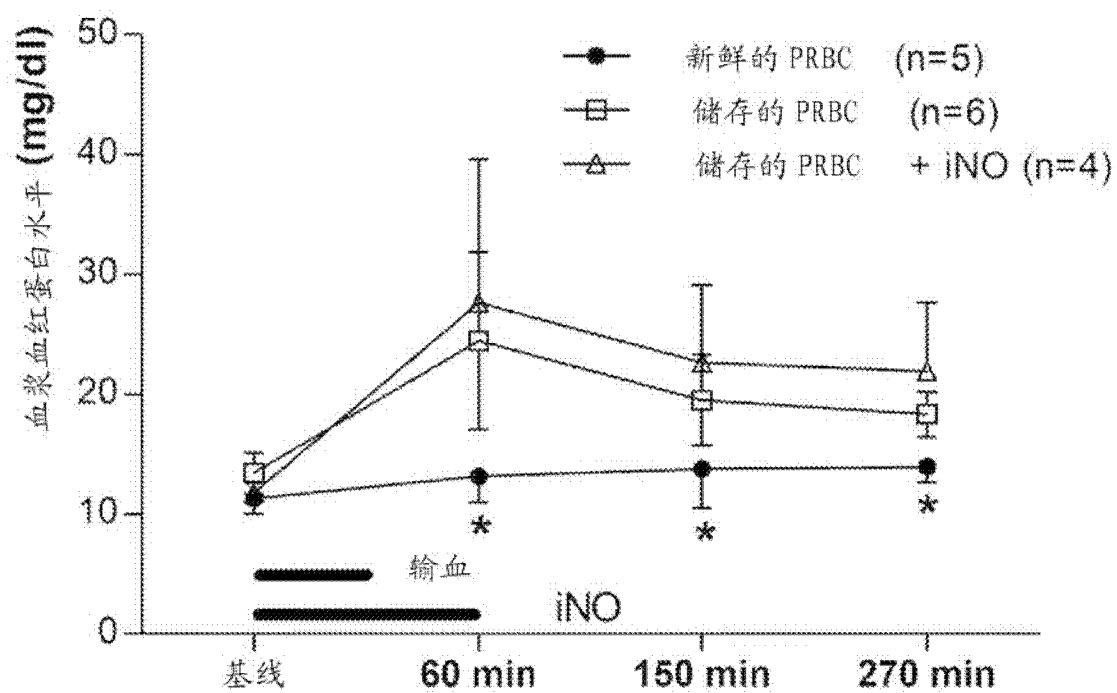


图 10

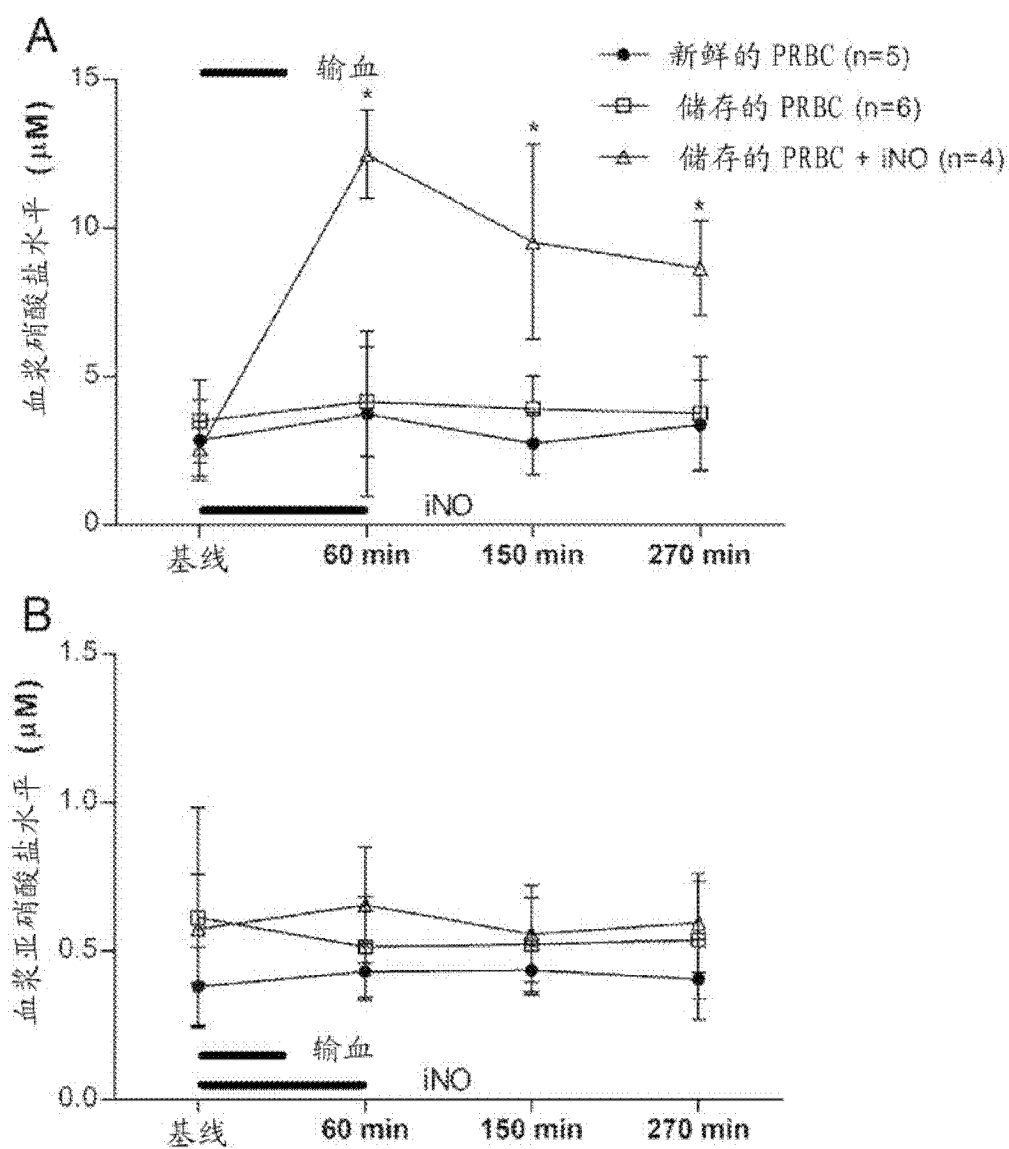


图 11

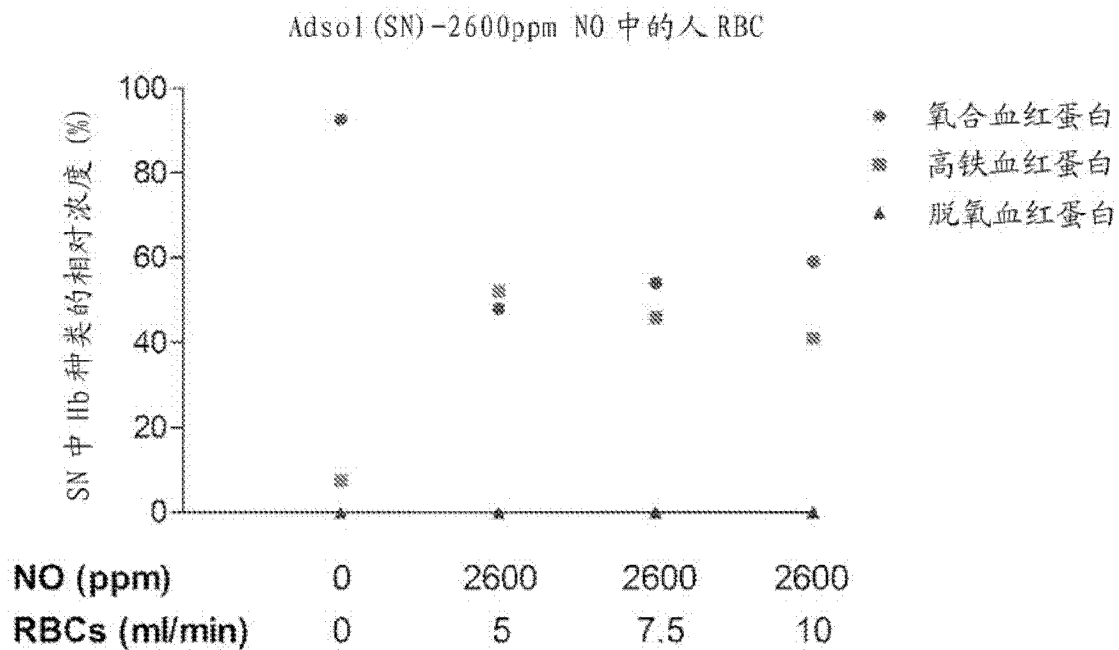


图 12

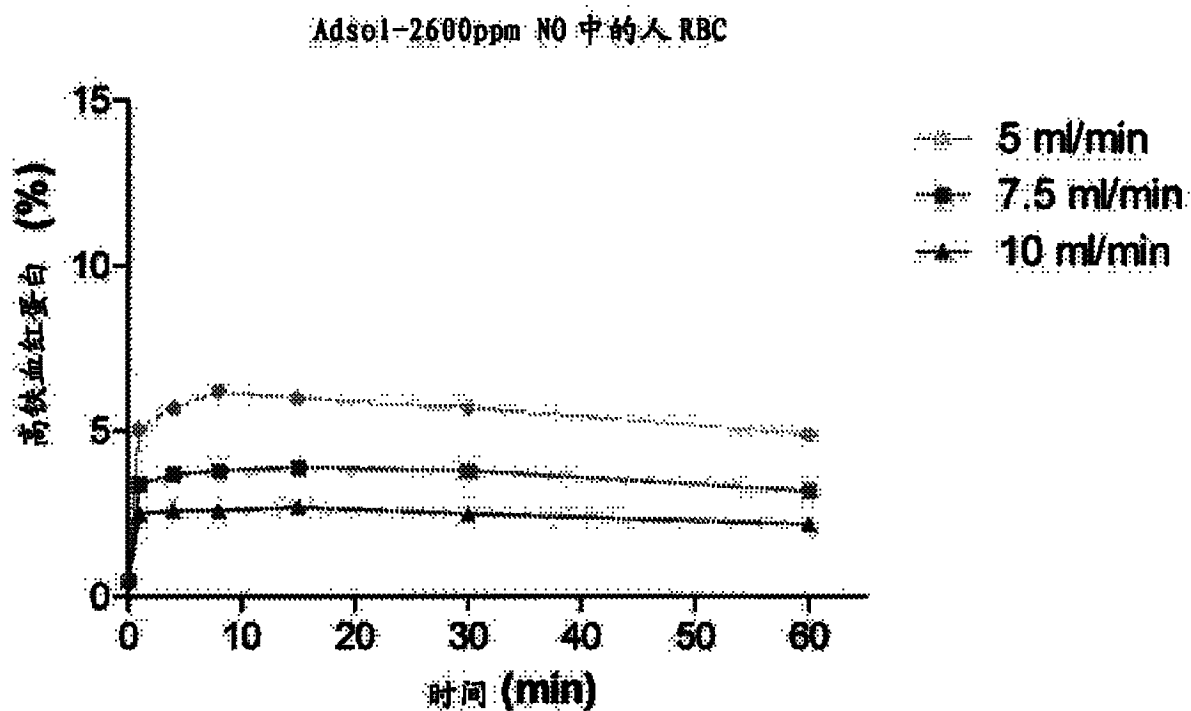


图 13

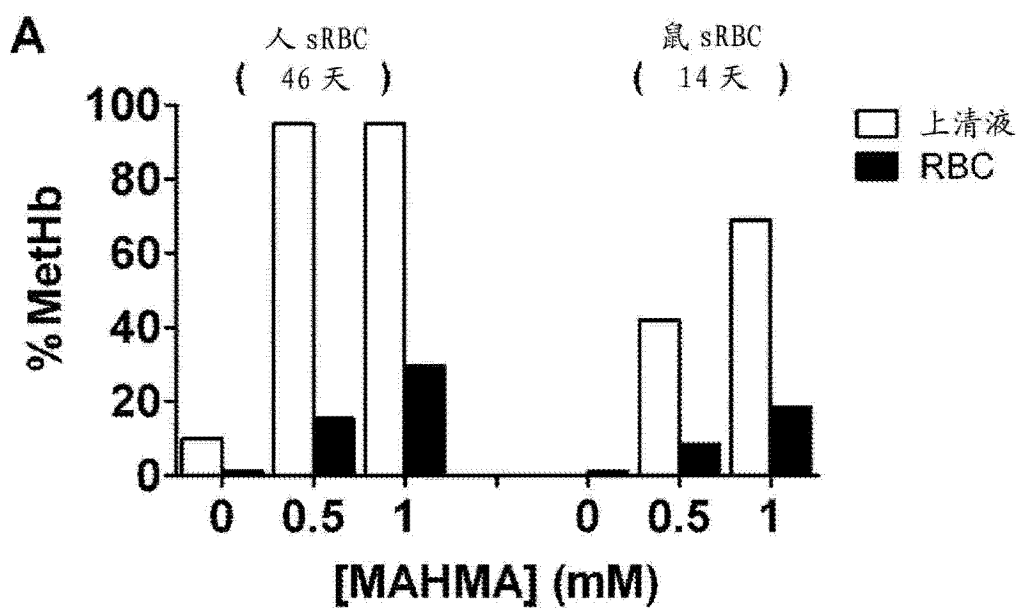


图 14A

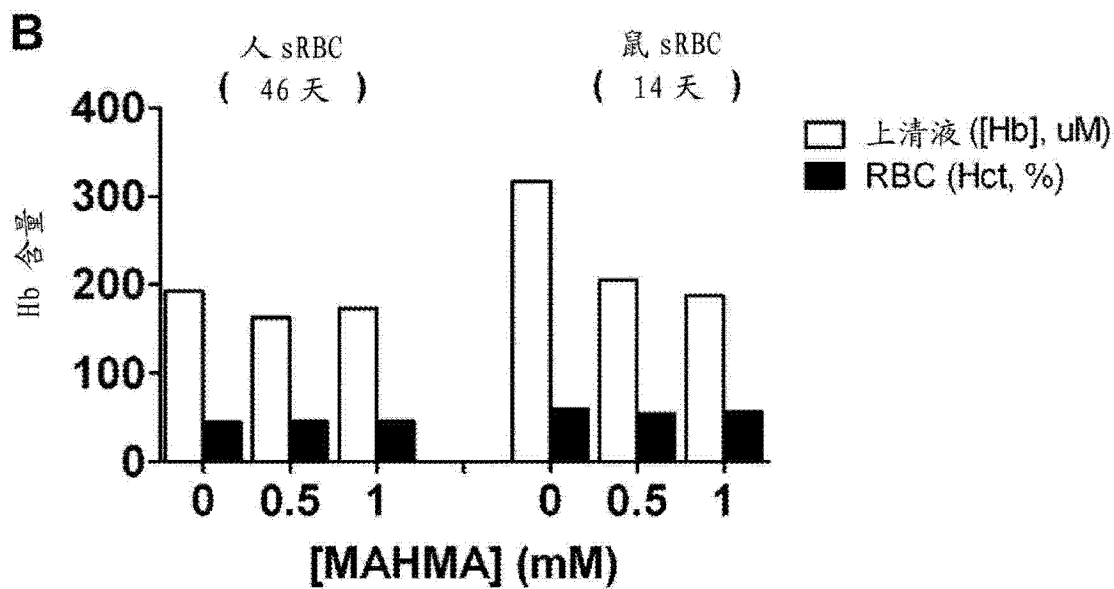


图 14B

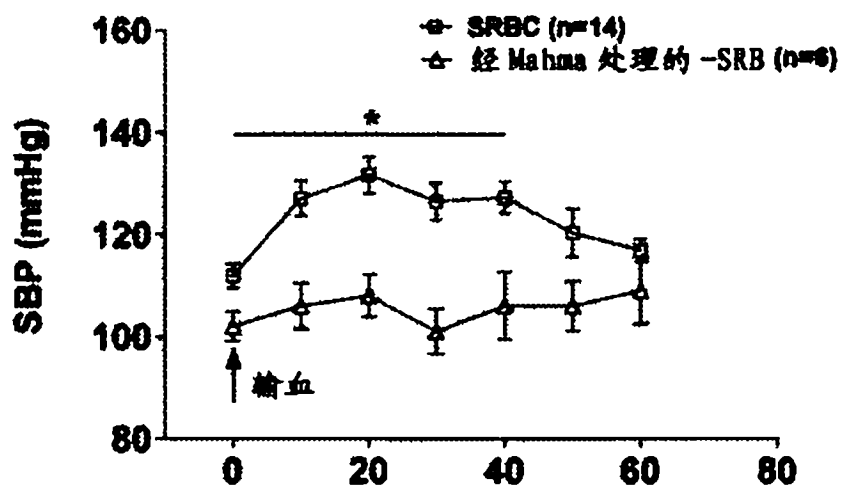


图 15

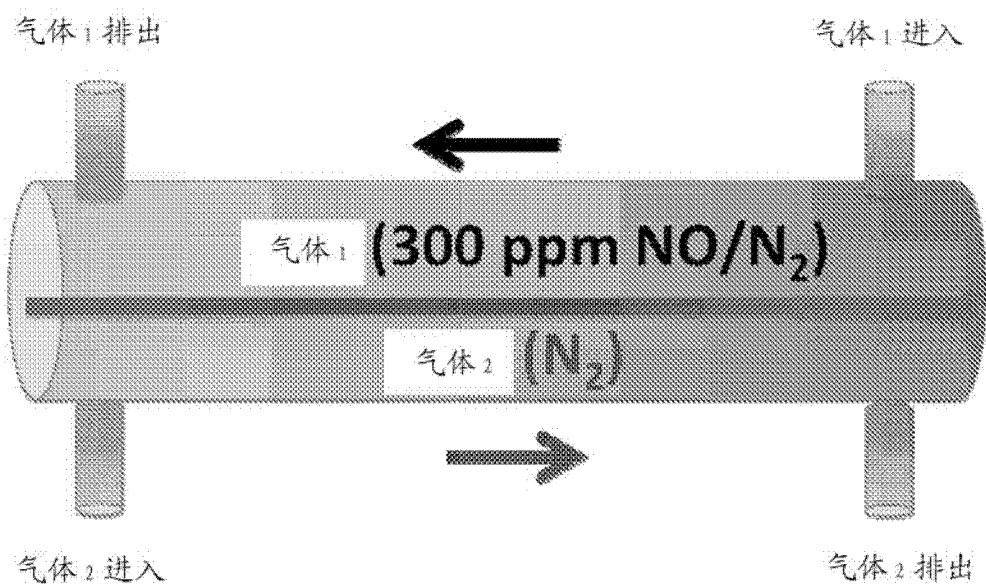


图 16

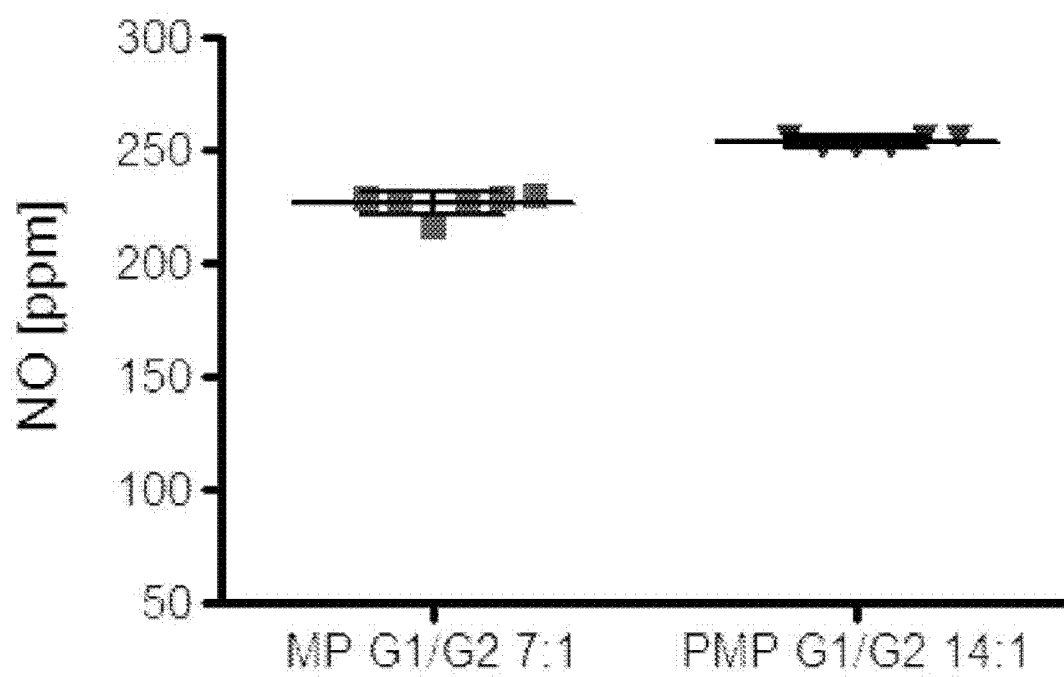


图 17