(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 953814 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 953814

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 31/565

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **08.03.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.08.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.11.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **08.03.1994 PCT/US1994/002558**

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

09.03.1993 US 029422

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **University of Utah Research Foundation,** 421 Wakara Way, Suite 170 Salt Lake City, UT 84108, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Daynes, Raymond A.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Araneo, Barbara A.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Turun Patenttitoimisto Oy, PL 99, 20521 Turku

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmät progressiivisen kudoskuolion, bakteerien translokaation, re perfuusiovaurion ja hengityksen vajaatoiminnan estämiseksi

Förfaranden för förhindrande av en progressiv vävnadsnekras, reperfusi onskada, bakteriell translokation och respirationsinsufficienssyndrom

MENETELMIÄ, JOILLA ESTETÄÄN PROGRESSIIVISTA KUDOSNEKROOSIA, REPERFUUSIOVAURIOITA, BAKTEERIEN TRANSLOKAATIOTA JA AIKUISEN HENGITYSVAIKEUSOIREYHTYMÄÄ.

KEKSINNÖN TAUSTAA

Esiteltävä keksintö koskee menetelmää, jolla estetään tai lievennetään iskemian vaikutuksia. Iskemia voi liittyä vammaan, joka syntyy infarktin, palovamman, kirurgisen toimenpiteen, tapaturman yms. seurauksena. Iskemia voi myös edeltää reperfuusiovaurioita. Keksintö koskee myös menetelmiä, joilla estetään tai vähennetään bakteerien translokaatiota ja aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymää (ARDS). Tämän keksinnön mukaisesti nämä tautitilat voidaan estää antamalla potilaalle dehydroepiandrosteronia (DHEA) tai DHEA-johdannaisia.

Viitteeksi on liitetty julkaisuja ja muuta materiaalia, jotka valaisevat keksinnön taustaa, ja joissakin erityistapauksissa niistä saa lisätietoja tässä käytetyistä menetelmistä. Kirjallisuusviitteet esitetään tekstissä mukavuussyistä numeroin. Ne on lueteltu numerojärjestyksessä tekstin lopussa olevassa bibliografiassa.

On havaittu, että verisuonten toimintakyvyn ylläpitäminen on tärkeää vamman hoidossa. Monimutkaiset hemostaattiset mekanismit - hyytyminen, trombosyyttien toiminta ja fibrinolyysi - minimoivat verisuonivaurion haittavaikutuksia ja nopeuttavat verisuonten korjautumista. Verisuonten endoteeli- ja sileälihassoluilla on useita anti-trombootisia ominaisuuksia, joiden avulla ylläpidetään aktiivisesti verisuonten seinämien tromboresistenssia. Kun verisuonen solu vahingoittuu, siitä tulee trombogeeninen. Rogers (1) on tarkastellut normaalien ja vahingoittuneiden verisuonisolujen hemostaattisia ominaisuuksia.

Iskemia on kudosten hapenpuutetta. Iskemian vaikutusten

tiedetään olevan progressiivisia niin, että ajan mittaan solujen elinkyky jatkuvasti heikkenee ja kudokset nekrotisoituvat. Täydellinen persistentti iskemia, jossa kudosten hapensaanti on rajoittunutta, johtaa solukuolemaan ja lopulta hyytymän aiheuttamaan nekroosiin, vaikka kudoksiin alkaisikin myöhemmin virrata uudelleen valtimoverta. Iskemia on luultavasti tärkein koagulatiivisen nekroosin aiheuttaja ihmisellä. On lukuisia todisteita siitä, että merkittävä osa iskemian aiheuttamista vaurioista on seurausta reperfuusioon liittyvistä tapahtumista, josta nimi reperfuusiovaurio. Reperfuusiovaurion asettamiseksi kliiniseen perspektiiviin on hyvä jakaa soluvauriot kolmeen eri luokkaan iskemian keston mukaan:

(1) Jos iskemia on lyhytaikainen, reperfuusio (ja hapen uudelleensaanti) palauttaa solujen rakenteen ja toiminnan täysin ennalleen. Solujen vaurioasteesta riippumatta hapen uudelleensaanti palauttaa solujen toiminnan. Esimerkiksi solujen membraanipotentiaalin, metabolian ja hienorakenteen muutokset ovat lyhytaikaisia, jos verenkierto palautuu nopeasti ennalleen.

(2) Jos iskemia on pidempiaikainen, reperfuusio ei enää palauta solun toimintaa ja rakennetta, pikemminkin solujen kunto heikkenee ja ne kuolevat. Hapen uudelleensaantia seuraa tällöin nopea ja ankara tulehdus.

(3) Letaali soluvaurio voi kehittyä pitkien iskemiajaksojen aikana, eikä reperfuusiota välttämättä esiinny.

Iskeemisen soluvaurion palautuvuus ei riipu yksinomaan vaurion kestosta, vaan myös kohdesolun tyypistä. Neuronit ovat erittäin herkkiä iskemialle, kun taas sydänlihassolut, keuhkojen, maksan ja munuaisten solut ovat keskiherkkiä. Fibroblastit, ihosolut ja luurankolihakset kestävät iskemiaa parhaiten, ja sietävät veren puutetta useita tunteja ennen kuin peruuttamaton vaurio kehittyy.

Koska endoteeli on veressä kiertävien leukosyyttien välittömässä läheisyydessä, neutrofiilit kiinnittyvät siihen ensimmäiseksi, mistä seuraa vaskulaari- ja parenkyymisolujen vaurioita. Aktivoitujen endoteelisolujen ja neutrofiilien vuorovaikutus on varhainen, ja välttämätön, tapahtuma iskemia/reperfuusiovauriossa (2, 3). Hapettuneen veren virtaus indusoi endoteelin adhesiivisia ominaisuuksia nopeasti. Hapen vaikutuksesta endoteelisolut aktivoituvat tuottamaan useita yhdisteitä mm. leukotrieeni B4:ää (LBT4), verihiutaleita aktivoivaa tekijää (PAF) ja P-selektiiniä. Leukotrieeni B4 vaikuttaa kemotaktisesti neutrofiileihin (4, 5). Kun endoteelisoluja aktivoidaan, P-selektiini siirtyy nopeasti soluorganelleista solukalvoille, jossa se sitoo veressä kiertäviä neutrofiilejä ja stabiloi niitä endoteeliin sitoutuneen PAF:n, endoteelin sytokiinien ja muiden biologisesti aktiivisten mediaattorien aktivointia varten (6). Niinpä aktivoituneen endoteelin ja neutrofiilien välistä fysiologista vuorovaikutusta pidetään kriittisenä varhaistapahtumana elinten ja kudosten reperfuusiovauriossa. Tulehdusvaurion muut sellulaariset ja biokemialliset välittäjät, kuten trombosyytit, komplementtikaskadi ja hyytymisjärjestelmä ovat myös tärkeitä, mutta tulevat tapahtumaketjuun mukaan paljon myöhemmin, prosessissa jota kutsutaan koagulatiiviseksi nekroosiksi. Lopuksi monosyytit, makrofagit, fibroblastit ja sileälihassolujen infiltraatio rakentavat ja korvaavat kuollutta kudosta uudella elinkykyisellä kudoksella, prosessissa jota kutsutaan haavan paranemiseksi.

Suositun teorian mukaan osittain pelkistyneillä, aktivoituneilla happiyhdisteillä olisi osuutensa kudosvaurion syntyyn reperfuusiovauriossa. Uusimmissa tutkimuksissa on osoitettu, että aktivoituneita happiyhdisteitä (superoksidi, peroksidi, hydroksyyliradikaalit) syntyy iskeemisten vaiheiden aikana ja reaktiiviset happiyhdisteet vaurioittavat iskeemisiä soluja. Toksisia happiyhdisteitä ei synny itse iskemian aikana, vaan pikemminkin silloin, kun veri alkaa virrata uudelleen kudoksiin eli reperfuusion aikana.

Kahdesta eri lähteestä peräisin olevien aktivoituneiden happiyhdisteiden arvellaan olevan osallisina reperfuusiovaurion varhaisvaiheissa. Toisia syntyy ksantiinioksidaasireaktioissa solun sisällä ja toisia aktivoituneet neutrofiilit voivat kuljettaa solun ulkopuolelle. (2, 3, 7-9).

Ksantiinioksidaasireaktiotiessä ATP:n hajoamisessa syntyvät puriinit toimivat ksantiinioksidaasin substraatteina, ja reaktiossa happea tarvitaan katalysoimaan virtsahapon muodostumista. Aktiivisia happiyhdisteitä syntyy reaktion sivutuotteina. Ksantiinioksidaasireaktiotiessä syntyy seuraavia happiradikaaleja: O_2^- (superoksidi + yksi elektroni) ja H_2O_2 (vetyperoksidi, jossa kaksi paritonta elektronia). Ksantiinioksidaasi (sijaitsee sytosolissa) katalysoi superoksidien syntyä sytosolissa. Superoksididismutaasi vuorostaan hajoittaa superoksidin peroksideiksi mitokondrioissa. Glutationiperoksidaasi hajoittaa peroksidit vedeksi sytosolissa ja katalaasi peroksisomeissa. Sekä glutationiperoksidaasi että katalaasi muodostavat useimpien solujen antioksidatiivisen puolustusmekanismin. Tämän hypoteesin tärkein todiste on peräisin kokeellisista malleista, joissa allopurinolin - ksantiinioksidaasin inhibiittorin - on todettu kykenevän suojelemaan soluja reperfuusiovaurioilta.

NAPDH-reaktiotiessä NAPDH-oksidaasi aktivoituu, jolloin molekulaarisen hapen pelkistyessä solukalvoilla syntyy superoksideja. Superoksididismutaasi pelkistää superoksidit vetyperoksidiksi joko solukalvoilla tai fagolysosomeissa. Lopulta fagolysosomien vetyperoksidi pelkistyy superoksidien tai rauta(II)ionin läsnäollessa hydroksyyliradikaaleiksi. Kolmas happimetaboliitti syntyy, kun vetyperoksidi pelkistyy myloperoksidaasin katalysoimana kloorin vaikutuksesta alikloorihapokkeeksi.

Hydroksyyliradikaalit ovat erittäin reaktiivisia. Mito-kon-

drioiden kalvoilla on useita OH^--radikaalien hyökkäyksille sopivia substraatteja. Tuloksena on mitokondrioiden peruuttamaton vaurio, jota pahentaa Ca^{2+}-ionien voimakas sisäänvirtaus. Toinen hydroksyyliradikaalien aiheuttamien solukuolemien syy on fosfolipidien peroksidaatio solukalvoilla. Tyydyttymättömät rasvahapot ovat herkkiä hydroksyyliradikaalien hyökkäyksille. Kun solukalvon fosfolipidien rasvahapoista poistuu vetyatomi, muodostuu vapaa lipidiradikaali. Nämä lipidiradikaalit toimivat kuten hydroksyyliradikaalit, ja ne muodostavat muita lipidiperoksidiradikaaleja. Kun fosfolipidien tyydyttymättömät rasvahapot tuhoutuvat, solukalvot menettävät juoksevuutensa ja solut kuolevat. Eräät tutkijat uskovat, että oksidatiivinen stressi johtaa useiden solutyyppien ohjelmoituun solukuolemaan.

Infarkteissa ja traumoissa on osallisina monia kudoksia, mukaan lukien verisuonet. Yksi tapa reagoida traumaan on sulkea verenvirtaus vahingoittuneeseen kudokseen. Tämän reaktion tarkoitus on suojella potilasta tartunnanaiheuttajien tunkeutumiselta elimistöön. Verenkierron huomattava väheneminen on tärkein progressiiviseen iskemiaan johtava tekijä trauman alueella. Progressiivisessa iskemiassa kudosnekroosin alue ulottuu varsinaista vamma-aluetta laajemmalle ja leviää ympäröivään terveeseen kudokseen. Progressiivisella iskemialla on tärkeä merkitys määritettäessä traumasta johtuvaa lopullista kudospatologiaa ihmisillä. Katso esimerkkejä, Robson et al. (10).

Yksi paljon tutkittu trauma on palovamma. Palovammat ovat epäyhtenäisiä vaurioita ja vaurion laajuus ulottuu täysin koaguloituneesta kudoksesta väin vähän vahingoittuneeseen kudokseen. Näiden kahden ääripään välillä on kudosta, joka on vakavasti vaurioitunut, ei kuitenkaan välittömästi tuhoutunut mutta joka tulee tuhoutumaan. Nekroosin etenemisen etiologiaan kuuluu ihoverenkierron staasi ja tromboosi, jotka aiheuttavat epiteelisolujen iskemian ja tu-

houtumisen. Tämä iskemia ilmenee 24-48 tuntia palovamman synnystä (10, 11). Palovamman seurauksia ovat mm. leukosyyttien kiinnittyminen verisuonten seinämiin, punaisten verisolujen agglutinoituminen ja vasoaktiivisten ja nekrotisoivien aineiden vapautuminen (11).

On osoitettu, että palovammoihin liittyvä hiussuoniston okkluusio ja iskemia johtuu mikrotrombien progressiivisesta ajan myötä tapahtuvasta lisääntymisestä staasin alueella, mikä johtaa vähitellen arteriolien täydelliseen okkluusioon ja hiussuoniston verenkierron pysähtymiseen. Vaikka erytrosyyttejä, granulosyyttejä ja trombosyyttejä tiedetään kerääntyvän pikkulaskimoiden seinämiin ensimmäisten tuntien aikana palovammasta, verihiutaleiden muodostamien mikrotrombien (tapahtuu noin 24 tuntia kirurgisesta toimenpiteestä) uskotaan olevan se tekijä, joka aiheuttaa pysyvän ja täydellisen verisuonten okkluusion ja lopullisen kudostuhon (12, 13). Mikrotrombien muodostuminen näyttää olevan se sellulaarinen tekijä, joka laajentaa palovamman synnyttyä täydellisen okkluusion ja iskeemisen nekroosin vyöhykettä staasialueelle.

Palovammojen ja traumojen hoitoa on pyritty monin tavoin kehittämään ja useita eri hoitotapoja on esitetty, jotta näihin vammoihin liittyvää progressiivista iskemiaa voitaisiin vähentää. Anti-inflammatoristen aineiden kuten indometasiinin, asetyylisalisyylihapon ja metyyliprednisoniasetaatin on osoitettu ylläpitävän dermaalista perfuusiota (10). Kolmen tromboksaani-inhibiittorin - imidatsolin, metimatsolin ja dipyridamolin - on osoitettu estävän vaskulaarisia muutoksia palohaavassa, sallivan dermaalisen perfuusion ja prostaglandiinisynteesin, joiden avulla voidaan välttää anti-inflammatoristen aineiden vahingollisia vaikutuksia (11). Ibubrofeenin ja imidatsolin terapeuttisten annosten on havaittu estävän ihoverenkierron okkluusiota toimimalla plasmiini-inhibiittorin antagonisteina (14). Veressä kiertävän fibrinogeenin määrää voidaan alentaa antamalla käärmeenmyrkystä puhdistettua

proteolyyttistä entsyymiä (ancrod), jolloin verenkierto vaurioalueella säilyy (15). On myös havaittu, että estettäessä leukosyyttien kiinnittymistä endoteeliin monoklonaalisilla vasta-aineilla vältetään palovamman laajeneminen/eteneminen staasin reuna-alueilla (16).

Bakteerien translokaatio tarkoittaa suolen bakteerien tunkeutumista suolenseinämän läpi steriiliin kudokseen. Tällöin mikrobit vaeltavat suoliliepeen imusolmukkeisiin, pernaan, maksaan, vereen ja joissakin tapauksissa keuhkoihin (17, 18). Tällaista on raportoitu ihmisillä tapahtuvan palovamman (19-21) ja iskemia-perfuusiovaurion (22) seurauksena.

Normaalioloissa suolen limakalvo ei päästä lävitseen mahdollisesti vahingollista materiaalia suolen ontelosta (17, 22, 23). Uusissa tutkimuksissa on osoitettu, että limakalvon vauriot/läpäisevyyden häiriöt edistävät bakteerien translokaatiota, sillä altistuminen stressille synnyttää reaktion, jota luonnehtii soluvauriot ja nekroottinen kudos ja jonka voimakkuus korreloi bakteerien translokaation kehittymisen kanssa (23). Bakteerien translokaation kliinisesti tärkeitä jälkiseurauksia ovat sepsis ja monielinvaurio (MOF) (22-24). Stressistä johtuvaa sepsistä ja useiden elinten vaurioitumista esiintyy eniten potilailla, joiden immuunipuolustusjärjestelmä on häiriintynyt (22, 23), kuten palovammapotilailla. Joillakin potilailla stressistä johtuva bakteerien translokaatio ei aiheuta vakavia seurauksia. Näiden potilaiden immuunipuolustus on kunnossa (22-24). Koska vakava palovamma usein heikentää immuunipuolustusjärjestelmää, bakteerien translokaatio on ihmisillä yksi palovamman vakavimpia seurauksia (24, 25).

Tutkittaessa bakteerien translokaatiota kokeellisesti on havaittu, että suolen peruuttamaton soluvaurio vaatii jopa 24 tunnin kehitysajan palovamman synnystä, ja 48 tuntia ennen kuin suolen verisuonijärjestelmässä havaitaan näkyviä histologisia muutoksia (21, 26). Nämä kokeelliset mallit

ovat olleet hyödyksi etsittäessä farmakologisia mediaattoreita, jotka näyttävät synnyttävän niiden efektorimolekyylien kaskadin, joka lopulta johtaa kudosnekroosiin. Katekolamiinien, happivapaiden radikaalien ja endotoksiinin lisäksi myös interferoni-alfan, interleukiini-6:n, tuumorinekroositekijän (TNF), verihiutaleita aktivoivan tekijän (PAF) ja monien arakidonihappometaboliassa syntyneiden vasoaktiivisten rasvahappojen on arveltu osallistuvan reaktioihin (17). Happivapaiden radikaalien, endotoksiinien, prostaglandiinien ja tromboksaanin on havaittu edistävän kudostuhoa. Tätä tukevat havainnot, joissa bakteerien translokaatiota ja limakalvovaurioita on voitu estää käyttämällä allopurinolia (27) (ksantiinioksidaasin inhibiittori), endotoksiinin desensibilitaatiota (28), prostaglandiinianalogeja (29) ja tromboksaanisyntetaasin inhibiittoreita (30).

Todisteet neutrofiilien osuudesta aikuisten hengitysvaikeusoireyhtymän syntyyn (ARDS) ovat vahvoja, mutta epäsuoria (31). Eräät ensimmäiset viitteet siitä, että neutrofiilit voivat synnyttää ARDS-tyyppisen taudinkuvan, havaittiin vahvasti neutropeenisiltä potilailta, joille annettiin neutrofiileja suonensisäisesti infuusiolla. Toisinaan joidenkin tuntien kuluttua neutrofiilien infuusiosta, potilaiden keuhkot "kalpenivat" äkillisesti (röntgenkuvissa) ja heille kehittyi ARDS:n oireita. Lukuisissa tutkimuksissa on osoitettu, että neutrofiilit kerääntyvät keuhkoihin ARDS:n aikana. Tämä on osoitettu histologisesti. ARDS:n varhaisvaiheen aikana kaikkien veressä kiertävien verisolujen määrä tilapäisesti vähenee, luultavasti siksi, että ne pakkautuvat epänormaalisti keuhkoihin. Osa keuhkokapillaareihin kerääntyvistä neutrofiileistä vaeltaa verisuonistosta soluvälitilaan ja keuhkorakkuloiden ilmatilaan. Normaaleilla terveillä vapaaehtoisilla koehenkilöillä neutrofiilien osuus on alle 3 % bronkoalveolaarisessa huuhtelussa (BAL) saaduista soluista. ARDS-potilailla neutrofiilien osuus keuhkohuuhtelussa on noussut 76 - 85 %:iin. Neutrofiilien akkumulaatio on

osoitus niiden aktivoitumisesta. Ne ovat huomattavan kemotaktisia ja synnyttävät epänormaalin suuria määriä hapen metaboliitteja stimuloitaessa *in vitro*. Neutrofiilien erittämien tuotteiden, kuten laktoferriinin kohonneita pitoisuuksia on havaittu ARDS-potilaiden plasmassa. Lisätodisteita neutrofiilien aktiivisesta osuudesta keuhkovaurion syntyyn saatiin kliinisestä tutkimuksesta potilailta, jotka kärsivät lievästä keuhkovammasta ja jotka olivat neutropeenisia keuhkovammaan liittymättömistä syistä (esim. he saivat kemoterapiaa). Havaittiin että keuhkovaurio paheni toistuvasti, jos potilaan hematologinen tila parani ja veressä kiertävien neutrofiilien määrät palautuivat normaalille tasolle.

Vaikka todisteet neutrofiilien osallisuudesta ARDS:n syntyyn ihmisillä ovat pääosin epäsuoria, eläinmalleilla saadut tulokset neutrofiilien osallisuudesta akuuttien keuhkovaurioiden syntyyn ovat vakuuttavia. Neutrofiilien vaikutuksia on tavallisesti tutkittu poistamalta eläimeltä veressä kiertävät neutrofiilit ja mittaamalla keuhkovaurion vähentymistä. Vaikka neutrofiilien riippuvuutta keuhkovaurioissa on tutkittu lukuisissa kokeellisissa malleissa, tässä yhteydessä käsitellään tilan puutteen vuoksi vain muutamaa tapausta.

Yksi laajasti tutkittu malli on endotoksiinin antaminen lampaalle. Kun endotoksiinia on infusoitu suonensisäisesti lampaaseen, seuraa monimutkainen tapahtumasarja, joista yhdessä tapahtumassa keuhkokapillaarien endoteelin permeabiliteetti lisääntyy. Tämä näkyy normaalia proteiinipitoisemman keuhkolymfan virtauksen lisääntymisenä. Nämä muutokset osoittavat, että hiussuonten endoteelin kyky pitää plasman proteiinit vaskulaaritilassa on heikentynyt. Neutrofiilien osuus läpäisevyyshäiriöön varmistui, kun havaittiin, että neutrofiilien depleetio lampaista ennen endotoksiinin antamista suojeli niitä. Toisessa akuutin keuhkovaurion *in vivo* -mallissa rotille annettiin kobran myrkkytekijää suonensisäisesti infuusiolla. Kobran myrkky-

tekijä aktivoi komplementin, jota seuraa leukosyyttien aggregaatio ja neutrofiilien kerääntyminen keuhkojen hiussuonistoon. Alveolien seinämät vahingoittuvat, jolloin nestettä kerääntyy alveoleihin ja niiden välitilaan, josta seuraa verenvuotoja ja fibriinin saostumista. Tässäkin yhteydessä neutrofiilien depleetio esti keuhkokapillaarivuodot.

Eristettyjä, perfusoituja kanin tai rotan keuhkoja on myös käytetty, kun on haluttu tutkia alveolivaurion mekanismeja oloissa, joissa voidaan paremmin valvoa nestevirtaukseen vaikuttavia muuttujia. Kun neutrofiilejä lisättiin perfuusioliuokseen ja niitä stimuloitiin, albumiinia virtasi verisuonistosta keuhkojen välitilaan ja alveolien ilmatilaan. Ei-stimuloidut neutrofiilit tai pelkkä stimulaatio (esim. forbolimyristaattiasetaatti) ei lisännyt alveolien/kapillaarien läpäisevyyttä.

Lisätodisteita stimuloitujen neutrofiilien kyvystä vahingoittaa keuhkokudosta on saatu *in vitro* kokeissa, joiden kohteena on ollut verisuonten endoteeli- ja keuhkojen epiteelisolut. Joissakin tutkimuksissa neutrofiilien on osoitettu irrottaneen endoteelisoluja tai alveolien epiteelisoluja kudosviljelmämaljan pinnasta. Jos tämä tapahtuu *in vivo*, paljastuneet pinnat mahdollistaisivat plasman huomattavat vuodot. Monissa tutkimuksissa on lisäksi saatu selkeitä todisteita siitä, että stimuloidut neutrofiilit saavat aikaan viljeltyjen vaskulaaristen endoteelisolujen ja alveolien epiteelisolujen lyysiksen.

DHEA on endogeeninen androgeeninen steroidi, jolla on osoitettu olevan lukuisia biologisia vaikutuksia. Araneo et al (32) on osoittanut, että DHEA:n antaminen palovammasta kärsivälle hiirelle tunnin sisällä vamman synnystä palautti normaalin immunologisen toiminnan, johon kuuluu T-soluperäisten lymfokiinien normaali tuotanto, sellulaarisen immuunivasteen kehittyminen ja kyky vastustaa indusoituja infektioita. Eichin et al (33, 34) mukaan DHEA:n käyttö

vähentää trombosyyttien aggregaationopeutta ja DHEA:n tai DHEA-sulfaatin (DHEA-S) käyttö vähentää tromboksaanin tuotantoa.

Nestlerin et al. (35) tutkimukset osoittavat, että ihmisille annettaessa DHEA pystyy vähentämään kehon rasvan määrää, lisäämään lihasmassaa, alentamaan LDL-kolesterolitasoja vaikuttamatta HDL-kolesterolitasoihin, alentamaan seerumin apolipoproteiini-B:n tasoja. DHEA ei kuitenkaan vaikuta kudosten insuliiniherkkyyteen. Kentin (36) mukaan DHEA on "ihmelääke", joka estää obesiteettia, ikääntymistä, diabetes mellitusta ja sydänsairauksia. DHEA:ta määrättiin laajalti lääkkeeksi monia vuosia. USA:n Terveysministeriö (Food and Drug Administration) on kuitenkin viime aikoina rajoittanut sen käyttöä. DHEA muuttuu helposti ja reversiibelisti sulfaattiesterikseen DHEA-S:ksi ja takaisin DHEA:ksi solunsisäisten sulfataasien ja sulfotransferaasien vaikutuksesta.

Edellä mainitut havainnot osoittavat useilla eri yhdisteillä olevan vaikutusta palovammoihin. Silti on tarve löytää lisää yhdisteitä, jotka kykenisivät estämään tai lieventämään iskemiasta johtuvan reperfuusiovaurion vaikutuksia, infarkteihin tai traumaan liittyvän iskemian vaikutuksia, ja on tarve tunnistaa yhdisteitä, jotka kykenevät estämään tai vähentämään bakteerien translokaatiota ja ARDS:ää. Tässä esiteltävän keksinnön tarkoitus on estää tai vähentää progressiivista kudosnekroosia, estää tai vähentää reperfuusiovauriota, estää tai vähentää bakteerien translokaatiota ja estää tai vähentää ARDS:ää.

KEKSINNÖN YHTEENVETO

Esiteltävä keksintö koskee menetelmää, jolla estetään tai lievennetään iskemiasta johtuvaa reperfuusiovauriota, iskeemisiin episodeihin, kuten infarkteihin tai traumaan, liittyviä soluvaurioita, ja estetään tai vähennetään iskemiaan liittyvää progressiivista kudosnekroosia. Tämä saa-

daan aikaan antamalla potilaalle DHEA:ta tai DHEA-johdannaisia. Tämän keksinnön yhteydessä esitellään myös menetelmä, jolla estetään tai vähennetään bakteerien translokaatiota ja ARDS:ää antamalla potilaalle DHEA:ta tai DHEA-johdannaisia. Sopivia DHEA-johdannaisia ovat lähinnä, mutteivät ainoastaan, 16α-bromo-DHEA, androsteenidioli ja johdannaiset, joissa on sivuketju positioissa 2', 4', 6' tai 7'. Nämä sivuketjut eivät tuhoa natiivin DHEA:n aktiivisuutta, mutta kykenevät estämään sulfotransferaasin toiminnan, jolloin DHEA konversio DHEA-S:ksi estyy. Yllättäen on havaittu, ettei DHEA-S kykene estämään tai vähentämään iskemiaa.

KUVIEN SELITYKSET

Kuvassa 1 nähdään edeeman (korvan turpoaminen) muodostumisen ja sen resoluution analyysi verrokkiryhmän ja DHEA:lla käsiteltyjen hiirien korvan palovammassa.
Kuvassa 2 nähdään edeeman muodostumisen (korvan turpoaminen) ja sen resoluution analyysi verrokkiryhmän ja DHEA:lla, androsteenidiolilla, 16α-bromo-DHEA:lla tai tunnetulla anti-glukokortikoidilla, RU486:lla, käsiteltyjen hiirien korvan palovammassa.
Kuvassa 3A nähdään DHEA:n kyky suojella korvaa useimmilta palovamman aiheuttamilta progressiivisen iskemian seurauksilta.
Kuvassa 3B nähdään androsteenidiolin kyky suojella korvaa useimmilta palovamman aiheuttamilta progressiivisen iskemian seurauksilta.
Kuvassa 3C nähdään 16α-bromo-DHEA:n kyky suojella korvaa palovamman aiheuttamilta progressiivisen iskemian seurauksilta.
Kuvassa 3D nähdään korvan palovamman progressiivisen iskemian seuraukset, kun hiirille on annettu vain kantajaainetta.
Kuvassa 3E nähdään korvan palovamman progressiivisen iskemian seuraukset, kun hiirille on annettu vain androsteenidiolia.

Kuvassa 3F nähdään korvan palovamman progressiivisen iskemian seuraukset, kun hiirille on annettu vain RU486:ta.
Kuvassa 4 nähdään DHEA-käsittelyn vaikutukset progressiiviseen iskemiaan, kun DHEA annetaan 0-6 tuntia palovamman aiheuttamisen jälkeen.
Kuvassa 5A nähdään virtaavien kapillaarien määrä hiussuonten jälkeisissä pikkulaskimoissa 1. vyöhykkeen läheisyydessä reperfuusiovaurion aikana.
Kuvassa 5B nähdään virtaavien kapillaarien määrä hiussuonten jälkeisissä pikkulaskimoissa 2. vyöhykkeen läheisyydessä reperfuusiovaurion aikana.
Kuvassa 5C nähdään virtaavien kapillaarien määrä hiussuonten jälkeisissä pikkulaskimoissa 3. vyöhykkeen läheisyydessä reperfuusiovaurion aikana.
Kuvassa 6A nähdään niiden leukosyyttien lukumäärä, jotka liikkuvat hiussuonten jälkeisten pikkulaskimoiden onteloissa kahden minuutin aikana.
Kuvassa 6B nähdään niiden leukosyyttien lukumäärä, jotka takertuvat tai kiinnittyvät hiussuonten jälkeisten pikkulaskimoiden seinämiin kahden minuutin aikana.
Kuvassa 6C nähdään niiden leukosyyttien lukumäärä, jotka vaeltavat endoteelin läpi kahden minuutin aikana.
Kuvassa 7A nähdään laskimoveren punasolujen virtausnopeus reperfuusion jälkeen.
Kuvassa 7B nähdään valtimoveren punasolujen virtausnopeus reperfuusion jälkeen.

KEKSINNÖN YKSITYISKOHTAINEN KUVAUS

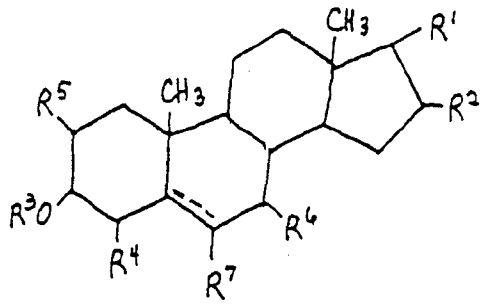
Esiteltävä keksintö koskee menetelmää, jolla estetään tai lievennetään iskemiasta johtuvaa reperfuusiovauriota ja iskeemisiin episodeihin, kuten infarktiin tai traumaan, liittyviä soluvaurioita. Esimerkki infarktista on sydänlihasinfarkti. Esimerkkejä traumasta ovat palovamma, kirurginen toimenpide, kemialliset palovammat, tylpän esineen aiheuttama vamma tai laseraatio yms. Estämällä tai vähentämällä iskemiasta johtuvaa reperfuusiovaurioita ja iskeemisiin episodeihin liittyviä soluvaurioita, tällaiseen

infarktiin tai vaurioon liittyvää progressiivinen nekroosi voidaan myös välttää tai sen vaikutuksia vähentää. Tämän keksinnön mukaisesti reperfuusiovaurioita tai iskeemisiin episodeihin, kuten infarktiin ja traumaan, liittyviä solu-
5 vaurioita voidaan estää tai niiden vaikutuksia voidaan vähentää antamalla potilaalle DHEA:ta ja DHEA-johdannaisia niin pian kuin mahdollista, mielellään neljän tunnin sisällä ja vielä mieluummin kahden tunnin sisällä iskemiasta, infarktista tai traumasta.

10 Tämä keksintö koskee myös menetelmää, jolla estetään tai vähennetään bakteerien translokaatiota. Tämän keksinnön mukaisesti bakteerien translokaatiota estetään tai vähennetään antamalla potilaalle DHEA:ta tai DHEA-johdannaisia kuten edellä on kuvattu. DHEA:ta tai DHEA-johdannaista
15 annetaan 24 tunnin kuluessa sellaisen vaurion synnystä, jossa bakteerien translokaatio on yksi mahdollinen jälkiseuraus.

Tämä keksintö koskee myös menetelmää, jolla estetään tai vähennetään aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymää (ARDS).
20 Tämän keksinnön mukaisesti ARDS estetään tai sen vaikutuksia vähennetään antamalla potilaalle DHEA:ta tai DHEA-johdannaisia kuten edellä on kuvattu. DHEA:ta tai DHEA-johdannaista annetaan potilaalle ennen ARDS:n kliinisten oireiden ilmenemistä, ensisijaisesti yksilöille, joilla on
25 suuri riski sairastua ARDS:ään.

DHEA tai DHEA-johdannainen tarkoittaa tässä yhdistettä, jolla on kaava I



jossa

R^1 on =O tai OH-ryhmä;
R^2 on H, CH_3, OH tai halogeeni, kun R^1 on =O ja R^2 on H kun R^1 on OH-ryhmä;
R^3 on H, rasvahappo, C_{1-10}-alkyyli-, C_{1-10}-alkeeni-, C_{1-10}-asetyleeni-, $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkyyli-, $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkeeniryhmä tai $-CO-R^8$;
R^4 ja/tai R^5 on H, OH, halogeeni tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta on SO_3:ksi;
R^6 on H, OH tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;
R^7 on H, kun katkoviiva on kaksoissidos, =O tai H, ja halogeeni kun katkoviiva on yksinkertainen sidos tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;
R^8 on H, rasvahappo, C_{1-10}-alkyyli-, C_{1-10}-alkeeni-, C_{1-10}-asetyleeni- $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkyyli- tai $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkeeniryhmä;
X on eri tai sama ja on halogeeni, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkeeni, C_{1-4}-alkoksi-, karboksi-, nitro-, sulfaatti-, sulfonyyliryhmä, C_{1-6} karboksyyliesteri tai C_{1-6} sulfaattiesteri; ja
n on 0, 1, 2 tai 3.

Esimerkkejä sopivista halogeeneista ovat Br, Cl, F ja I. Suositeltavia R^4:n, R^5:n tai R^6:n substituentteja ovat OH ja Br. Muita sopivia substituentteja voidaan tunnistaa helposti (a) antamalla DHEA-johdannaista edellä kuvatun palovammamallin mukaisesti ja havaitsemalla sen anti-iskeemiset vaikutukset ja (b) määrittämällä sulfatoidun johdannaisen määrä.

Tiedetään, että reperfuusiovaurio, infarktit ja traumat, kuten sydänlihasinfarkti, palovammat, suuret kirurgiset

toimenpiteet, kemialliset palovammat, tylpän esineen aiheuttamat vammat, laseraatio yms. voivat aiheuttaa kudosnekroosin, joka leviää vamma-alueelta ympäröivään terveeseen kudokseen. Tällaisella iskemialla on tärkeä merkitys ihmisten traumojen lopullisen kudospatologian määrityksessä (10). Tiedetään myös, että palovamman yksi seuraus on bakteerien translokaatio. Palovammat ovat parhaiten tutkittu trauma, jossa progressiivista iskemiaa esiintyy.

Huomattava osa palovammojen aiheuttamista kirurgisia ihonsiirtoja vaativista ihon menetyksistä johtuu progressiivisesta iskeemisesta nekroosista (37). Lukuisia kliinisiä palovammoja jäljitteleviä eläinmalleja on kehitetty. Kun jyrsijöille esimerkiksi aiheutetaan ihon läpi menevä palovamma, joka peittää > 20 % ihon koko pinta-alasta (palovamma voidaan esim. aiheuttaa pitämällä eläimiä 72°C:ssa vedessä 7 sekunnin ajan), palovamman välittömät kudosvaikutukset näyttävät olevan varsin lieviä, kun niitä verrataan vahingoittuneen ja ympäröivän ihokudoksen laajoihin vaurioihin, jotka kehittyvät seuraavan 24-72 tunnin aikana. Sekä kliinisiä että kokeellisia palovammoja tutkittaessa on havaittu, että vaikeassa palovammassa menetetyn ihon kokonaismäärä on välittömien suorien kudostuhojen ja latenttien vaurioiden - vamma-alueen ja ympäröivän ihon orvaskeden, verinahan ja muiden ihorakenteiden vaurioiden - summa.

Alustavissa tutkimuksissa, joissa palovamma aiheutettiin jyrsijöiden selkänahkaan, tehtiin joitakin dramaattisia havaintoja. Havaittiin, että annettaessa hiirille tunnin kuluttua palovamman synnystä lievästi androgeenista steroidihormonia, dehydroepiandrosteronia (DHEA), niiden haavat kehittyivät ja paranivat aivan eri tavoin kuin käsittelemättömien hiirten tai näennäishoitoa saaneiden verrokkihiirten vammat. 3-4 päivän sisällä palovamman synnystä kaikille verrokkiryhmän eläimille kehittyi 3. ja 4. asteen vaurio suureen osaan vamma-alueen ihokudosta. Käytännössä lähes kaikki iho vamma-alueella menetetään

lopulta progressiivisen iskeemisen nekroosin johdosta. Kudosvaurion laajuus näillä eläimillä liittyy ihorakenteiden tuhoon (karvatuppi, verisuonet, neuronit ja talirauhaset), fibroblastien infiltraatioon, haavan laajaan supistumiseen ja sidekudosta muodostavien tekijöiden adheesioon vamma-alueen ihon alle. DHEA:lla käsitellyille eläimille (noin 2 mg/kg/pv, alkuannostuksen - 4 mg/kg - jälkeen) kehittyi huomattavasti vähemmän patologisia oireita - ihon, verinahan ja vastaavien ihorakenteiden progressiivisia vaurioita esiintyi huomattavasti vähemmän. Vaikka uutta epiteeliä muodostui sekä verrokkihiirille että DHEA:lla käsitellyille hiirille, DHEA:lla käsitellyillä hiirillä ei esiintynyt yhtä paljon haavan kontraktiota eikä sidekudosta muodostavien tekijöiden adheesiota.

Dorsaalisessa palovammamallissa osoitettiin selvästi, että DHEA-käsittelyllä on erittäin positiivinen vaikutus haavan paranemiseen. Nämä löydökset viittaavat vahvasti siihen, että eläimille aiheutettujen palovammojen hoito DHEA:lla edesauttaa haavan paranemista, mikä taas perustuu DHEA:n kykyyn estää iskemiaa. Niinpä Boykinin et al. (13) ja Erikssonin et al. (38) ensimmäisinä kuvaamia menetelmiä mukaillen kehitettiin malli, jota käyttäen voidaan tehdä sekä kvantitatiivinen että kineettinen arviointi hiiren korvaan aiheutetun palovamman progressiivisesta dermaalisesta iskemiasta heti palovamman aiheuttamisen jälkeen ja myöhemmissä vaiheissa. Näissä tutkimuksissa käytetty tekniikka helpotti huomattavasti progressiivisen kudosvaurion ja iskeemisen nekroosin täsmällistä ja järjestelmällistä ajallista seurantaa. Tutkimuksissa palovamma aiheutettiin hiiren korvaan kuumalla vedellä (52°C:ssa 24 sekuntia), ja tästä tekniikasta on tullut pätevä eläinmalli palaneen kudoksen progressiivisen iskemian tutkimuksessa.

Hiiren korvassa on kaksi ihokerrosta, rustoa, vähän lihassoluja ja sidekudosta. Verisuonisto on hyvin järjestäytynyt ja koostuu arterioleista, hiussuonia edeltävistä pikkuvaltimoista, hiussuonten jälkeisistä pikkulaskimoista ja

venuloista. Käytettäessä laitteistoa jolla pystytään aiheuttamaan tasainen palovamma hiiren koko korvan pintaan, tutkijat ovat raportoineet havainneensa välittömiä muutoksia verenkierrossa. Kun palovamman aiheuttamia hemodynaamisia muutoksia hiiren korvassa on morfologisesti tutkittu, on voitu havaita kolme selkeää patologisesti toisistaan eroavaa vyöhykettä: täydellinen kapillaarisen okkluusion vyöhyke, osittainen okkluusion vyöhyke (staasi) ja kapillaarisen hyperemian vyöhyke (13). Tunnin kuluttua vamman synnystä täydellinen kapillaarisen okkluusion vyöhyke rajoittuu hiiren korvan distaaliosaan. Hieman proksimaalisesti tästä äärimmäisestä herkästä vyöhykkeestä sijaitsee osittainen okkluusion vyöhyke eli staasi. Tämä vyöhyke muodostaa pääosan siitä kudoksesta, jossa iskemia etenee seuraavan 24-72 tunnin kuluessa palovamman synnystä ja joka lopulta nekrotisoituu. Kaikkein proksimaalisin vamma-alue on hyperemiavyöhyke. Tämä alue kestää palovamman jälkeistä progressiivista iskemiaa melko hyvin.

On havaittu, että annettaessa potilaalle terapeuttisia määriä kaavan I mukaista DHEA:ta tai DHEA-johdannaista fysiologisesti hyväksytyssä kantajassa mahdollisimman varhaisessa vaiheessa, mielellään neljän tunnin kuluessa reperfuusiovaurion synnystä, infarktista tai traumasta, reperfuusiovaurio, infarkti tai traumaan liittyvä iskemia voidaan estää tai sen vaikutuksia vähentää. Iskemian estäminen tai vähentäminen estää ja vähentää myös tällaiseen iskemiaan liittyvää kudosnekroosia. Iskemian väheneminen johtuu siitä, että neutrofiilien kiinnittyminen endoteelisoluihin heikkenee, kuten esimerkistä nähdään. Kun neutrofiilien kiinnittyminen heikkenee, neutrofiilit eivät aktivoidu eivätkä tuota niitä sellulaarisia tekijöitä, jotka edesauttaisivat trombosyyttien aggregaatiota. Kaavan I mukaisen DHEA:n tai DHEA-johdannaisen antaminen olisi suositeltavinta kahden tunnin sisällä reperfuusiosta, infarktista tai traumasta. Kaavan I mukaista DHEA:ta tai DHEA-johdannaisia annetaan potilaalle esterinä tai jossakin muussa farmaseuttisesti hyväksytyssä muodossa, sekoitettuna

sideaineisiin, nesteisiin tai muihin farmaseuttisesti hyväksyttyihin aineseoksiin tai muihin farmaseuttisesti hyväksyttyihin kantajiin.

Farmaseuttiset koostumukset, joiden aktiivisena ainesosana on esitettävän keksinnön mukainen yhdiste lisättynä farmaseuttisesti hyväksyttyyn kantajaan voidaan valmistaa tunnettuja farmaseuttisia menetelmiä noudattaen. Kantaja voi olla useassa eri muodossa aineen halutun antotavan mukaan. Se voidaan valmistaa suonensisäistä, oraalista tai parenteraalista antotapaa silmällä pitäen. Kun valmistetaan suun kautta annettava koostumus, mitä tahansa yleisessä käytössä olevaa farmaseuttista kantaja-ainetta voidaan käyttää: esimerkiksi vettä, glykoleita, öljyjä, alkoholeja, makuaineita, säilöntäaineita, väriaineita yms., joista valmistetaan nestemäinen valmiste (esim. suspensio, eliksiiri tai liuos). Kun valmistetaan koostumus annettavaksi kiinteässä muodossa suun kautta, kantajana voi olla tärkkelys, sokerit, liuottimet, rakeiset aineet, voiteluaineet, sideaineet, hajoavat aineet yms. (esim. jauheet, kapselit tai tabletit). Tabletit voidaan päällystää sokerilla tai suolella tunnettujen tekniikoiden mukaan. Parenteraalista antotapaa varten kantaja on tavallisesti steriiliä vettä, vaikka myös muita aineita, jotka parantavat esimerkiksi aineen liukoisuutta tai säilyvyyttä, voidaan käyttää. Injisoitavia suspensioita voidaan myös valmistaa, jolloin käytetään sopivia nestemäisiä kantajia yms.

Kaavan I mukaisen DHEA:n tai DHEA-johdannaisen annostuksen tulisi perustua hyvin tunnetuille farmaseuttisesti hyväksytyille periaatteille, eli aktiivista ainesosaa tulee olla 1-200 mg/kg, mieluummin 2-50 mg/kg. Annos voidaan antaa päivittäin tai joka toinen päivä, päiväannos voidaan antaa yhtenä kerta-annoksena tai jakaa useaan pienempään annokseen. Suojaamattomia yhdisteitä, eli niitä jotka elimistön sulfotransferaasit tai sulfataasit voivat sulfatoida, on suositeltavaa antaa ylimäärä. Tällä varmistetaan riittävä aktiivisen aineen saanti, varsinkin jos sulfataa-

sit eivät ole aktiivisia kudosvaurioalueella. On suositeltavaa antaa suojaamattomia yhdisteitä päivittäin, kun taas suojattuja yhdisteitä voidaan antaa joko päivittäin tai joka toinen päivä. Kaavan I mukaisella DHEA:lla tai DHEA-johdannaisilla potilasta hoidetaan 3-30 päivää, mieluiten 7-14 päivää, infarktin tai trauman jälkeen.

Jos potilaalla on suuri sydäninfarktin tai reperfuusiovaurion riski, tällaiseen infarktiin tai reperfuusiovaurioon liittyvää progressiivista iskemiaa on mahdollista estää tai sen vaikutuksia vähentää antamalla potilaalle kaavan I mukaista DHEA:ta tai DHEA-johdannaista ennen infarktia tai reperfuusiovauriota, samanaikaisesti infarktin tai reperfuusiovaurion kanssa tai niiden jälkeen edellä kuvatuin annoksin. Sydäninfarktin jälkeinen hoito on kuten edellä kuvattu. DHEA:ta tai DHEA-johdannaista voidaan antaa potilaalle, jolla on uhkaavan sydäninfarktin klassisia oireita, kuten hoitoa sellaisen infarktin yhteydessä on edellä kuvattu.

Potilaat, joilla on suuri bakteerien translokaation riski, bakteerien translokaatiota voidaan estää tai sen vaikutuksia vähentää antamalla kaavan I mukaista DHEA:ta tai DHEA-johdannaista edellä kuvatuin annostuksin. Lääkettä annetaan bakteerien translokaation estämiseksi tai sen vaikutusten vähentämiseksi niin kauan, ettei potilaalla ole enää bakteerien translokaation vaaraa.

On havaittu, että kaavan I mukaista DHEA:ta tai DHEA-johdannaista on ratkaisevan tärkeää antaa pian reperfuusiovaurion, infarktin tai trauman jälkeen, jotta soluvauriot voitaisiin estää. Jos näiden yhdisteiden antaminen viivästyy, verisuonet tukkeutuvat (koska neutrofiilit kiinnittyvät endoteelisolujen pintaan) eikä näiden yhdisteiden antaminen enää pysty estämään tai vähentämään iskemiaa. Aikaväli, jonka sisällä ainetta olisi ryhdyttävä antamaan riippuu reperfuusiovaurion, infarktin tai trauman tyypistä, ja voidaan määrittää sopivien eläinmallien avul-

la. On kuitenkin suositeltavaa aloittaa DHEA:n tai DHEA-johdannaisen antaminen neljän tunnin kuluessa, ja kaikkein suositeltavimmin kahden tunnin kuluessa iskemiasta, infarktista tai traumasta. DHEA:n tai DHEA-johdannaisten antaminen bakteerien translokaation estämiseksi tai sen vaikutusten vähentämiseksi tulisi aloittaa 24 tunnin kuluessa vaurion synnystä tai stressin aiheuttaneesta tilanteesta. On suositeltavaa aloittaa näiden yhdisteiden antaminen bakteerien translokaation estämiseksi tai sen vaikutusten vähentämiseksi neljän tunnin, vielä suositeltavammin, kahden tunnin kuluessa vamman synnystä. DHEA:n tai DHEA-johdannaisten antaminen ARDS:n estämiseksi tai sen oireiden vähentämiseksi tulisi aloittaa ennen kliinisten oireiden ilmenemistä. Yleensä yhdisteitä annetaan potilaille, joilla on ARDS:n riski.

Seuraavassa kuvataan esimerkkejä tämän keksinnön toteutusmuodoista, jotka eivät kuitenkaan rajoita keksinnön käyttöaluetta. Tämän esityksen perusteella alan asiantuntija voi soveltaa patenttivaatimuksien puitteissa monenlaisia keksinnön toteutusmuotoja. Alla esitettävissä esimerkeissä on käytetty alalla hyvin tunnettuja tekniikoita.

ESIMERKKI 1

Kokeellinen palovammamalli

Kehitettiin kokeellinen palovammamalli, jossa palovamma aiheutettiin hiiren korvaan ja jossa lämpötila ja altistusaika määritettiin empiirisesti. Näissä oloissa käsittelemättömien hiirien korviin aiheutettu minimaalinen palovamma eteni täydelliseen kudosnekroosiin 24-72 tuntia palovamman synnystä. Iältään noin 9 viikon ikäisten Balb/c hiirten ryhmät merkittiin yksilöllisesti ja jaettiin verokkiryhmiin ja käsiteltyjen eläinten ryhmiin. Kuumaan veteen upotettavan korvan paksuus mitattiin ja nukutetun hiiren koko korva upotettiin 52°C:een veteen täsmälleen 24 sekunniksi. Hiirille annettiin ruiskeena joko propeenigly-

kolikantaja-ainetta (verrokkiryhmä) tai 100 µg testiainetta liuotettuna propeeniglykoliin ja hiiret vietiin häkkeihinsä. Yksittäisten hiirten korvan turpoamista seurattiin ennen palovammaa ja useita tunteja palovamman jälkeen.

ESIMERKKI 2

DHEA:n vaikutus palovammamallissa

Iältään 9 viikkoiset Balb/c hiiret merkittiin yksilöllisesti ja jaettiin verrokkiryhmään ja käsiteltyjen eläinten ryhmään. Kuumaan veteen upotettavan korvan paksuus mitattiin ja nukutetun hiiren koko korva upotettiin 52°C:een veteen täsmälleen 24 sekunniksi. Hiirille annettiin ruiskeena joko propeeniglykolia (verrokkiryhmä) tai 100 µg testiainetta liuotettuna propeeniglykoliin ja hiiret vietiin häkkeihinsä. Yksittäisten hiirten korvan turpoamista seurattiin ennen palovammaa ja 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 ja 48 tuntia palovamman aiheuttamisen jälkeen.

Verrokkiryhmän ja DHEA:lla käsiteltyjen hiirten edeeman muodostumisen ja sen resoluution analyysin tulokset nähdään kuvassa 1. Korvan turpoaminen saavutti huippunsa sekä DHEA:lla käsiteltyjen hiirten ryhmässä että verrokkiryhmässä kuuden tunnin kuluttua palovammasta. Korvan turvotus alkoi laskea käsittelemättömän ryhmän hiirillä 12 tunnin kuluessa ja laski nopeasti seuraavat 12 tuntia. 24-48 tunnin kuluttua palovamman synnystä verrokkiryhmän mittaukset oli keskeytettävä, koska alkuperäisen staasivyöhykkeen hiussuoniston täydellisen okkluusion johdosta korvakudos tuhoutui täysin. Käsittelemättömän ja DHEA:lla käsitellyn ryhmän edeeman kineettinen analyysi osoitti, että ensimmäisten 24 tunnin tapahtumat palovamman jälkeen ovat ratkaisevia vaurioituneen kudoksen elinkyvylle niin, että korvakudoksen säilyminen elinkykyisenä 48 tunnin kuluttua palovammasta on kääntäen verrannollinen turvotuksen laskeutumisnopeuteen 6 tunnin turvotushuipun ja lopullisen 48 tunnin välillä.

Käsittelemättömän ja DHEA:lla käsitellyn ryhmän palovamman edeema-analyysin lisäksi itse korvakudoksen elinkykyisyyden muutokset valokuvattiin. Vain kantaja-ainetta saaneiden hiirten korvakudoksen vauriot olivat laajoja, ja jopa 70 % korvakudoksesta nekrotisoitui ja tuhoutui 48 tunnin kuluessa. Koko affektoitunut alue näytti käsittävän sekä täydellisen vaskulaarisen okkluusion vyöhykkeen että staasivyöhykkeen. Staasivyöhykkeen vaurioituminen oli palovamman sekundaarinen seuraus; tila, jota kuvaa palovamman jälkeinen progressiivinen dermaalinen iskemia. DHEA:lla käsiteltyjen hiirten vammat eivät olleet laajoja ja palaneen korvakudoksen palautuminen normaalitilaan oli havaittavissa kineettisesti. Ainoa korvakudoksen alue, johon palovammalla oli selvästi vaikutusta mutta joka ei kuitenkaan tuhoutunut lopullisesti vastasi alkuperäisen täydellisen vaskulaarisen okkluusion vyöhykettä.

ESIMERKKI 3

Eri yhdisteiden vaikutus palovammamallissa

Iältään 9-viikkoiset palovamman saaneet Balb/c hiiret jaettiin eri ryhmiin, joille annettiin vain kantaja-ainetta, DHEA:ta, androsteenidiolia, 16α-bromo-DHEA:ta, androsteenidionia tai anti-glukokortikoidia: RU486:ta. Yksittäiset hiiret saivat 100 µg jotakin edellä mainituista steroideista tai vain kantaja-ainetta heti palovamman aiheuttamisen jälkeen (0. päivä), ja 50 µg:n annoksen siitä eteenpäin 24 tunnin välein koko kokeen keston ajan. Kunkin yksilöllisesti merkityn hiiren korvan turpoaminen mitattiin ennen koetta ja 12, 24 ja 48 tuntia palovamman aiheuttamisen jälkeen.

Kun hiirille annettiin terapeuttisia annoksia androsteenidiolia, DHEA:ta tai hajoamattomia synteettisiä DHEA-johdannaisia, 16α-bromo-DHEA:ta, niiden korvat turposivat huomattavasti palovamman seurauksena (Kuva 2) ja turvotus hävisi hitaasti ja tasaisesti. Palovamman synnyn jälkeiseen

korvan hitaaseen edeeman resoluutioon liittyy vain minimaalinen dermaalinen iskemia ja nekroosi. Tämän tutkimuksen tulokset myös vahvistavat sen, että käsittelemättömien hiirten korvan palovamman edeema kehittyi ja turvotus myös laski varsin nopeasti, ja 24-48 tunnin kuluessa palovammasta kehittyi huomattava kudosten iskemia ja nekroosi. Samantyyppinen edeema ja sen resoluutio, jota seurasi progressiivinen iskeeminen nekroosi, havaittiin myös androsteenidionilla tai RU486:lla käsitellyillä hiirillä, mikä viittaa siihen, että DHEA:n vaikutukset eivät ole yksinomaan anti-glukokortikoidiperäisiä.

Kuvissa 3A-3C nähdään DHEA:n, androsteenidiolin ja 16α-bromo-DHEA:n kyky suojella korvaa lähes kaikilta palovamman aiheuttamilta iskeemisiltä vaikutuksilta. Kun hiiriä on käsitelty jollakin näistä steroidihormoneista, niiden korvakudoksessa ilmenee varhaisia muutoksia, mutta korvakudosta tuhoutuu vain vähän tai ei lainkaan palovamman syntyä seuraavien päivien aikana. Vamma-alue näyttää vastaavan Boykinin (13) määrittämää täydellisen okkluusion vyöhykettä. Hiiret, joille on annettu vain kantaja-ainetta, androsteenidionia tai RU486:ta (Kuvat 3D-3F) palovamman aiheuttamisen jälkeen, menettävät > 70 % altistetusta korvakudoksesta palovammaa seuraavien 48 tunnin aikana palovamman jälkeisen progressiivisen iskeemisen nekroosin johdosta. Ilman tehokasta hoitoa vaurioituneen korvan nekrotisoitunut alue käsitti täydellisen okkluusion vyöhykkeen ja staasivyöhykkeen. Kokeissa osoitettiin, että palovammahiirien hoito joko DHEA:lla, androsteenidiolilla tai 16α-bromo-DHEA:lla ei muuta ainoastaan korvaan muodostuvan edeeman kehityskaarta vaan suojelee jollakin tavoin vamma-alueen ihoa progressiivisilta vaurioilta estämällä iskemian ja sitä seuraavan nekroosin kehittymisen staasivyöhykkeellä.

Samantyyppisissä kokeissa havaittiin, ettei 16α-hydroksi-DHEA antanut yhtä hyvää suojaa: se vähensi progressiivisen iskemian laajuutta, muttei täysin estänyt sitä, ja 16α-

kloro-DHEA antoi hieman suojaa progressiivista iskemiaa vastaan.

ESIMERKKI 4

DHEA:n alkuannostuksen ajoitus

Kokeen tarkoitus oli määrittää DHEA:n antamisen ajankohta: onko DHEA annettava heti vai voidaanko sen antamista viivyttää jopa useita tunteja palovamman aiheuttamisen jälkeen. Hiiret nukutettiin ja niille aiheutettiin palovamma ja sen jälkeen neljälle hiirelle annettiin nukutuksessa kantaja-ainetta, neljälle 100 µg DHEA:ta. Loput hiiret jaettiin vielä useaan neljän hiiren ryhmään. Kunkin ryhmän jokaiselle hiirelle annettiin 100 µg DHEA:ta yksi, kaksi, neljä tai kuusi tuntia palovamman synnystä. Kunkin hiiren korvan kudostuho arvioitiin 72 tunnin kuluttua palovammasta, ja mittaustulokset esitetään Kuvassa 4.

Kuvasta 4 nähdään, että DHEA:n antamista voidaan viivyttää jopa kaksi tuntia ilman merkitsevää eroa DHEA:n suojaavan vaikutuksen keskiarvoon 1,25 +/- 0,25 ($p = <0,001$). Kun DHEA:n antamista viivytettiin neljään tuntiin, keskiarvo oli 2,75 +/- 0,479 ($p = <0,016$). Kun DHEA:n antamista viivyttiin 6 tuntia, kudostuhon keskiarvo oli 4,0 +/- 0,408 ja se poikkesi jo merkitsevästi ryhmästä, joka sai DHEA:ta heti palovamman aiheuttamisen jälkeen ($p = < 0,058$). Tästä tehtiin johtopäätös, että nekroosiin johtavat vauriot ovat palautuvia, vaikka DHEA:ta annetaan vasta useita tunteja palovamman jälkeen.

Edellä mainitut esimerkit osoittavat, että hiiren korvaan aiheutettu keskivaikea palovamma on luotettava ja toistettavissa oleva malli, jonka avulla voidaan tutkia ihon progressiivista iskeemista nekroosia. Tulokset viittaavat siihen, että DHEA:n antaminen välittömästi palovamman jälkeen suojelee ihoa palovamman aiheuttamalta dermaaliselta iskemialta. DHEA:n lisäksi useiden muiden steroidi-

hormonien terapeuttisia vaikutuksia on kokeellisesti testattu (ks. Taulukko 1).

TAULUKKO 1

Testatut steroidihormonit (100 µg/hiiri)	Progressiivisen iskemia-analyysin tulokset (hiiren korvamalli)
DHEA-S	ei suojaa
DHEA	suojaa
16Ó-bromo-DHEA	suojaa
androsteenidioli	suojaa
androsteenidioni	ei suojaa
RU486	ei suojaa

DHEA:n lisäksi myös androsteenidiolilla ja 16α-bromo-DHEA:lla oli selvästi suojaavia ominaisuuksia niin, että 90-100 % korvakudoksesta säilyi vaurioitumattomana kaksi viikkoa, kokeen päättymiseen asti, jolloin haava oli parantunut. 16α-hydroksi-DHEA ei suojannut yhtä hyvin ja 16α-kloro-DHEA oli hieman suojaava. DHEA-sulfaatti, androsteenidioni ja RU486 eivät suojanneet lainkaan: korvan vaurioituminen ja kudostuho kaikilla eläimillä oli samaa luokkaa kuin käsittelemättömillä verrokeilla 48 tunnin kuluttua palovamman synnystä. Suojaavan steroidin erottaminen ei-suojaavasta steroidista tässä palovammamallissa on luultavimmin helpompaa sen vuoksi, että palovamman suorat tai välittömät vaikutukset hiiren korvaan ovat vähäiset, ja suurin osa syntyvästä vauriosta johtuu progressiivisesta iskemiasta ja nekroosista, jotka taas aiheuttaa yksilön reaktio palovammaan.

Tulokset viittaavat siihen, että DHEA on se tekijä - ei mikään sen luonnollinen hajoamistuote - jolla on progressiivista iskeemista nekroosia suojaavia vaikutuksia. Tämän johtopäätöksen perusta on yksinkertainen. 16α-bromo-DHEA on DHEA:n analogi, joka ei tehokkaasti hajoa muiksi androgeenisteroideiksi ja se suojaa iskeemiselta nekroosilta yhtä hyvin kuin DHEA. Androsteenidiolilla on samanlaiset

biologiset vaikutukset palovamman korvamallissa kuin DHEA:lla. Tämä steroidi on taas DHEA:n luonnollinen hajoamistuote, joka voidaan entsyymien avulla konvertoida takaisin DHEA:ksi. Androsteenidioli voi vielä hajota testosteroniksi. Myös androsteenidioni on DHEA:n sekundäärinen metaboliitti, mutta se voi konvertoitua vain alavirtaan (eli testosteroniksi ja estrogeeniksi) eikä sitä voida enää konvertoida DHEA:ksi. Koska tässä mallissa androsteenidioni ei suojaa progressiivista dermaalista iskemiaa vastaan, sen vähäinen vaikutus tukee johtopäätöstä, jonka mukaan aktiivinen steroidi on juuri DHEA, eikä sen hajoamistuote androgeeni tai estrogeeni. Sen lisäksi havaittiin, että sulfatoitu DHEA, jota esiintyy luonnollisesti ihmiskehossa, ei kykene suojaamaan progressiiviselta iskemialta.

Eräiden julkaisujen mukaan DHEA:lla on kyky voittaa joitakin glukokortikoidien aiheuttamista biologisista vaikutuksista. Mahdollisuus että DHEA:lla olisi anti-glukokortikoidisia vaikutuksia hiiren korvan palovammamallissa testattiin antamalla hiirille tunnettua anti-glukokortikoidia, RU486:ta, heti palovamman aiheuttamisen jälkeen. Kuten tämän mallin yhteydessä on havaittu ja koeoloissa testattu, anti-glukokortikoideja sisältävillä aineilla ei ollut suojaavaa vaikutusta.

ESIMERKKI 5

DHEA:n vaikutukset reperfuusiovaurioon

130-170 g:n painoiset Sprague-Dawley koirasrotat jaettiin sattumanvaraisesti kolmeen ryhmään esikäsittelytavan mukaan: ei-esikäsittelyä, kantaja-aine-esikäsittely tai DHEA-esikäsittely (4 mg/kg). Eläimille annettiin kantaja-ainetta tai DHEA:ta päivää ennen leikkausta ja leikkauspäivänä. Eläimet nukutettiin antamalla pentobarbitaalia (60-70 mg/kg) intraperitoneaalisesti. Rotat sijoitettiin lämpölevylle ja niiden ruumiin lämpötila (mitattiin peräsuolesta) pidettiin 35-37°C:ssa. Kiveksenkohottajalihas ja sen hermo-

verisuonirunko tunnistettiin normaaleja tekniikoita käyttäen (39-41). Lyhyesti, ihoviilto tehdään suoliluun etukärjestä kivespussin kärkeen. Kives ja ehjä kiveksenkohottajalihas leikataan irti kivespussista. Kiveksenkohottajalihaksen ventraalipuolelle tehdään 1 cm:n viilto, ja kives sekä siemennuora poistetaan. Hermo-verisuonirunko jossa sijaitsevat kives- ja vatsanseinämävaltimot, laskimo ja genitaali-reisihermo eristetään mikroskoopin alla täydellisesti erottamalla ne ulommasta lonkkavaltimosta ja laskimosta verisuonten lähtökohtaan saakka. Lopuksi pussimaisen kiveksenkohottajalihaksen etuseinämä avataan ja kudoskaistale asetetaan paikalleen intravitaalista videomikroskopointia varten. Rotta asetetaan tukevasti erityisesti suunniteltuun altaaseen, ja kiveksenkohottajalihaksen kaistale levitetään peitinlasin päälle altaan pohjassa olevan aukon kohdalle ja kiinnitetään paikalleen 5-0-silkkiompeleella. Koejärjestelyä valaistaan alhaalta päin kuituoptisella volframilampulla. Lihas pidetään kosteana ja peitetään läpäisemättömään muovikalvoon. Erityisesti lämpötilan tarkkaan valvontaan suunniteltu allas täytetään 0,9 % suolaliuoksella ja lämpötila pidetään 35-36°C:ssa. Mikroskooppiin on kiinnitetty värivideokamera. Hiussuoniston videokuva nähdään 19" monitorista, jonka täysi suurennos on x 1800. Kun lihas on eristetty, hiussuoniston aktiviteetti mitataan pre-iskeemisen lähtötason määrittämiseksi. Asianmukaisesti kiinnitetyillä puristimilla estetään verenvirtaus lihaskaistaleeseen täydellisesti. Iskemian aika on kuusi tuntia. Sen jälkeen puristimet poistetaan reperfuusion indusoimiseksi, ja hiussuoniston aktiviteettia mitataan 30, 60 ja 90 minuutin kuluttua reperfuusion alkamisesta. Kaikilla koe-eläimillä iskeemisen vaiheen jälkeen veri alkaa virrata uudelleen, ja virtaa myös alkuvaiheen jälkeen hiussuonistossa. Tätä aktiivista verenvirtausta seuraa huomattava reperfuusiovaurio, ja verenvirtaus lakkaa.

Kiveksenkohottajalihaksen hiussuoniston tilaa arvioitiin ennen iskemiaa ja reperfuusion jälkeen seuraavin menetel-

min:

1) Perfusoitujen hiussuonien tiheys. Perfusoitujen hiussuonien tiheys lihaskaistaleen kullakin kolmella alueella (vyöhykkeet 1, 2 ja 3) määritettiin laskemalla niiden hiussuonten määrä, joissa tapahtuu verenvirtausta ennalta valitun hiussuonenjälkeisen pikkulaskimon läheisyydestä. Yhdeksän näkyvää kapillaarialuetta lasketaan kunkin hiussuonenjälkeisen pikkulaskimon alueella, yhteensä 27 aluetta yhdessä kiveksenkohottajalihaksen kudoskaistaleessa. Tulokset esitetään kuvissa 5A (vyöhyke 1), 5B (vyöhyke 2) ja 5C (vyöhyke 3).

2) Leukosyyttilaskenta hiussuonenjälkeisissä pikkulaskimoissa. Videokuva otetaan kolmen ennalta valitun hiussuonenjälkeisen pikkulaskimon proksimaalisella, keskialueella ja distaalisella alueella. Kunkin pikkulaskimon läpi kulkevien, endoteeliin takertuvien ja endoteelin läpi vaeltavien leukosyyttien määrät lasketaan kahden minuutin ajan. Tulokset esitetään Kuvissa 6A (läpi kulkevat), 6B (takertuvat) ja 6C (endoteelin läpi vaeltavat).

3) Punasolujen nopeudet A1 (1. luokka) ja A2 (2.luokka) -luokan arterioleissa
Punasolujen nopeudet mitataan kiveksenkohottajalihaksen tärkeimmissä valtimoissa käyttämällä erikoisvalmisteista optista Doppler-nopeuslaskuria. Tulokset esitetään kuvissa 7A (laskimoveren nopeus) ja 7B (valtimoveren nopeus).

A. Käsittelemättömien ja kantaja-aineella käsiteltyjen rottien reperfuusiovauriot

Kuusi rottaa ei saanut minkäänlaista esi-käsittelyä ja kuusi sai kantaja-aine-esikäsittelyn. Kun rottia oli pidetty kuusi tuntia iskeemisissä oloissa ja 90 minuuttia oli kulunut reperfuusiosta, verisuonten kautta kulkevien, niiden seinämiin takertuvien ja endoteelin läpi vaeltavien leukosyyttien määrät lisääntyivät tuntuvasti 60 minuutin

sisällä reperfuusiosta ja niiden lisääntyminen jatkui vielä 90 minuutin kuluttua (kuvat 6A-6C). Virtaavien hiussuonien absoluuttinen määrä väheni dramaattisesti sekä 30 että 60 minuutin kuluttua reperfuusiosta, ja virtauksen väheneminen jatkui vielä 90 minuuttia reperfuusion jälkeen (kuvat 5A-5C). Samoin A2-luokan verisuonten punasolujen nopeudet hidastuivat merkittävästi 60 ja 90 minuuttia reperfuusion jälkeen (kuvat 7A ja 7B).

B. DHEA:lla käsiteltyjen rottien reperfuusiovaurio

Rotille, joille annettiin päivää ennen leikkausta ja leikkauspäivänä ruiskeena ihon alle 4 mg/kg DHEA:ta, mitattiin terapian erittäin merkittävä suojaava vaikutus. Kaikilla kolmella mittausmenetelmällä saadut arvot olivat lähellä normaaleja tai vastasivat täysin normaaleja arvoja. Oli myös erittäin tärkeää havaita, että kaikkina mittausajankohtina endoteelin adhesiiviset ominaisuudet eivät muuttuneet lähtöarvoista. Verisuonten läpi kulkevien, niiden seinämiin takertuvien ja endoteelin läpi vaeltavien leukosyyttien määrät vastasivat lähestulkoon lähtöarvoja (kuvat 6A-6C) A2-luokan arteriolien punasolujen nopeudet palautuivat kuitenkin hitaammin normaaliin. Joillakin alueilla nopeudet olivat 75 % normaalista 90 minuutin kuluttua reperfuusiosta (kuvat 7A ja 7B). 90 minuutin kuluttua hiussuonten virtaavien kapillaarien määrä ei eronnut merkittävästi ennen iskemiaa mitatuista lähtöarvoista (kuvat 5A-5C).

Sitoutumatta mihinkään fysiologiseen tai biokemialliseen teoriaan kaavan I mukaisen DHEA:n tai DHEA-johdannaisten toiminnasta, näiden yhdisteiden anti-iskeemisten vaikutusten uskotaan johtuvan niiden kyvystä vaikuttaa neutrofiilien kiinnittymiseen endoteelisolujen pintaan. Nämä yhdisteet kykenevät estämään tai vähentämään tehokkaasti iskemiaa, jonka voivat aiheuttaa erityyppiset kudosvauriot, joiden vaikutuksia voidaan lieventää vaikuttamalla endoteelisolujen adhesiivisiin ominaisuuksiin. Kun neutrofii-

lien adheesio estetään, estetään myös niiden aktivaatio ja vaeltaminen endoteelin kudospuolelle. Kun neutrofiilien siirtyminen endoteelin kudospuolelle on torjuttu, torjutaan myös neutrofiilien aiheuttama huomattava vaurio endoteeli- ja parenkyymisoluille. Kun neutrofiilien aktivaatio on ehkäisty, ehkäistään myös trombosyyttien aggregaatioon johtavien neutrofiilien indusoimien solutekijöiden tuotanto. Näin estetään tai vähennetään progressiivista kudosnekroosia. Samantyyppiset mekanismit aiheuttavat myös suolen progressiivisen iskemian (joka johtaa bakteerien translokaatioon) sekä alveolien seinämien (joka johtaa ARDS:ään), ihon ja sydänlihaksen iskemian. Nämä yhdisteet estävät tai vähentävät siten tehokkaasti myös bakteerien translokaatiota ja ARDS:ää.

Tässä patenttihakemuksessa on esitetty esimerkinomaisesti joitakin tämän keksinnön toteutusmuotoja, jotka eivät mitenkään rajoita tämän keksinnön käyttöaluetta. Alan ammattilaiselle on selvää, että keksinnön erilaiset sovellusmuodot voivat vaihdella jäljempänä esitettävien patenttivaatimusten puitteissa.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Rodgers, G.M. (1988). FASEB J 2: 116-123.
2. Hernandez, L.A. et al. (1987). Am. J. Physiol. 253 (Heart Cir. Physiol. 22): H699-H703.
3. Lucchesi, B.R. (1990). Am. J. Cardiology 65: 141-231.
4.Lehr, H.A. et al. (199). J. Clin. Invest. 87: 2036-2041.
5. Entman, M.L. et al. (1991). FASEB J 5: 2529-2537.
6. Weyrich, A.S. et al. (1993). J. Clin. Invest. 91: 2620-2629.
7.Lefer, A.M. et al. (1991). FASEB J 5: 2029-2034.
8. Brown, J.M. et al. (1988). J. Clin. Invest. 81: 1297-1301.
9. "Cellular Injury and Adaptation," in Pathologic Basis of Disease, Cotran et al., Eds., WB Saunders, Philadelphia, pp. 1-81 (1989).
10. Robson, M.C. et al. (1979). Plastic and Reconstructive Surgery 63: 781-787.
11. Robson, M.C. et al. (1980). J. Trauma 20: 722-725.
12. Rockwell, W.B. and Ehrlich, H.P. (1992). J. Burn Care Rehab 13: 403-406.
13. Boykin, J.V. et al. (1980). Plastic Reconstruct. Surgery 66: 191-198.
14. Erhlich, H.P. (1984). J. Trauma 24: 311-318.
15. Erhlich, H.P. (1987). J. Trauma 27: 420-424.
16. Mileski, W. et al. (1992). J. Sugg. Res. 52: 334-339.
17. Morehouse, J.L. et al. (1986). Gastroenterol 91: 673-682.
18. Maejimak, et al. (1984). Arch.Surg. 119: 166-172.
19. Czaja, A.J. et al. (1974). N. Engl. J. Med. 291: 925-929.
20. Seavitt, S. (1967). Br. J. Surg. 54: 32-41.
21. Desai, M.H. et al. (1991). Surgery, Gyn. Obstet. 172: 257-261.
22. Deitch. E.A. and R. Berg (1987). J. Burn Rehab. 8: 475-482.
23. Edmiston, C.E. and R.E. Condon (1991). Surgery, Gyn.

Obstet. 173: 73-83.

24. Deitch, E.A. (1990). Arch. Surg. 125: 403-404.

25. Saadia, R. et al. (1990). Br. J. Surg. 77: 487-492.

26. Mainous, M.R. et al. (1991). Arch. Surg. 126: 33-37.

27. Vaughan, W.G. et al. (1992). J. Ped. Surg. 27: 968-973.

28. Deitch, E.A. et al. (1992). Circ. Shock 36: 206-216.

29. Fukushima, R. et al. (1992). Ann. Surg. 216: 438-444.

30. Tokyay, R. et al. (1992). J. Trauma 32: 704-713.

31. Simon, R.H. and Ward, P.A. (1992). In Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, 2nd Ed., Galin, J.I. et al., Eds., Raven Press, Ltd., New York, pp. 999-1016.

32. Araneo, B.A. et al. (1993). Arch. Surg. 128: 318-325.

33. Eich, D.M. et al. (1992). U.S. Patent 5,110,810.

34. Eich, D.M. et al. (1992). U.S. Patent 5,162,198.

35. Nestler, J.E. et al. (1990). U.S. Patent 4,920,115.

36. Kent, S. (1982). Geriatrics 37: 157-159.

37. Jackson (1953). British J. Surg. 40: 588-593.

38. Ericksson, E. et al. (1980). Microvascular Res. 19: 374-379.

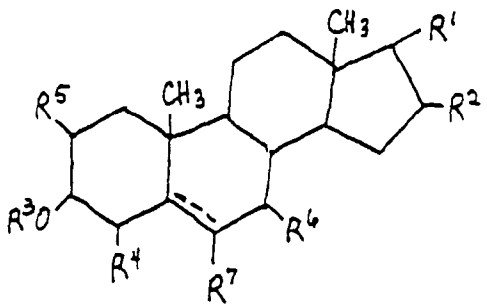
39. Anderson, G.L. et al. (1988). Microvascular Res. 36: 56-63.

40. Siemionow, M. et al. (1991). Microcirc. Endoth. Lymphatics 7: 183-197.

41. Sieminow, M. et al. (1993). J. Hand Surgery 18A: 963-971.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä, jolla ehkäistään tai vähennetään kudostuhoa, jota aiheuttaa neutrofiilien kiinnittyminen endoteelisoluihin, **tunnettu** siitä, että kudosvaurion saaneelle potilaalle annetaan vaikuttava määrä alla olevassa kuvassa esitetyn kaavan mukaista yhdistettä,



jossa

R^1 on =O tai OH-ryhmä;

R^2 on H, CH_3, OH tai halogeeni, kun R^1 on =O, ja R^2 on H kun R^1 on OH-ryhmä;

R^3 on H, rasvahappo, C_{1-10}-alkyyli-, C_{1-10}-alkeeni-, C_{1-10}-asetyleeni-, $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkyyli-, $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkeeniryhmä tai -CO-R^8;

R^4 ja/tai R^5 on H, OH, halogeeni tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^6 on H, OH tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^7 on H, kun katkoviiva on kaksoissidos, =O tai H; ja halogeeni kun katkoviiva on yksinkertainen sidos tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^8 on H, rasvahappo, C_{1-10}-alkyyli-, C_{1-10}-alkeeni-, C_{1-10}-asetyleeni- $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkyyli- tai $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkeeniryhmä;

X on eri tai sama ja on halogeeni, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkeeni, C_{1-4}-alkoksi-, karboksi-, nitro-, sulfaatti-, sulfonyyli-, C_{1-6} karboksyyli- tai C_{1-6} sulfaattiesteri; ja n on O, 1, 2 tai 3.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sanottu kudosvaurio on minkä tahansa verisuonellisen kudoksen reperfuusiovaurio.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että potilaalla on jokin trauma, ja tämä trauma on palovamman, leikkauksen, kemiallisen palovamman, tylpällä esineellä aiheutetun vamman tai laseraation tulos.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että trauma on palovamma.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että potilaalla on infarkti.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että infarkti on sydänlihasinfarkti.

7. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sanottua yhdistettä annetaan neljän tunnin sisällä kudosvauriosta.

8. Jonkin edellisista patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sanottua yhdistettä annetaan kahden tunnin sisällä kudosvauriosta.

9. Patenttivaatimuksen 2, 5 tai 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sanottua yhdistettä annetaan ennen kudosvauriota.

10. Jonkin edellisista patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistettä annetaan 1-200

mg/kg.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistettä annetaan 2-50 mg/kg.

12. Jonkin edellisista patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistettä annetaan yhtenä kerta-annoksena tai useina pienempinä annoksina.

13. Jonkin patenttivaatimuksista 1-12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^3 on H tai rasvahappo.

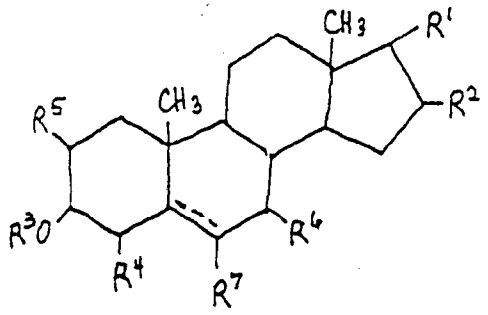
14. Jonkin patenttivaatimuksista 1-12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O ja R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

15. Jonkin patenttivaatimuksista 1-12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on -OH ja R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

16. Jonkin patenttivaatimuksista 1-12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O, R^2 on Br ja R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

17. Jonkin patenttivaatimuksista 1-12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O, R^2 on OH ja R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

18. Menetelmä, jolla ehkäistään tai vähennetään bakteerien translokaatiota, **tunnettu** siitä, että potilaalle jolla on suuri bakteerien translokaation riski, annetaan terapeuttisesti vaikuttava määrä yhdistettä, jonka kaava on



jossa

R^1 on =O tai OH-ryhmä;

R^2 on H, CH_3, OH tai halogeeni, kun R^1 on =O ja R^2 on H kun R^1 on OH-ryhmä;

R^3 on H, rasvahappo, C_{1-10}-alkyyli-, C_{1-10}-alkeeni-, C_{1-10}-asetyleeni-, $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkyyli-, $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkeeniryhmä tai -CO-R^8;

R^4 ja/tai R^5 on H, OH, halogeeni tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^6 on H, OH tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^7 on H, kun katkoviiva on kaksoissidos, =O tai H, ja halogeeni kun katkoviiva on yksinkertainen sidos tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^8 on H, rasvahappo, C_{1-10}-alkyyli-, C_{1-10}-alkeeni-, C_{1-10}-asetyleeni- $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkyyli- tai $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkeeniryhmä;

X on eri tai sama ja on halogeeni, C_{1-4}-alkyyli, C_{1-4}-alkeeni-, C_{1-4}-alkoksi-, karboksi-, nitro-, sulfaatti-, sulfonyyli-, C_{1-6}-karboksyyli- tai C_{1-6}-sulfaattiesteri; ja

n on 0, 1, 2 tai 3.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sanottu yhdiste annetaan neljän tunnin kuluessa sanotusta bakteerien translokaation riskistä.

20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sanottu yhdiste annetaan kahden tunnin kuluessa sanotusta bakteerien translokaation riskistä.

21. Jonkin patenttivaatimuksista 18-20 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistettä annetaan 1-200 mg/kg.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistettä annetaan 2-50 mg/kg.

23. Jonkin patenttivaatimuksista 18-22 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^3 on H tai rasvahappo.

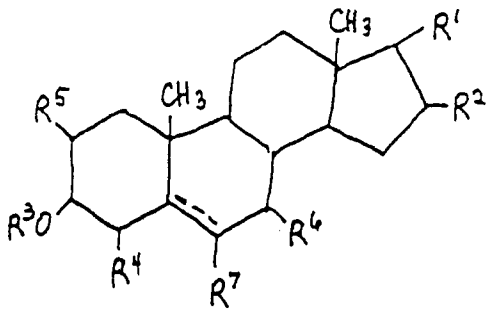
24. Jonkin patenttivaatimuksista 18-22 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O ja R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

25. Jonkin patenttivaatimuksista 18-22 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on -OH ja R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

26. Jonkin patenttivaatimuksista 18-22 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O, R^2 on Br ja R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

27. Jonkin patenttivaatimuksista 18-22 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O, R^2 on OH ja R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

28. Menetelmä, jolla ehkäistään tai vähennetään aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymää (ARDS) potilailla, joilla on suuri ARDS:n riski, **tunnettu** siitä, että potilaalle annetaan terapeuttisesti vaikuttava määrä yhdistettä, jonka kaava on



jossa

R^1 on =O tai OH-ryhmä;

R^2 on H, CH_3, OH tai halogeeni, kun R^1 on =O ja R^2 on H kun R^1 on OH-ryhmä;

R^3 on H, rasvahappo, C_{1-10}-alkyyli-, C_{1-10}-alkeeni-, C_{1-10}-asetyleeni-, $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkyyli-, $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkeeniryhmä tai -CO-R^8;

R^4 ja/tai R^5 on H, OH, halogeeni tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^6 on H, OH tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^7 on H, kun katkoviiva on kaksoissidos, =O tai H, ja halogeeni kun katkoviiva on yksinkertainen sidos tai ryhmä, joka ei vaikuta anti-iskeemiseen toimintaan, mutta joka estää R^3:n konversion H:sta SO_3:ksi;

R^8 on H, rasvahappo, C_{1-10}-alkyyli-, C_{1-10}-alkeeni-, C_{1-10}-asetyleeni- $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkyyli- tai $(X)_n$-fenyyli-C_{1-5}-alkeeniryhmä;

X on eri tai sama ja on halogeeni, C_{1-4}-alkyyli-, C_{1-4}-alkeeni-, C_{1-4}-alkoksi-, karboksi-, nitro-, sulfaatti-, sulfonyyli-, C_{1-6}-karboksyyli- tai C_{1-6}-sulfaattiesteri; ja

n on 0, 1, 2 tai 3.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sanottua yhdistettä annetaan ennen ARDS:n kliinisten oireiden ilmenemistä.

30. Patenttivaatimuksen 28 tai 29 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistettä annetaan 1-200 mg/kg.

31. Patenttivaatimuksen 28 tai 29 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistettä annetaan 2-50 mg/kg.

32. Jonkin patenttivaatimuksista 28-31 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^3 on H tai rasvahappo.

33. Jonkin patenttivaatimuksista 28-31 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O ja R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

34. Jonkin patenttivaatimuksista 28-31 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on -OH ja R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

35. Jonkin patenttivaatimuksista 28-31 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O, R^2 on Br ja R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

36. Jonkin patenttivaatimuksista 18-22 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että R^1 on =O, R^2 on OH ja R^3, R^4, R^5, R^6 ja R^7 ovat H.

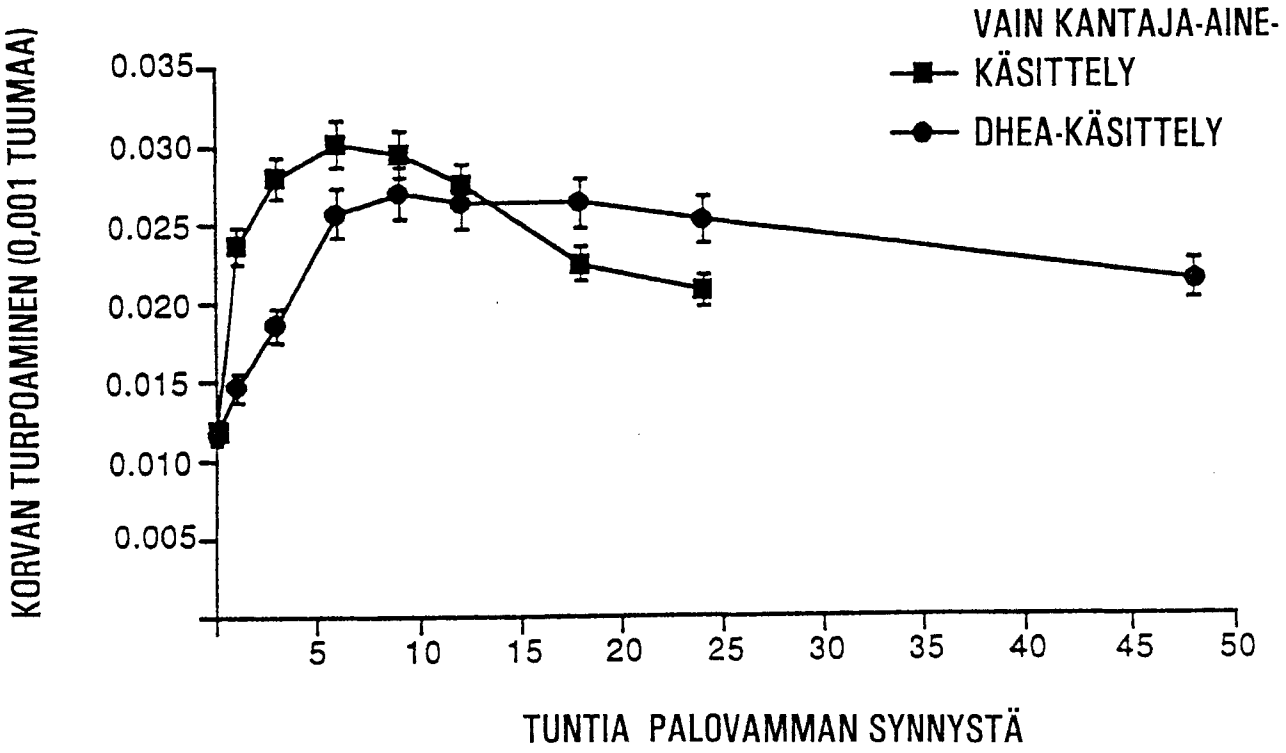

KORVAN TURPOAMINEN (0,001 TUUMAA)
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
TUNTIA PALOVAMMAN SYNNYSTÄ
VAIN KANTAJA-AINE-KÄSITTELY
DHEA-KÄSITTELY

FIG. 1

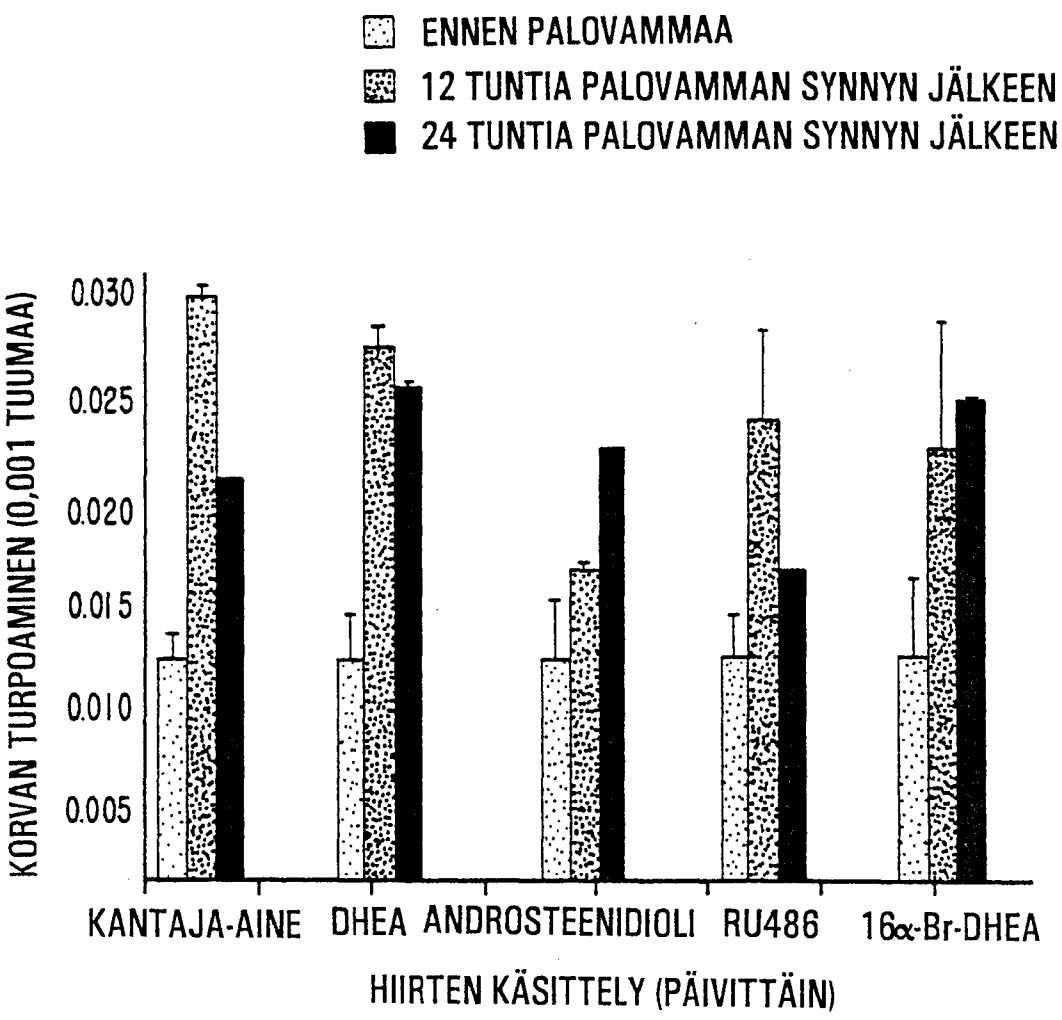

ENNEN PALOVAMMAA
12 TUNTIA PALOVAMMAN SYNNYN JÄLKEEN
24 TUNTIA PALOVAMMAN SYNNYN JÄLKEEN
KORVAN TURPOAMINEN (0,001 TUUMAA)
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
KANTAJA-AINE
DHEA
ANDROSTEENIDIOLI
RU486
16α-Br-DHEA
HIIRTEN KÄSITTELY (PÄIVITTÄIN)

FIG. 2

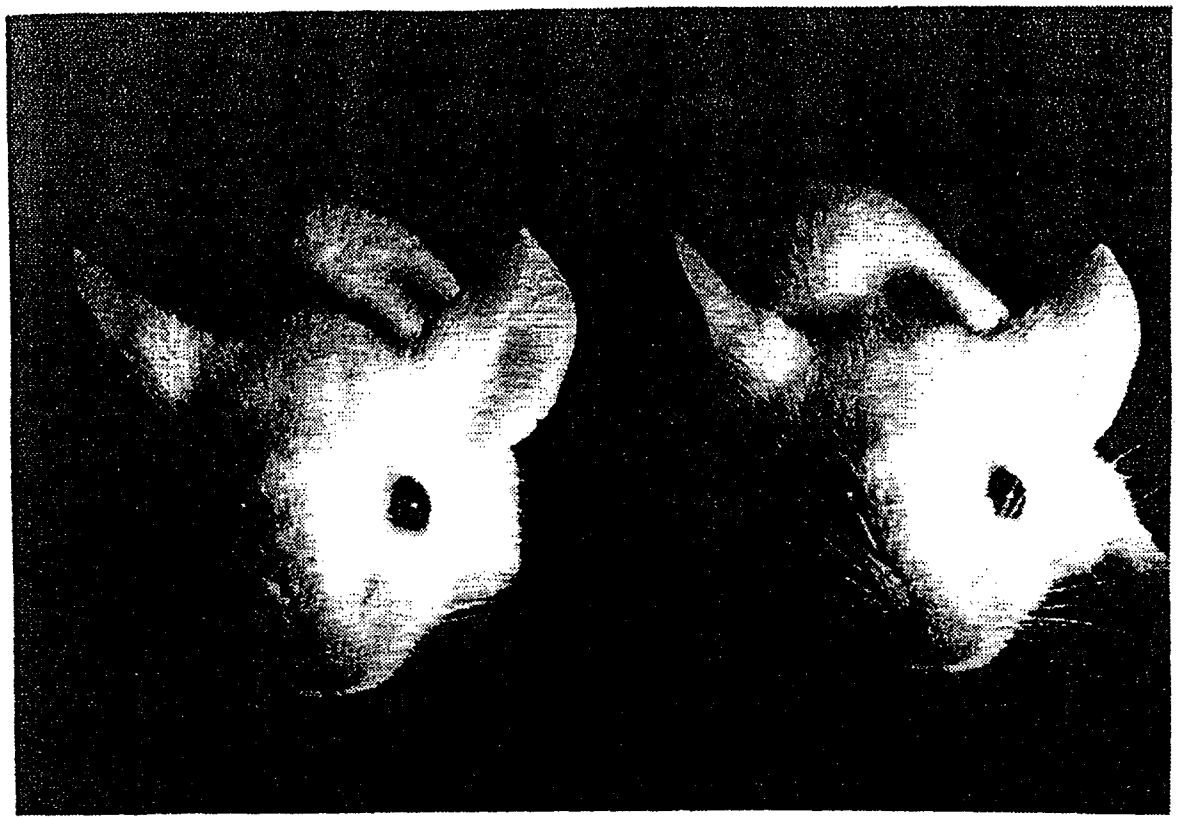


FIG. 3A



FIG. 3B

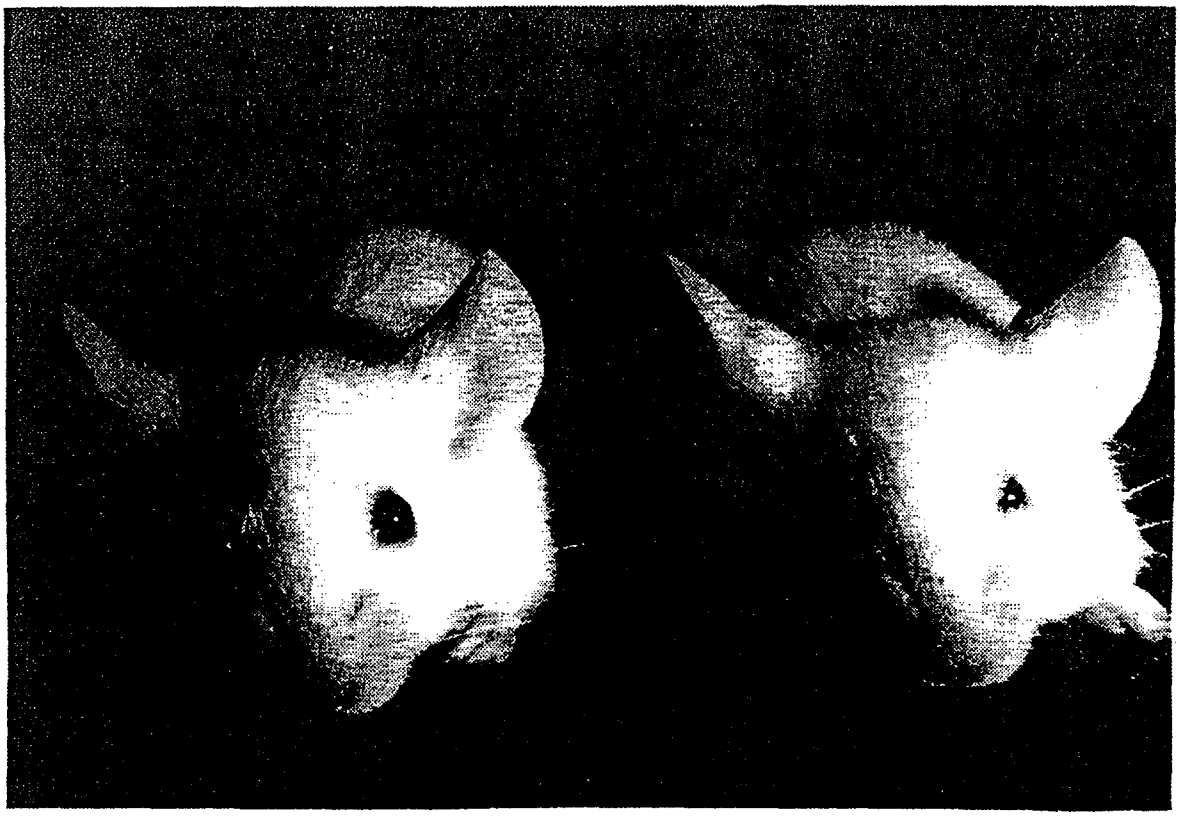


FIG. 3C



FIG. 3D

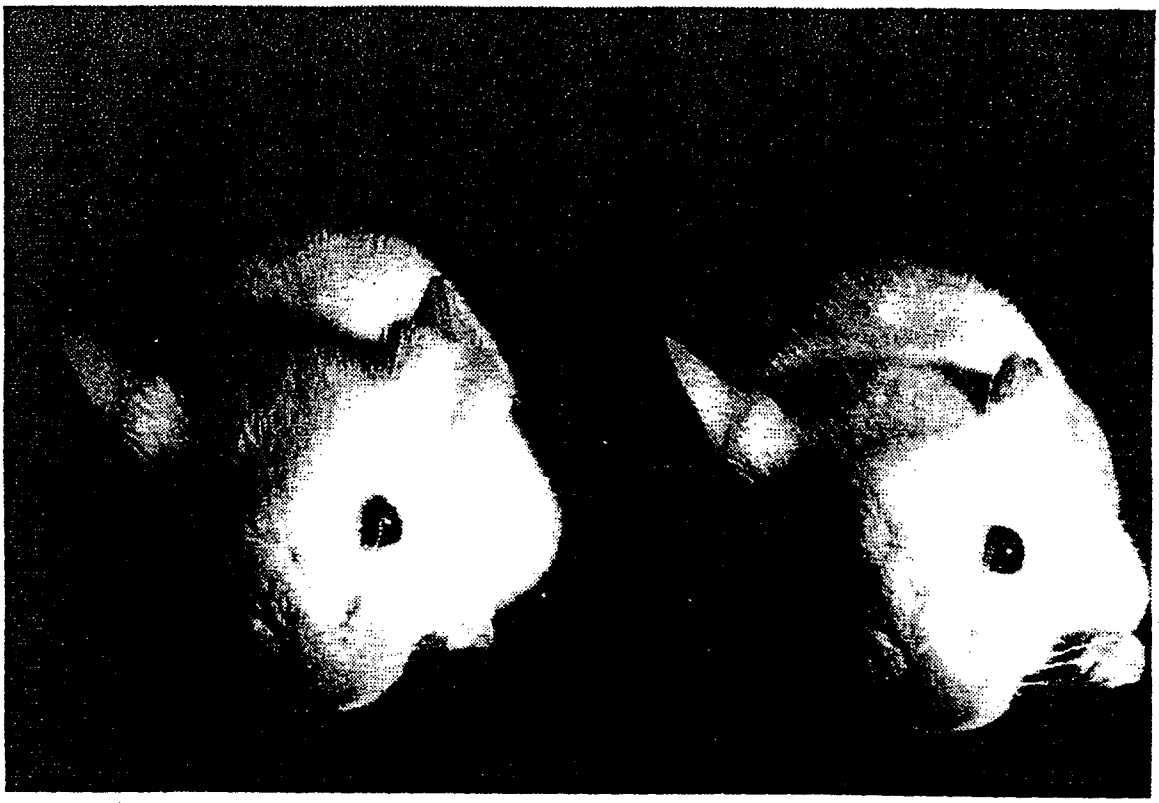


FIG. 3E



FIG. 3F

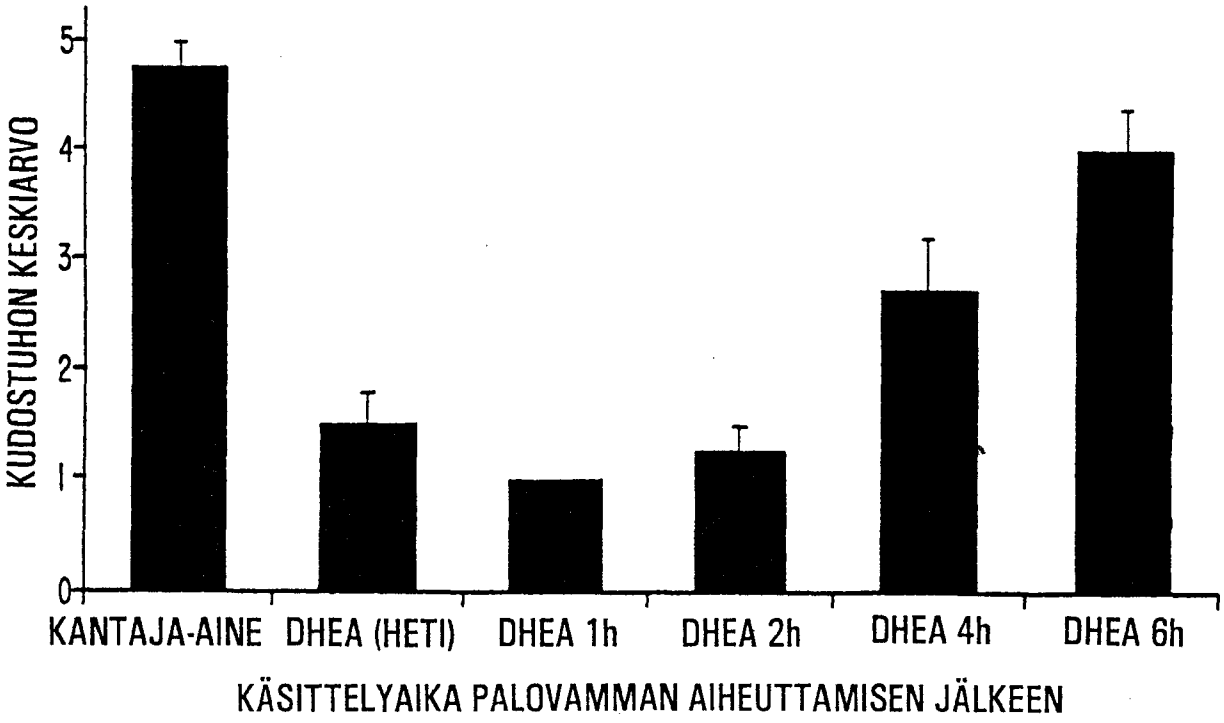

KUDOSTUHON KESKIARVO
0
1
2
3
4
5
KANTAJA-AINE
DHEA (HETI)
DHEA 1h
DHEA 2h
DHEA 4h
DHEA 6h
KÄSITTELYAIKA PALOVAMMAN AIHEUTTAMISEN JÄLKEEN

FIG. 4

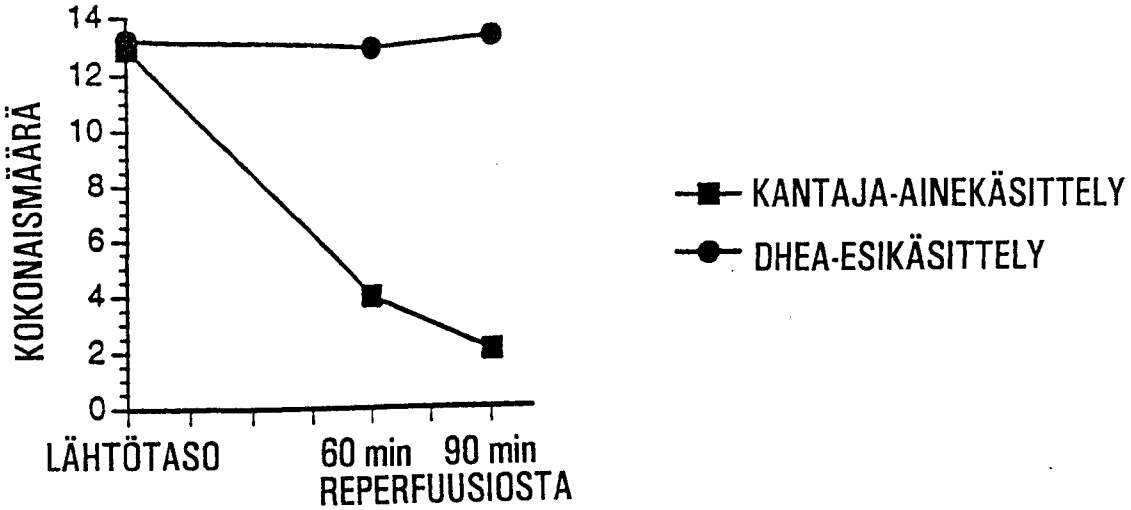


FIG. 5A

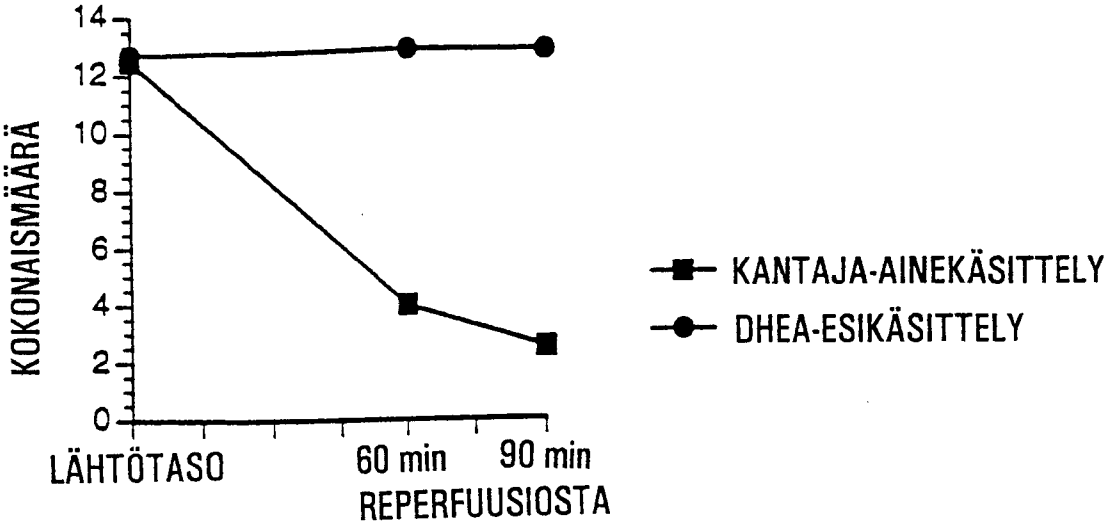


FIG. 5B

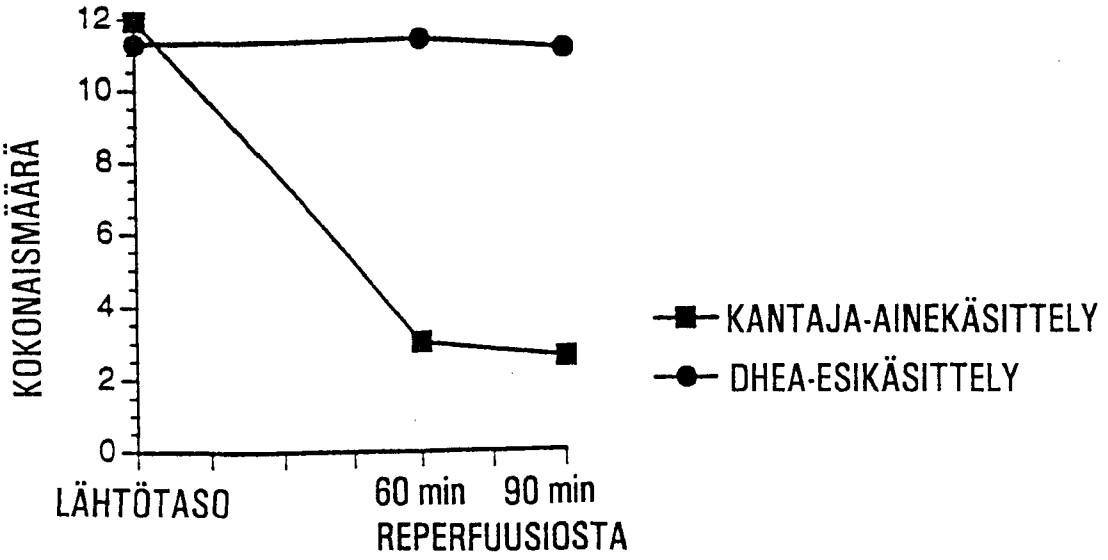


FIG. 5C

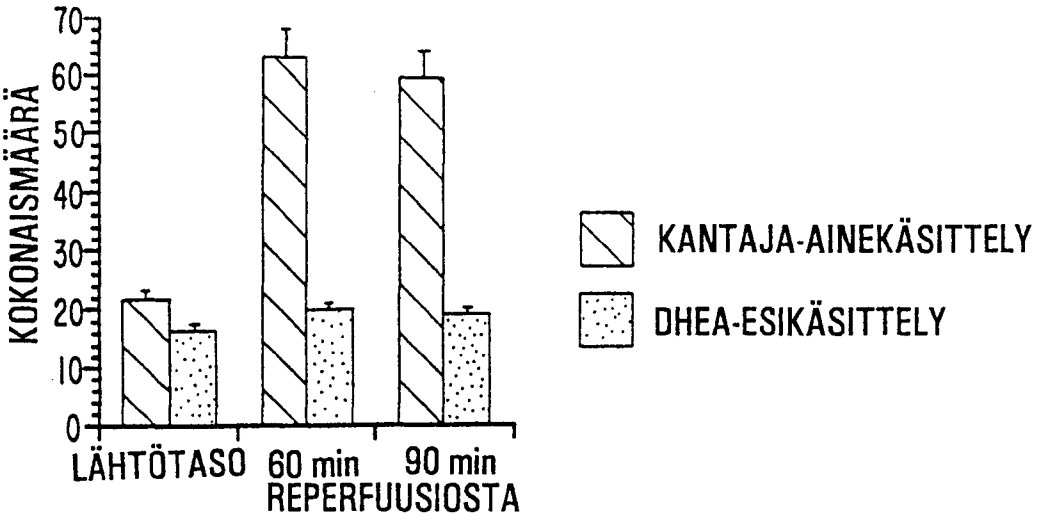


FIG. 6A

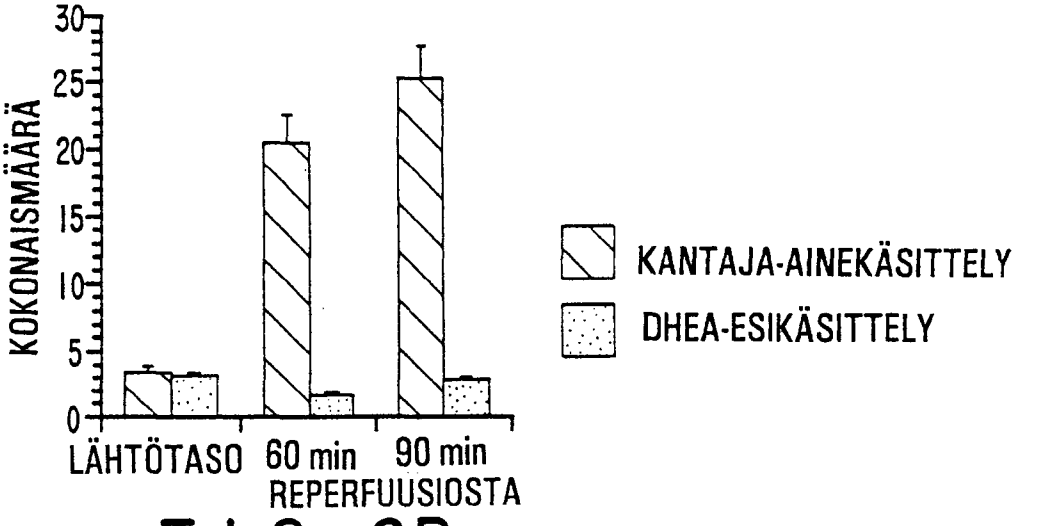


FIG. 6B

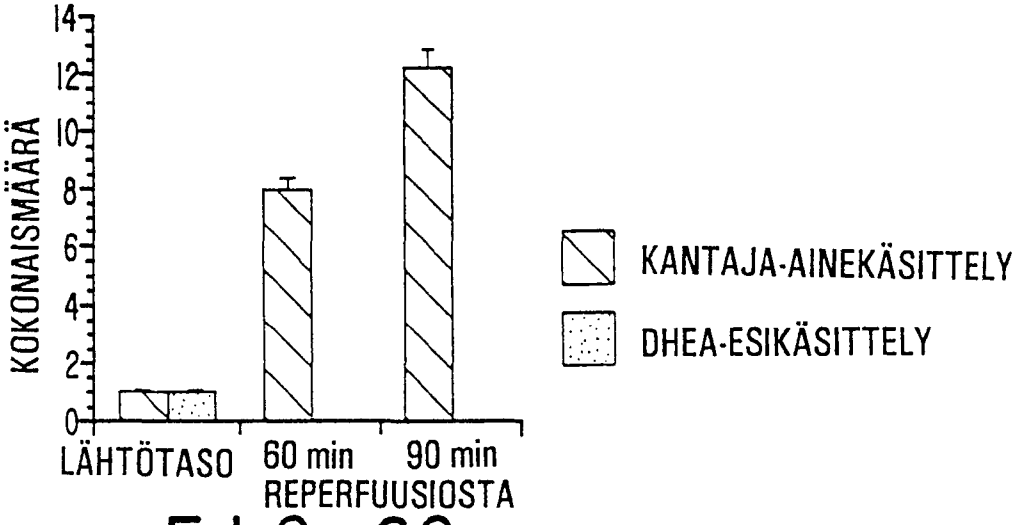


FIG. 6C

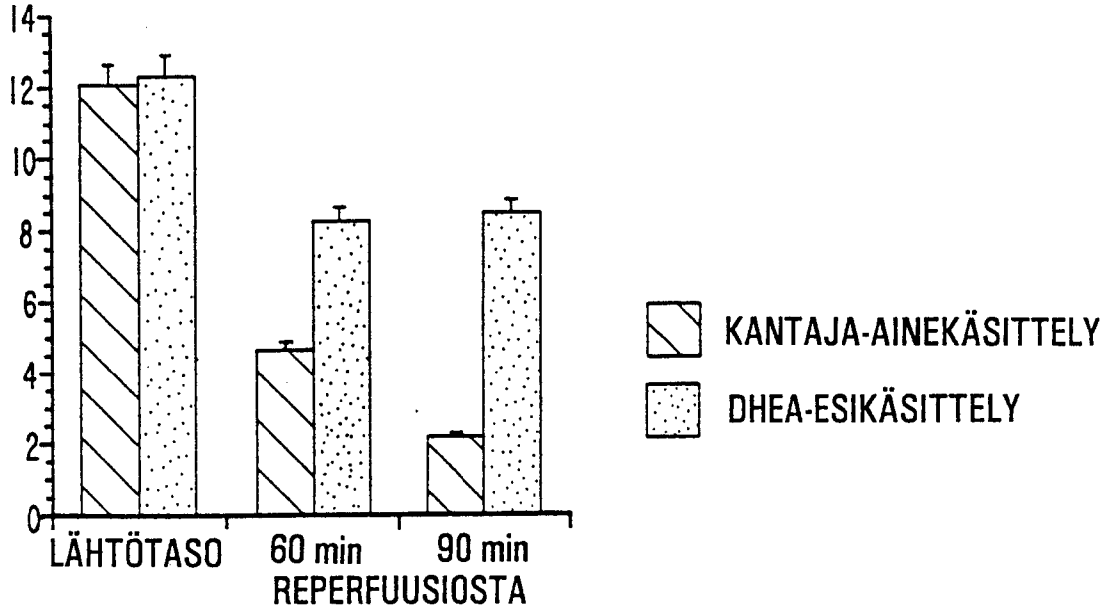

14
12
10
8
6
4
2
0
LÄHTÖTASO
60 min
90 min
REPERFUUSIOSTA
KANTAJA-AINEKÄSITTELY
DHEA-ESIKÄSITTELY

FIG. 7A

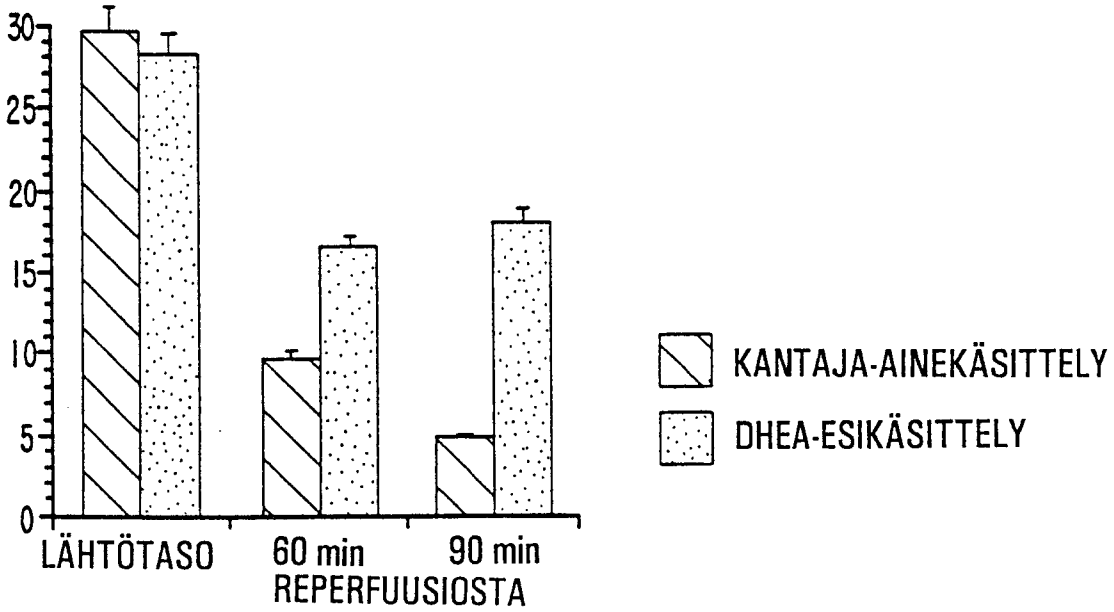

30
25
20
15
10
5
0
LÄHTÖTASO
60 min
90 min
REPERFUUSIOSTA
KANTAJA-AINEKÄSITTELY
DHEA-ESIKÄSITTELY

FIG. 7B