



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU UTLAGGNINGSSKRIFT

86253

C (15) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 08 1992

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

A 61K 35/14, A 01N 1/02

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	875063
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	16.11.87
(24) Alkupäivä - Löpdag	20.01.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	16.11.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.04.92
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	US87/00062
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
19.03.86 US 841435 P	

(71) Hakija - Sökande

1. American Red Cross, National Headquarters, 17th & D Street, N.W., Wash., DC 20006, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Holme, Stein, 3349 King Richard Court, Virginia Beach, Va. 23452, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Borenus & Co Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Synteettinen, plasmaa sisältämätön, verensiirtoon sopiva verihiutaleiden varasto-väliaine
Syntetiskt, plasmafritt, transfusibelt förvaringsmedium för blodplättar

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu verihiutaleiden varastointiin sopivaan steriiliin, plasmaa sisältämättömään väliaineeseen. Tämä verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine käsittää fysiologisesti hyväksyttävää elektrolyyttien vesiliuosta. Yksi litra tätä elektrolyyttiliuosta sisältää noin 3,0...7,5 g dekstroosia, noin 3,0...6,0 g natriumsitraattia ja noin 2,0...4,2 g natriumbikarbonaattia. Tämä verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine on isotonista ja sen pH-arvo on noin alueella 6,8...7,4. Verihiutaleita voidaan varastoida ja säilyttää tässä verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa kauemmin kuin 10 vuorokautta.

Uppfinningen avser ett sterilt, plasmafritt förvaringsmedium för blodplättar. Förvaringsmediet för blodplättar omfattar en fysiologiskt acceptabel vattenhaltig elektrolyttlösning. I en liter av denna elektrolyttlösning finns ca 3,0...7,5 g dextros, ca 3,0...6,0 g natriumcitrat, och ca 2,0...4,2 g natriumbikarbonat. Förvaringsmediet för blodplättar är isotoniskt och har ett pH-värde om ca 6,8...7,4. I förvaringsmediet för blodplättar kan man förvara och bevara blodplättar i mer än 10 dygn.

Synteettinen, plasmaa sisältämätön, verensiirtoon sopiva verihiutaleiden varasto-väliaine.

Syntetiskt, plasmafritt, transfusibelt förvaringsmedium för blodplättar.

Oheinen keksintö kohdistuu synteettiseen väliaineeseen, johon verihiutaleet voidaan suspendoida. Oheinen keksintö kohdistuu erityisemmin verihiutaleiden säilyttämiseen soveltuvaan synteettiseen väliaineeseen, joka (1) ei sisällä veriplasmaa eikä -proteiineja, (2) pidentää verihiutaleiden säilyvyyttä ja parantaa potilaaseen siirtämistä varten varastoitujen, verihiutaleita sisältävien tiivistesten laatua ja (3) ei sisällä dekstroosin ja sitraatin lisäksi muita orgaanisia yhdisteitä.

Veri muodostuu pääasiallisesti kahdesta osasta. Nämä osat saadaan näkyviin ottamalla verinäyte ja estämällä sen hyytyminen. Sitä veren osaa, joka laskeutuu näytteen sisältävän astian pohjalle, kutsutaan veren "peruskomponentiksi" ("formed elements"). Tämä peruskomponentti käsittää punaiset verisolut sekä muut hiukkasmaiset komponentit kuten valkoiset verisolut ja verihiutaleet, jotka tunnetaan myös trombosyytteinä. Tämä peruskomponentti muodostaa tyypillisesti 40-50 prosenttia ihmisen normaalin veren kokonaismäärästä. Samea neste, joka ei laskeudu verinäytteessä, on plasmana tunnettu veren osa. Plasma on pääasiallisesti vettä, mutta se sisältää myös epäorgaanisia ja orgaanisia aineita sekä liuenneita kaasuja ja erilaisia vieraita aineita. Veriplasman sisältämät epäorgaaniset aineet ovat pääasiallisesti elektrolyyttejä. Merkittävimmät näistä elektrolyyteistä esitetään taulukossa 1.

Taulukko 1

Natrium	142,0 mEq/l
Kalium	4,3 mEq/l
Kalsium	5,0 mEq/l
Magnesium	3,4 mEq/l
Kloridi	104,0 mEq/l

Bikarbonaatti	27,0 mEq/l
Fosfaatti	2,3 mEq/l
Sulfaatti	0,6 mEq/l

Merkittävimmät plasmassa todetut orgaaniset aineet ovat maitohappo, urea, aminohapot, kreatiniini, glukoosi, hormonit, proteiinit, albumiinit ja globuliinit.

Nykyaikainen lääketiede on kehittänyt liuoksia, joita lisätään vereen in vivo ja/tai sekoitetaan vereen in vitro. Tuotteita, joita on tarkoitus lisätä vereen in vivo, käytetään pääasiallisesti suonensisäisesti antamalla, farmaseuttisina kuljettimina ja/tai elektrolyyttien korvaamiseen vuodepotilaissa. Nämä liuokset koostuvat pääasiallisesti vedestä, joka sisältää dekstroosia ja valinnaisesti elektrolyyttejä. Dekstroosia on tyyppillisesti läsnä näissä liuoksissa noin 5 prosentin pitoisuutena, ja se toimii verisolujen tai kudossolujen ravintona. Näiden liuosten sisältämät elektrolyytit vaihtelevat huomattavasti. Elektrolyyttejä sisältävät liuokset, jotka muistuttavat läheisimmin veriplasmaa, sisältävät monia taulukossa 1 esitetyistä elektrolyyteistä. Erityisenä esimerkkinä dekstroosia ja elektrolyyttejä sisältävästä liuoksesta, joka soveltuu annettavaksi vereen in vivo, mainittakoon Locke-Ringer:in liuos. Locke-Ringer:in liuoksen koostumus esitetään taulukossa 2.

Taulukko 2

Reagenssina toimiva natriumkloridi	9,0 g
Reagenssina toimiva kaliumkloridi	0,42 g
Reagenssina toimiva kalsiumkloridi	0,24 g
Reagenssina toimiva magnesiumkloridi	0,2 g
Natriumbikarbonaatti	0,5 g
Dekstroosi	0,5 g
Vettä, joka on tislattu vähän aikaa sitten kovalasia olevasta pullosta, sellainen määrä, jolla lopputilavuudeksi saadaan	
	1000 ml

Muita liuoksia, jotka soveltuvat annettaviksi vereen in vivo, on löydettävissä teoksen Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 14. painos (1970), sivuilta 815-847.

Liuokset, joita lisätään vereen in vitro, liittyvät pääasiallisesti joko koko veren tai veren erillisten komponenttien, kuten punaisten verisolujen, valkoisten verisolujen tai eri komponenttien seosten, säilyttämiseen. Mikäli verihiutaleita on läsnä verikomponentissa, joka kerätään ja jota säilytetään in vitro, niin tähän komponenttiin lisätään koaguloitumista (hyyttymistä) estävää ainetta. Tavallisimmin käytetty koaguloitumista estävä aine, jota lisätään kerättyyn kokovereen, tunnetaan "happositraatti-dekstroosina" eli "ACD". Tämä koaguloitumista estävä liuos sisältää (1) sitruunahappoa ja natriumsitraattia pitoisuuksina, jotka riittävät saamaan aikaan optimaalisen fysiologisen pH-arvon sekä (2) dekstroosia pitoisuuksina, jotka ovat riittäviä punaisten verisolujen säilyttämiseksi pitkiä aikoja. Liuos, joka on todettu edulliseksi säilytettävässä sekä kokoverta että kokoveren fraktioita, tunnetaan "koaguloitumista estävänä sitraatti-fosfaatti-dekstroosi-liuoksena" eli "CPD". Tämän koaguloitumista estävän sitraatti-fosfaatti-dekstroosi-liuoksen komponentit esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

Sitruunahappo (vedetön)	3,0 g
Natriumsitraatti (dihydraatti)	26,3 g
Natriumbifosfaatti (monohydraatti; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	2,22 g
Dekstroosi	25,5 g
Injektointiin sopivaa vettä riittävänä määränä, jolla lopputilavuudeksi saadaan	1000 ml

Erillisiä komponentteja voidaan erottaa veren hiukkasista muodostuvasta osasta, ja niitä voidaan säilyttää myöhempää siirtämistä varten. Perinteisiä menetelmiä voidaan käyttää valkoisten verisolujen ja verihiukkasten keräämiseen ja säilyttämiseen.

seen yhdessä. Nykyaikaisemmat menetelmät tekevät mahdolliseksi verihiutaleiden erottamisen, varastoinnin ja siirtämisen takaisin potilaisiin, jotka kärsivät verihiutaleiden vajauksesta. Nämä komponentit pilaantuvat nopeasti sen jälkeen, kun ne on erotettu ja niitä on varastoitu näitä menetelmiä käyttäen. Oletetaan, että verihiutaleiden laadun heikkeneminen varastoinnin aikana johtuu varastoinnin aikana vapautuneiden plasman hyytymistekijöiden aktivoitumisesta.

Erotettujen ja potilaaseen siirrettäviksi tarkoitettujen verihiutaleiden tai "verihiutaleita sisältävien tiivistesten" varastointi toteutetaan tyypillisesti jollakin kolmesta menetelmästä. Nämä menetelmät käsittävät verihiutaleiden suspendoimisen gelatiiniin, minkä jälkeen suspensio jäähdytetään, verihiutaleiden pakastamisen tai pakastamisen ja pakastekuivaamisen, sekä verihiutaleiden varastoinnin nesteessä. Nämä menetelmät kuvataan yleisesti teoksen Hematology, Williams et al., toinen painos, McGraw-Hill Book Company (1977), sivuilla 1553-1561.

Kaikkein lupaavin menetelmä verihiutaleiden varastoimiseksi käsittää verihiutaleiden varastoimisen nesteeseen lämpötiloissa, jotka eivät aiheuta varastoituihin verihiutaleisiin morfologisia vaurioita, esimerkiksi noin 22 °C:n lämpötiloissa. Liuokset, joita käytetään verihiutaleiden varastoimiseen nesteessä, sisältävät yleensä yhtä tai useampaa taulukossa 1 lueteltua elektrolyyttiä, dekstroosia tai glukosia, koaguloitumista estävää ainetta sekä yhtä tai useampaa lisäainetta. Näissä liuoksissa verihiutaleet säilyvät tyypillisesti noin 24 - 72 tuntia. Eräitä lisäaineita voidaan käyttää ainoastaan kokeilutarkoituksiin, koska nämä lisäaineet eivät täytä turvallisuus- eikä käyttövaatimuksia tai, mikä pätee monien orgaanisten ja erityisesti proteiineja sisältävien yhdisteiden tapauksessa, ne voivat herkistää vastaanottajan ja aiheuttaa allergisia reaktioita annettaessa niitä potilaalle toistamiseen.

Tällä hetkellä useimpiin kliinisiin sovellutuksiin tarkoitettua, verihiutaleita sisältävät tiivisteet valmistetaan kokoverestä kerätyistä ja koaguloitumista estävällä sitraatti-fos-

faatti-dekstroosilla käsitellyistä yksiköistä, ja niitä säilytetään arviolta 50-60 millilitrassa plasmaa, joka sisältää koaguloitumista estävää ainetta, eli "CPD-plasmassa". CPD-plasmaa annetaan suonen sisäisesti yhdessä verihiutaleiden kanssa potilaalle, jotka tarvitsevat verihiutaleiden siirtoa. Koska tässä menetelmässä tarvitaan plasmaa verihiutaleiden säilyttämiseen, niin tämä plasma ei ole käytettävissä potilaan muissa hoitomuodoissa. Näin ollen on toivottavaa, että elävät verihiutaleet voitaisiin säilyttää plasmaa sisältämättömässä väliaineessa tai suspendoida siihen, jolloin kerätyn plasman, jota on käytettävissä potilaisiin siirtämiseksi, määrä ei pienene. Lisäksi verihiutaleiden suspendoimiseen käytetty plasma voi aiheuttaa potilaassa allergisen reaktion verihiutaleiden siirtämisen jälkeen johtuen siirrettävien verihiutaleiden luovuttajan ja vastaanottajan veriryhmien ("ABO") yhteensopimattomuudesta.

US-patenttijulkaisussa 4 447 415, joka on myönnetty nimellä Rock et al., kuvataan verihiutaleiden varastointiin sopiva nestemäinen väliaine, joka ei sisällä plasmaa. Tämän keksinnön mukaisessa väliaineessa käytetään yhtä tai useampaa lisäainetta yhdessä suolaliuoksen ja koaguloitumista estävää ainetta ja dekstroosia sisältävän liuoksen, joka on mielellään CPD-Tyrode:n liuoksena, kanssa. Lisäaineisiin, jotka esitetään käyttökelpoisiksi tässä keksinnössä, kuuluvat (1) palautuvat inhibiittorit, jotka ovat orgaanisia yhdisteitä, kuten indometasiini, kinakriini tai E-vitamiini, sekä (2) aineet, jotka nostavat syklisen adenosiini-monofosfaatin tasoa, kuten prostaglandiinit E₁, D₂ tai I₂. Monet näistä lisäaineista eivät täytä ihmiselle infuusiona annettaviin aineisiin liittyviä turvallisuus- ja käyttömääräyksiä, joten ne sopivat ainoastaan kokekäyttöön tai käyttöön in vitro. Muita lisäaineita, joiden esitetään soveltuvan tähän keksintöön, ovat esimerkiksi (1) ravintoaineet kuten fruktoosi ja muut sokerit, adeniini tai asetyyli-CoA sekä (2) puskurit kuten fosfaatti ja tietyt aminohapot. Ravintoaineina mainituilla orgaanisilla yhdisteillä tai lisäaineilla ei vältetä dekstroosin läsnäolon välttämättömyyttä väliaineessa, ja ne eivät tyydytä verihiutaleiden ravintoaine-

tarvetta yli noin 5 vuorokautta kestävien varastointijaksojen aikana. Puskureina mainitut lisäaineet eivät kykene ylläpitämään pH-tasapainoa, kun verihiutaleita varastoidaan pitempiä ajanjaksoja kuin noin 5 vuorokautta. Nämä puskurit eivät kykene puskuroimaan riittävän hyvin maitohapon määrää, jota maitohappoa elävät, suspendoidut verihiutaleet tuottavat sivutuotteena dekstroosia kuluttaessaan, kuten asianlaista on säilytettävässä verihiutaleita vähintään noin 22 °C:n lämpötilassa.

Teollisuudella ei ole toistaiseksi käytettävissä sellaista verihiutaleiden varastointiin sopivaa väliainetta, joka ei sisällä plasmaa eikä orgaanisia yhdisteitä dekstroosia ja koaguloitumista estävää ainetta, kuten sitruunahappoa, lukuunottamatta, ja jossa verihiutaleita voidaan säilyttää jäädyttämättä tai vähintään noin 22 °C:n lämpötiloissa yli 7 vuorokautta kestävien ajanjaksojen ajan verihiutaleiden elinkelpoisuuden olennaisesti heikentymättä ja ilman lisäaineita, jotka eivät ole turvallisia tai joita ei olla hyväksytty käytettäväksi ihmisessä in vivo.

Oheinen keksintö kohdistuu verihiutaleiden varastointiin sopivaan steriiliin, plasmaa sisältämättömään väliaineeseen, joka käsittää fysiologisesti hyväksyttävää, vesipitoista elektrolyyttiliuosta, tämän elektrolyyttiliuoksen sisältäessä yhtä litraa kohden:

noin 3,0 - 7,5 g dekstroosia;

noin 3,0 - 6,0 g natriumsitraattia; sekä

noin 2,0 - 4,2 g natriumbikarbonaattia;

tämän verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen ollessa isotonista ja sen pH-arvon ollessa noin 6,8 - 7,4, ja tämän verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen kyetessä säilyttämään verihiutaleita vähintään noin 10 vuorokautta vähintään noin 22 °C:n lämpötilassa.

Keksintö kohdistuu samoin menetelmään verihiutaleiden säilyttämiseksi verihiutaleiden varastointiin sopivassa steriilissä,

plasmaa sisältämättömässä väliaineessa, joka menetelmä käsittää

fysiologisesti hyväksyttävän, vesipitoisen elektrolyyttiliuoksen valmistamisen, tämän elektrolyyttiliuoksen sisältäessä yhtä litraa kohden:

noin 3,0 - 7,5 g dekstroosia;

noin 3,0 - 6,0 g natriumsitraattia; sekä

noin 2,0 - 4,2 g natriumbikarbonaattia;

verihiutaleiden suspendoimisen tähän verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen, joka on isotonista, ja jonka pH-arvo on noin 6,8 - 7,4, jolloin olennainen osa näistä verihiutaleista säilyy elinkelpoisena vähintään noin 14 vuorokautta vähintään noin 22 °C:n lämpötilassa.

Oheinen keksintö kohdistuu erityisemmin verihiutaleiden varastointiin sopivaan steriiliin, plasmaa sisältämättömään väliaineeseen. Tämä verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine käsittää fysiologisesti hyväksyttävää, vesipitoista elektrolyyttiliuosta. Yksi litra tätä elektrolyyttiliuosta sisältää noin 3,0 - 7,5 g dekstroosia, noin 3,0 - 6,0 g natriumsitraattia sekä noin 2,0 - 4,2 g natriumbikarbonaattia. Tämä verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine on isotonista, ja sen pH-arvo on noin 6,8 - 7,4. Dekstroosia ja sitruunahappoa tai sitruunahapon johdannaista lukuunottamatta oheisen keksinnön mukainen edullisin, verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine ei sisällä lisäaineena orgaanisia yhdisteitä. Ohessa käytetyllä käsitteellä "elinkelpoiset" verihiutaleet tarkoitetaan sitä, että olennainen osa näistä eristetyistä, verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen suspendoiduista verihiutaleista säilyttää normaalit ja luonnolliset fysiologiset, toiminnalliset ja rakenteelliset ominaisuutensa niin, että tällä tavalla säilytettyjä verihiutaleita voidaan antaa infuusiona, jolloin ne toimivat vastaanottajassa.

Keksinnön mukaista, fysiologisesti hyväksyttävää, vesipitoista elektrolyyttiliuosta voidaan muunnella, jolloin kuitenkin verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen varastointikykyyn kohdistuva vaikutus pysyy hyvin pienenä. Tämän verihiutaleiden

varastointiin sopivan väliaineen edullisimmat suoritukset sisältävät merkittävimpiä, veriplasmassa esiintyviä elektrolyyttejä. Näitä elektrolyyttejä sisällytetään verihiutaleiden varastointiin käytettävään väliaineeseen pitoisuudeksi, joka on arviolta sama kuin normaalissa veriplasmassa. Edullisimpiin elektrolyytteihin kuuluvat natriumkloridi, kaliumkloridi, kalsiumkloridi, magnesiumsulfaatti sekä yksiemäksinen natriumfosfaatti. Näitä ja muita elektrolyyttejä on saatavana yleisesti vesiliuoksina, joita voidaan antaa injektioimalla tai infuusiona vastaanottajalle. Verihiutaleiden varastointiin käytettävää väliainetta valmistettaessa näiden elektrolyyttien pitoisuuksia voidaan vaihdella tunnetuilla tekniikoilla isotonisen liuoksen saamiseksi. Verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen edullinen suoritustyyppi sisältää väliaineen yhtä litraa kohden elektrolyytteinä noin 6,4 - 7,6 g natriumkloridia, noin 0,2 - 0,4 g kaliumkloridia, noin 0,1 - 0,4 g kalsiumkloridia, noin 0,2 - 0,4 g magnesiumsulfaattia ja noin 0,1 - 0,6 g yksiemäksistä natriumfosfaattia.

Dekstroosi on verihiutaleiden luonnollinen ravintoaine, ja se vaikuttaa merkittäväällä tavalla verihiutaleiden varastointiin käytettävän väliaineen kykyyn säilyttää ja ylläpitää verihiutaleet elinkelpoisina yli 7 vuorokauden pituisten varastointijaksojen ajan. Keksinnön mukaisessa, verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa dekstroosia käytetään säilytettävien verihiutaleiden ainoana merkittävänä ravintoaineena. Muiden ravintoaineiden merkityksetön läsnäolo tai glukoosin käyttö ei muuta sanottavasti keksinnön mukaisen, verihiutaleiden varastointiin käytettävän väliaineen tehokkuutta. Muiden ravintoaineiden läsnäolo ei ole toivottavaa, koska muut ravintoaineet eivät ole yhtä tehokkaita kuin dekstroosi, kun verihiutaleita säilytetään pitkiä ajanjaksoja.

Dekstroosin pitoisuus keksinnön mukaisessa, verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa on suurempi kuin dekstroosin ne pitoisuudet, joita käytetään tyypillisesti veren ja verikomponenttien kanssa käytettävissä liuoksissa. Dekstroosin pitoisuuden on oltava niin suuri, että se riittää kattamaan

säilytettävien verihiutaleiden ravintoainetarpeen niiden koko varastointijakson ajan. Dekstroosia on läsnä verihiutaleiden varastointiin käytettävässä väliaineessa pitoisuutena, joka on edullisesti vähintään noin 3,0 g litrassa. Dekstroosin pitoisuus, joka on noin 3,0 - 7,5 g litrassa, riittää tyypillisesti peittämään oheisen keksinnön mukaisesti varastoitujen verihiutaleiden ravintoainetarpeen vähintään noin 14 vuorokautta.

Keksinnön mukaisessa, verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa käytetty puskurijärjestelmä on kriittinen ajattel- len verihiutaleiden onnistunutta varastointia enemmän kuin noin 5 vuorokautta. CPD-plasmaan valmistettujen, verihiutaletiivisteiden pH laskee arvon 6,0 alapuolelle varastoinnin kestätyä noin 10 - 14 vuorokautta. Noin arvon 6,0 alapuolella oleva pH-taso heikentää verihiutaleiden elinkelpoisuutta ja fysiologista toiminnallisuutta. Verihiutaleiden elinkelpoi- suuden ja toiminnallisuuden heikkenemisen väliaineissa, joiden pH on alhainen, uskotaan johtuvan maitohapon kerääntymisestä plasmaan, mikä on verihiutaleissa varastoinnin aikana esiinty- vän jatkuvan ja nopeudeltaan vakiona pysyvän glykolyysin seu- rausta. Olennaisena pitoisuutena verihiutaleiden varastointiin käytettyyn väliaineeseen lisätty natriumbikarbonaatti neutra- loi verihiutaleiden varastoinnin aikana muodostuneen maitoha- pon. Natriumbikarbonaatin pitoisuuden tulee olla riittävä säilyttääkseen pH:n verihiutaleiden varastointiin käytetyssä väliaineessa suurempana kuin noin arvo 6,7 koko varastointijak- son ajan. Verihiutaleiden varastointiin käytetyn väliaineen pH-arvo, joka on pienempi kuin noin 6,7, voi olla haitallinen varastoitaville verihiutaleille, mikä nähdään in vitro-paramet- reistä, kuten verihiutaleiden lukumäärästä, LDH:n vapautumises- ta, ATP-tasoista, hypotonisen shokin aiheuttamasta vasteesta, verihiutaleiden muodon muuttumisen suuruudesta ADP:n läsnäol- lessa, sekä verihiutaleissa todettavasta hapen kulutusnopeudes- ta.

Keksinnön mukaisen, verihiutaleiden varastointiin sopivan väli- aineen puskurijärjestelmässä käytetään pääasiallisena alkalise- na aineena natriumbikarbonaattia. Natriumbikarbonaattia käyte-

tään pitoisuuksina, jotka riittävät ylläpitämään pH-arvon toivottuna verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa verihiutaleiden koko varastoinnin ajan ilman saostumista. Natriumbikarbonaattia on läsnä yhdessä litrassa verihiutaleiden varastointiin käytettävää väliainetta edullisesti määränä, joka on noin 2,0 - 4,2 g. Keksinnön mukaisen, verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen puskurijärjestelmä sisältää yksiemäksistä natriumfosfaattia. Keksinnön mukaiseen puskurijärjestelmään voidaan sisällyttää sopivasti muita suoloja pieninä pitoisuuksina.

Keksinnön mukaisessa, verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa käytetty koaguloitumista estävä aine sisältää natriumsitraattia. Keksinnön edullisimmissa suoritusmuodoissa käytetään sitruunahappoa. Keksinnön mukaisia, koaguloitumista estäviä aineita on oltava läsnä pitoisuuksina, jotka riittävät estämään verihiutaleiden olennaisen koaguloitumisen (hyytymisen) pitkien varastointijaksojen aikana. Natriumsitraattia on läsnä yhdessä litrassa verihiutaleiden varastointiin sopivaa väliainetta edullisesti määränä, joka on noin 3,0 - 6,0 g, ja sitruunahappoa on läsnä yhdessä litrassa verihiutaleiden varastointiin sopivaa väliainetta määränä, joka on noin 0,4 - 0,6 g. Keksinnön mukaiseen, verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen voidaan myös sisällyttää muita koaguloitumista estäviä aineita pieninä pitoisuuksina.

Oheisen keksinnön mukainen, verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine koostuu taulukossa 4 luetelluista kemiallisista aineosista. Keksinnön edullisimmat suoritusmuodot koostuvat olennaisesti näistä yhdisteistä sisältämättä lisäksi mitään muuta yhdistettä olennaisina pitoisuuksina. On toivottavaa, ettei keksinnön mukainen, verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine sisällä muita yhdisteitä, jotta vältettäisiin vastaanottajan herkistyminen näille muille aineille, ja jotta verihiutaleiden varastointijakso saataisiin mahdollisimman pitkäksi.

Taulukko 4

	<u>Pitoisuus-</u> <u>alue</u>	<u>Edullinen</u> <u>pitoisuus</u>
Natriumkloridi	6,4...7,6 g/l	6,45 g/l
Kaliumkloridi	0,2...0,4 g/l	0,375 g/l
Kalsiumkloridi	0,1...0,4 g/l	0,248 g/l
Magnesiumsulfaatti	0,2...0,4 g/l	0,2000 g/l
Natriumfosfaatti (yksiemäksinen)	0,1...0,6 g/l	0,355 g/l
Dekstroosi	3,0...7,5 g/l	7,035 g/l
Sitruunahappo	0,4...0,6 g/l	0,510 g/l
Tri-natriumsitraatti	3,0...6,0 g/l	4,471 g/l
Natriumbikarbonaatti	2,0...4,2 g/l	3,000 g/l
CO ₂ -ilmakehä	2,5...7,5 %	5 %

Erillisten ionien pitoisuudet tässä liuoksessa esitetään seuraavassa taulukossa 5 yksikössä mE/l.

Taulukko 5

	<u>Ionien</u> <u>pitoisuusalue</u>	<u>Edullinen</u> <u>ionipitoisuus</u>
Na ⁺	198,80...236,10	207,60
K ⁺	2,68...5,36	5,03
Ca ⁺⁺	1,36...5,45	3,38
Mg ⁺⁺	1,70...3,40	1,70
HPO ₄ ⁻²	1,38...5,50	2,58
Cl ⁻	110,00...138,00	117,38
SO ₄ ⁻²	1,70...3,40	1,70
HCO ₃ ⁻	23,80...50,0	35,71

Verihiutaleiden varastointiin käytettävän väliaineen pH pidetään noin alueella 6,8 - 7,4 olevassa arvossa.

Keksinnön mukaisen, verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen valmistamiseen tarvittavat perusliuokset ja aine-

osat voidaan hankkia lukuisista kaupallisista lähteistä steriileinä, pyrogeenivapaina, injektoitaviksi kelpaavina liuoksina. Näiden valmistusaineiden toimittajia on löydettävissä tavallisista julkaisuista kuten teoksista "Physician's Desk Reference" ja "Red Book", joiden kummankin kustantaja on Medical Economics Company Incorporated, Oradell, New Jersey. Seuraavat esimerkit kaupallisista valmistusaineista havainnollistavat saatavana olevia, hyväksyttäviä kaupallisia tuotteita, joita voidaan käyttää tässä keksinnössä. Ringer's Injection (Ringer'in injektioliuos), USP, sisältää 8,6 g natriumkloridia, 0,3 g kaliumkloridia ja 0,33 g kalsiumkloridia litrassa steriiliä, pyrogeenitonta, injektoitavaksi sopivaa vettä. Steriili, injektoitavaksi sopiva vesi on pyrogeenitonta vettä, jota voidaan antaa suonen sisäisesti infuusiona. Magnesium Sulfate Injection (magnesiumsulfaatin injektioliuos), USP, on magnesiumsulfaatin 50-prosenttinen, injektoitavaksi sopiva liuos steriilissä, pyrogeenittomassa vedessä. Sodium bicarbonate injection (natriumbikarbonaatin injektioliuos), USP, on natriumbikarbonaatin 8,4-prosenttinen, injektoitavaksi sopiva liuos steriilissä, pyrogeenittomassa vedessä. Dextrose injection solution (dekstroosin injektioliuos), USP, on dekstroosin 50-prosenttinen, injektoitavaksi sopiva liuos steriilissä, pyrogeenittomassa vedessä. Potassium Chloride Injection (kaliumkloridin injektioliuos), USP, on kaliumkloridin 22-prosenttinen, injektoitavaksi sopiva liuos steriilissä, pyrogeenittomassa vedessä. Anticoagulant citrate-phosphate-dextrose solution (koaguloitumista estävä sitraatti-fosfaatti-dekstroosi-liuos) sisältää 3,0 rammaa sitruunahappoa, 26,3 g natriumsitraattia, 2,22 g natriumbifosfaattia ja 25,5 g dekstroosia yhdessä litrassa steriiliä, pyrogeenitonta vettä, ja sitä käytetään 70 ml kokoveren 500 ml kohden.

Edullisessa suoritusmuodossa edellä lueteltuja liuoksia yhdistetään seuraavat määrät, jolloin verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen kemiallinen koostumus saadaan oheisen keksinnön mukaiseksi. Verihiutaleiden varastointiin sopiva, liuoksena oleva väliaine sisältää 750 ml Ringer'in liuosta, 170 ml CPD-liuosta, 40 ml natriumbikarbonaattiliuosta, 5,4 ml

dekstroosin injektointiliuosta, 0,7 ml kaliumkloridiliuosta, 0,4 ml magnesiumsulfaattiliuosta ja 33,5 ml steriiliä, injektoitavaksi sopivaa vettä. Nämä kaikki liuokset yhdistetään steriileissä, aseptisissä olosuhteissa. Ennen verihiutaleiden siirtämistä tähän verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen, tämä liuosseos steriloidaan suodattamalla käyttäen suodatusyksikköä, jonka huokoskoko on 0,2 mikronia, ja joka on tarkoitettu kudosisäilytysvälineiden käytettävien väliaineiden vakuumsuodatukseseen.

Oheisen keksinnön mukaisen, verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen edullista koostumusta verrataan CPD-plasmaan taulukossa 6.

Taulukko 6

	Väliaine verihiutaleita varten	CPD-plasma*
Natrium	207,60	173...180
Kalium	5,03	1,9...3,8
Kalsium	3,38	3,4...4,0
Magnesium	1,70	1,1...1,9
Fosfaatti	2,58	3,9
Bikarbonaatti	35,71	20,9
Sitraatti	45,00	67,2
Sulfaatti	1,70	0,4...1,1
Kloridi	117,38	75...80
Proteiinit	0	12,2
Orgaaniset hapot	0	4,4
Sitruunahappo	2,60 mmooli/l	3,9 mmooli/l
Dekstroosi	40,00 mmooli/l	25,0 mmooli/l
YHTEENSÄ mEG/l	202,8(x2)	189,7(x2)

* Tämä pitoisuus edellyttää, ettei sitraattia, sitruunahappoa eikä fosfaattia tunkeudu punasoluihin, ja se on saatu käyttämällä 70 ml koaguloitumista estävää CPD-liuosta 500 ml:ssa kokoverta, jossa verisolujen tilavuusarvo (hematokriitti) on

42,5 ja seerumin kemialliset arvot ovat teoksessa Harper's Review of Biochemistry esitettyjen normaalien rajojen sisällä.

Verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen valmistamisen jälkeen menetelmä verihiutaleiden säilyttämiseksi ja varastomiseksi edellyttää verihiutaleiden erottamista veren muista komponenteista. Verihiutaleet käsittävä laskeuma tai kasautuma saadaan käsittelemällä kokoveriyksikkö tavanomaisilla käsittelymenetelmillä. Kaikki plasma erotetaan ja se kerätään satelliittipussiin. Tämän jälkeen verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine voidaan siirtää astiaan, joka sisältää verihiutalekasauman. Tämä siirtäminen voidaan toteuttaa joko yhdistävällä letkulla, joka liittää verihiutaleiden varastointiin sopivaa väliainetta sisältävän satelliittipussin mainittuun astiaan, tai kaupallisesti saatavilla, steriileillä yhdistämisvälineillä, jotka kykenevät siirtämään väliainetta astiasta, jota ei oltu alunperin kiinnitetty keräilypussisaraan. Sen jälkeen, kun erotetut verihiutaleet on suspendoitu uudestaan verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen, verihiutaleita säilytetään laitteessa, jossa verihiutaleita inkuboidaan ja pyöritetään noin 22 °C:n lämpötilassa.

Perinteiset, verihiutaleita varten tarkoitetut PL-732-astiat läpäisevät hyvin hiilidioksidia CO_2 . Verihiutaleiden säilyttäminen 5-prosenttisessä CO_2 -ilmakehässä estää alkuperäisen pH-arvon nousemisen sen seurauksena, että hiilidioksidia poistuu astiasta. Tämä ongelma voidaan ratkaista käyttämällä astiaa, joka läpäisee huomommin hiilidioksidia, tai käyttämällä toista, ei-toksista puskuria yhdessä natriumbikarbonaatin kanssa.

Jotta oheisen keksinnön mukaisen, verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen soveltuvuus verihiutaleiden säilyttämiseen saataisiin osoitetuksi, keksinnön puitteissa toteutettiin in vitro tutkimuksia, joissa verrattiin toisiinsa oheisen keksinnön mukaisessa väliaineessa säilytettyjen, verihiutaleita sisältävien tiivistesten ja plasmassa säilytettyjen, verihiutaleita sisältävien tiivistesten, joissa koaguloituminen

oli estetty sitraatti-fosfaatti-dekstroosilla, laatua. Seuraavat esimerkit ja vertailuesimerkit havainnollistavat vertailukokeissa saatuja tuloksia.

Esimerkit 1 - 5 ja vertailuesimerkit A - E

Toimenpiteet, joita käytettiin näissä esimerkeissä ja vertailuesimerkeissä verihiutaleiden erottamiseen sekä verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen valmistamiseen, olivat edellä keksinnön edullisen suoritusmuodon yhteydessä kuvattujen toimenpiteiden mukaisia. Esitetyt tiedot, jotka liittyvät verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen, on merkitty symbolilla "P. S. M", ja ne edustavat keksinnön esimerkkejä 1 - 5. Tiedot, jotka liittyvät verihiutaleiden varastointiin CPD-plasmassa, on merkitty symbolilla "CPD-pl.", ja ne edustavat vertailuesimerkkejä A - E. Vertailuesimerkit eivät edusta oheista keksintöä.

Näitä esimerkkejä ja vertailuesimerkkejä varten verihiutaleet erotettiin, varastoitiin vastaavissa väliaineissaan ja testattiin 1., 5., 10. ja 14. päivänä. Näinä mainittuina päivinä verihiutaleilla toteutetuissa kokeissa määritettiin verihiutaleiden lukumäärä prosentteina ensimmäisenä päivänä todetusta lukumäärästä, verihiutaleiden muodon muuttumisen voimakkuus prosentteina, hypotonisen shokin aiheuttamat vasteet prosentteina, adenosini-trifosfaatin eli "ATP:n" pitoisuus verihiutaleissa sekä vapautuneen maitohapon määrä verihiutaleiden vapauttaman laktaatti-dehydrogenaasin "LDH" perusteella. Näistä kokeista saadut tulokset esitetään vastaavasti taulukoissa 7 - 11.

Taulukko 7

Verihiutaleiden lukumäärä, % 1. päivän arvosta*

	1. vrk	5. vrk	10. vrk	14. vrk
P. S. M.	100	94±3	91±2	82±4
CPD-pl.	100	94±3	84±6	77±3

Taulukko 8

Muodon muuttumisen voimakkuus, %~

	1. vrk	5. vrk	10. vrk	14. vrk
P. S. M.	16±1	14±1	10±1	7±1
CPD-pl.	16±1	11±1	5±1	4±1

Taulukko 9

Hypotonisen shokin aiheuttama vaste, %~

	1. vrk	5. vrk	10. vrk	14. vrk
P. S. M.	75±6	65±4	63±5	40±3
CPD-pl.	82±3	78±5	49±2	12±5

Taulukko 10ATP-pitoisuus, nmol/10¹¹ verihituletta~

	1. vrk	5. vrk	10. vrk	14. vrk
P. S. M.	8,5±0,4	7,7±0,3	5,4±0,4	3,1±0,4
CPD-pl.	7,5±0,7	6,0±0,4	3,5±0,3	0,8±0,2

Taulukko 11

LDH, vapautuneet yksiköt~

	1. vrk	5. vrk	10. vrk	14. vrk
P. S. M.	138±16	177±22	305±33	430±43
CPD-pl.	120±8	215±15	430±23	585±35

* Tulokset ovat keskiarvo ± standardipoikkeama.

Näistä vertailututkimuksista saadut tulokset osoittavat, että verihituleiden varastointiin sopivassa väliaineessa säilytetyt verihituleet säilyttivät paremmin morfologisen ja fysiologisen yhtenäisyytensä, kuten seuraavasta voidaan todeta. Todettiin, että keksinnön mukaiseen, verihituleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen suspendoidut verihituleet säilyivät paremmin, mikä nähdään verihituleiden lukumäärässä esiintyvistä eroista koejakson aikana. Verihituleiden lukumäärän

pieneneminen viittaa verihiutaleiden kokkaroitumiseen ja/tai hajoamiseen. Keksinnön mukaiseen, verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen suspendoiduilla verihiutaleilla todettiin parempaa optista vääristymistä, eli nämä verihiutaleet säilyttivät kykynsä muuttaa muotoaan tai muuttua aktiiviseksi fysiologisia aktivaattoreita käytettäessä. Keksinnön mukaiseen, verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen suspendoitujen verihiutaleiden todettiin säilyvän paremmin kuin CPD-plasmaan suspendoidut verihiutaleet tarkasteltaessa niiden kykyä toipua hypotonisesta rasituksesta. Oheisen keksinnön mukaiseen, verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen suspendoitujen verihiutaleiden todettiin säilyttävän paremmin ATP-tasonsa, joka on verrannollinen verihiutalesolun energiatilaan. Oheisen keksinnön mukaiseen, verihiutaleiden varastointiin sopivaan väliaineeseen suspendoitujen verihiutaleiden todettiin säilyttävän paremmin solukalvonsa yhtenäisyys, mikä nähdään solun sisäisen LDH-entsyymin pienemistä vapautuneista määristä varastoinnin aikana.

Nämä esimerkit ja vertailuesimerkit osoittavat, että säilytetäessä verihiutaleiden tiivistettä verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa vähintään 10-14 vuorokautta ei-pakastavissa lämpötiloissa tai vähintään noin 22 °C:n lämpötilassa verihiutaleiden in vitro-laatu säilyy, joka laatu on verrannollinen verihiutaleiden elinkelpoisuuteen in vivo, ja tämän laadun ollessa samankaltainen kuin se laatu, johon päästään säilyttämällä verihiutaleita CPD-plasmassa 5 - 10 vuorokautta.

Esimerkki 6 ja vertailuesimerkit F - H

Tässä esimerkissä ja vertailuesimerkeissä käytetään samoja toimenpiteitä, jotka kuvattiin edellä esimerkkien 1 - 5 ja vertailuesimerkkien A - E yhteydessä. Tämä esimerkki ja vertailuesimerkit osoittavat sen vaikutuksen, joka saavutetaan käyttämällä erilaisissa, verihiutaleiden varastointiin sopivissa väliaineissa erilaisia määriä natriumsitraattia, natriumkloridia, magnesiumsulfaattia, natriumdifosfaattia, natriumbikarbo-

naattia, dekstroosia ja plasmaa sekä erilaista pCO_2 -jännitystä. Näitä muunnoksia havainnollistettiin vertaamalla toisiinsa erilaisten, verihiutaleiden varastointiin sopivien väliaineiden vaikutusta 10 päivää kestäneessä varastoinnissa (1) verihiutaleiden lukumäärään, (2) hypotonisen shokin aiheuttamaan prosentuaaliseen vasteeseen, (3) verihiutaleiden rakenteen yhtenäisyyteen, jonka arviointikriteerinä käytetään kokojakuman muuttumista, verihiutaleista muodostuneiden kokkareiden ja paisuneiden muotojen ilmaantumista, mikroskoopin avulla arvioituja kappaleita sekä LDH-entsyymin vapautumista, (4) verihiutaleiden toimintaan, jonka arviointikriteerinä käytetään muodon muuttumisen voimakkuutta ADP:n läsnäollessa, energia-aineenvaihduntaa verihiutaleissa tai hapen kulumisen, laktaatin muodostumisen ja glukoosin kulutuksen nopeutta, sekä (5) ATP-tasoihin. Näitä vaikutuksia havainnollistavat tiedot esitetään vastaavasti taulukoissa 12 - 16.

Esimerkissä 6 esitetään tiedot, jotka liittyvät keksinnön mukaisen, verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen viiteen mainittuun vaikutukseen, ja ne on merkitty symbolilla "P. S. M". Tässä esimerkissä käytetty, verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine on keksinnön edullisin suoritushuoto.

Vertailuesimerkeissä esitetään tiedot, jotka liittyvät symboleilla "BSM", "BSM + glukoosi" ja "DMSM" merkityn, verihiutaleiden varastointiin käytetyn väliaineen viiteen mainittuun vaikutukseen. Symboli "BSM" viittaa varastointiin sopivaan väliaineeseen, jolla on samat tunnusomaiset piirteet kuin keksinnön mukaisella edullisimmalla, verihiutaleiden varastointiin sopivalla väliaineella, mutta joka ei sisällä dekstroosia, ja jossa natriumkloridin pitoisuus on pienempi, eli 5,23 g/l. Symboli "BSM + dekstroosi" viittaa varastointiin käytettyyn väliaineeseen, jolla on samat tunnusomaiset piirteet kuin keksinnön mukaisella edullisimmalla, verihiutaleiden varastointiin sopivalla väliaineella, dekstroosi mukaan lukien, mutta jossa natriumkloridin pitoisuus on alhaisempi eli 5,23 g/l. Symboli "DMSM" viittaa varastointiin käytettyyn väliaineeseen, jolla on samat tunnusomaiset piirteet kuin keksin-

nön mukaisella edullisimmalla, verihiutaleiden varastointiin sopivalla väliaineella, mutta joka ei sisällä dekstroosia. Vertailuesimerkit eivät edusta oheista keksintöä.

Taulukko 12

Verihiutaleiden lukumäärä prosentteina 1. päivänä lasketusta lukumäärästä*

	1. vrk	5. vrk	10 vrk.
BSM		66 ± 8	47 ± 11
BSM + dekstroosi		83 ± 8	73 ± 10
DMSM		82 ± 10	56 ± 9
P. S. M.		95 ± 2	91 ± 3

Taulukko 13

Hypotonisen shokin aiheuttama vaste, palautuminen, %*

	1. vrk	5. vrk	10 vrk.
BSM	28 ± 5	20 ± 6	4 ± 10
BSM + dekstroosi	44 ± 10	44 ± 10	22 ± 10
DMSM	75 ± 13	41 ± 10	8 ± 5
P. S. M.	73 ± 20	61 ± 13	51 ± 6

Taulukko 14

Muodon muutos ADP:n läsnäollessa, OD-arvon kasvu, %*

	1. vrk	5. vrk	10 vrk.
BSM	13 ± 2	7 ± 3	2 ± 2
BSM + dekstroosi	16 ± 3	10 ± 4	5 ± 3
DMSM	15 ± 3	8 ± 2	1 ± 1
P. S. M.	17 ± 4	14 ± 2	10 ± 3

Taulukko 15

Hapen kulumisnopeus, nmol/min/10⁹ verihiutaletta*

	1. vrk	5. vrk	10 vrk.
BSM	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,1
BSM + dekstroosi	1,0 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2

DMSM	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1
P. S. M.	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,3

Taulukko 16

ATP, nmol/10⁹ verihiutaletta*

	1. vrk	5. vrk	10. vrk
DMSM	7,1 ± 1,5	5,3 ± 2,2	0,7 ± 0,2
PSM	8,5 ± 1,5	8,4 ± 1,3	6,5 ± 0,8

* Tulokset ovat keskiarvo ± standardipoikkeama.

Tässä esimerkissä ja vertailuesimerkeissä saadut tulokset osoittavat seuraavaa:

(1) Natriumsitraatin määrä, joka on vähintään 3000 - 6000 mg/l, tarvittiin estämään verihiutaleiden kokkaroituminen ja tästä johtuva tuhoutuminen.

(2) Verihiutaleiden kiekkomainen morfologia saatiin säilymään hyvin ja kokkaroituminen oli mitätöntä käytettäessä natriumkloridia pitoisuutena, joka on 64000 - 76000 mg/l. Taulukossa 12 esitetyistä tiedoista nähdään verihiutaleita sisältävän tiivisteen huono laatu, kun natriumkloridia käytettiin pitoisuutena 5,23 g/l.

(3) Kaksiarvoisten kationien (Mg⁺⁺ ja Ca⁺⁺) lisääminen oli välttämätöntä verihiutaleiden kiekkomaisen morfologian säilyttämiseksi. Kalsiumkloridia voidaan käyttää pitoisuutena, joka on alueella 100 - 400 mg/l, ja magnesiumkloridia voidaan käyttää 200 - 400 mg/l tulosten ollessa hyvät.

(4) Kaliumkloridia käytettiin pitoisuutena, joka oli 220 - 400 mg/l, tulosten ollessa hyvät.

(5) Natriumdifosfaattia käytettiin pitoisuutena, joka oli 100 - 580 mg/l, tulosten ollessa hyvät.

(6) Natriumbikarbonaattia käytettiin pitoisuutena, joka oli 2900 - 4200 mg/l, tulosten ollessa hyvät. Todettiin, että vähintään 2900 mg/l tarvitaan estämään pH-arvon alentuminen yli 7 vuorokautta kestävä varastoinnin aikana.

(7) 2,5 - 7,5-prosenttista CO₂-ilmakehää, riippuen lisätyn

natriumbikarbonaatin määrästä, käytettiin menestyksellisesti pH-arvon säilyttämiseen vakiona.

(8) Glukoosin (dekstroosin) lisääminen oli olennaista verihiutaleiden in vitro-laadun säilyttämiseksi, mikä nähdään taulukossa 12 esitetyistä tiedoista. Dekstroosia käytettiin pitoisuutena, joka oli 3000 - 7500 mg/l, tulosten ollessa hyvät.

(9) Verihiutaleiden varastointiin käytetyn väliaineen pH pidettiin alueella 6,8 - 7,4, 22 °C:n lämpötilassa mitattuna. pH, joka oli suurempi kuin 7,4, johti verihiutaleiden kokaroitumiseen, kun taas arvoa 6,8 pienempi pH johti turpoamiseen ja kiekkomaisen morfologian katoamiseen.

Esimerkki 7 ja vertailuesimerkki I

Verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen ja CPD-plasman samankaltaisuus kemiallisten ja fysiologisten ominaisuuksien suhteen on tae siitä, että verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine on luonnostaan ei-toksista ja sitä voidaan antaa turvallisesti infuusiona potilaille. Täten keksinnön puitteissa toteutettiin in vivo tutkimus verihiutaleilla, joita oli säilytetty oheisen keksinnön mukaisessa, verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa. Nämä tutkimukset muodostuivat 10 paritutkimuksesta, joihin osallistui normaaleja, yli 21 vuoden ikäisiä mieshenkilöitä. Koehenkilöiden ei tiedetty kärsivän henkisistä tai ruumiillisista vammoista, ja he eivät olleet lääkehoidossa. Nämä vapaaehtoiset luovuttivat yhden yksikön runsaasti verihiutaleita sisältävää plasmaa, joka otettiin käyttäen verihiutaleisiin tavallisesti sovellettua aforeesitekniikkaa. Tämä toimenpide toistettiin kahdesti. Verihiutaleita sisältävä tiiviste jatkokäsiteltiin 7 vuorokautta 22 °C:n lämpötilassa, joko CPD-plasmassa tai verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa, tapahtuvaa säilyttämistä varten tällä hetkellä käytössä olevalla menetelmällä.

Verihiutaleita sisältäviä tiivisteitä säilytettiin sekoitettavassa inkubaattorissa noin 22 °C:n lämpötilassa. CPD-plasmaan tehtyjä, verihiutaleita sisältäviä tiivisteitä säilytettiin normaalissa ilmakehässä. Verihiutaleiden varastointiin sopi-

vaan väliaineeseen tehtyjä, verihiutaleita sisältäviä tiivistä säilytettiin 7,5 % hiilidioksidia CO₂ sisältävässä ilmakehässä. CPD-plasmaan tehtyjen, verihiutaleita sisältävien tiivistöiden jatkokäsittelyminen ja säilyttäminen on tällä hetkellä käytössä olevan menetelmän mukaista.

Verihiutaleiden elinkelpoisuus in vivo määritettiin tavanno- maisten parametrien, eli talteensaanti- ja eloonjäämisprosen- tin, perusteella käyttäen alalla hyvin tunnettuja, radioisotoo- peilla merkitsemiseen perustuvia tekniikoita, joita kuvataan esimerkiksi teoksessa "Platelet Kinetics and Imaging", nide I, Techniques and Normal Platelet Kinetics, Heyns et al., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida (1985).

Kun verihiutaleita sisältäviä tiivistöitä oli säilytetty 7 vuorokautta, niistä otettiin 10 millilitraa verihiutaleiden merkitsemiseksi radioisotoopeilla eli 111 indium-oksiinilla. Pesty ja merkityt verihiutaleet suspendoitiin uudestaan 6 millilitraan ei-radioaktiivista autologista plasmaa niiden antamiseksi infuusiona alkuperäisille luovuttajille. Luovutta- jista otettiin infuusion jälkeen 1, 2 ja 3 tunnin välein, sitten päivittäin 7 vuorokauden ajan 2 millilitran suuruinen verinäyte, josta määritettiin talteensaanti- ja eloonjäämis- prosentti in vivo. Tutkimus toteutettiin siten, että ensimmäi- sen istunnon aikana 5 luovuttajalle annettiin infuusiona veri- hiutaleita, joita oli säilytetty keksinnön mukaisessa, veri- hiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa, ja 5 luovut- tajalle annettiin infuusiona verihiutaleita, joita oli säily- tetty CPD-plasmassa. Tämä toistettiin toisen istunnon aikana 2 kuukautta myöhemmin antamalla luovuttajille päinvastaisia, säilyttämiseen käytettyjä väliaineita. Talteensaanti- ja eloon- jäämisprosentit määritettiin käyttämällä gammafunktion monin- kertaiseen osumaan perustuvaa ohjelmaa. Merkittävien erojen ilmaisemiseen käytettiin parillisia t-testejä. Verihiutaleiden in vitro elinkelpoisuus arvioitiin hypotonisen shokin aiheut- taman vasteen ja ADP:llä aiheutetun muodonmuutoksen voimakkuu- den perusteella. Tulokset, joista nähdään talteensaanti- ja

eloonjäämisprosentit in vivo, esitetään vastaavasti taulukoissa 17 ja 18.

Taulukko 17

Talteenkantiprosentti in vivo, %

<u>Luovuttaja</u>	<u>CPD-plasma</u>	<u>P. S. M.</u>
1	29	57
2	23	52
3	36	52
4	43	47
5	31	52
6	61	66
7	33	48
8	28	37
9	41	44
<u>10</u>	<u>43</u>	<u>55</u>

Keskiarvo

± standardi-

poikkeama

37 ± 11

51 ± 8

Taulukko 18

Eloonjääneet verihiutaleet, tuntia

<u>Luovuttaja</u>	<u>CPD-plasma</u>	<u>P. S. M.</u>
1	54	125
2	85	162
3	126	159
4	171	145
5	103	155
6	86	146
7	122	150
8	107	114
9	129	154
<u>10</u>	<u>121</u>	<u>130</u>

poikkeama

144 ± 16

Hypotonisen shokin aiheuttama vaste, talteensaantiprosenttina

<u>Luovuttaja</u>	<u>CPD-plasma</u>	<u>P. S. M.</u>
1	18	75
2	39	57
3	47	62
4	40	60
5	35	58
6	44	70
7	47	67
8	40	50
9	50	55
10	77	100

poikkeama

65 ± 14

Taulukko 20

ADP:llä aiheutetun muodonmuutoksen voimakkuus

<u>Luovuttaja</u>	<u>CPD-plasma</u>	<u>P. S. M.</u>
1	4	12
2	6	13
3	8	19
4	7	14
5	10	13
6	8	14
7	17	18
8	7	11
9	14	11
<u>10</u>	<u>19</u>	<u>17</u>

Keskiarvo

± standardi-

poikkeama

9 ± 4

14 ± 3

Tässä esimerkissä ja vertailuesimerkissä saadut tulokset osoittavat, että verihiutaleita sisältävien tiivisteiden elinkelpoisuus in vivo paranee olennaisesti keksinnön mukaisessa, verihiutaleiden varastointiin sopivassa väliaineessa verrattuna CPD-plasmassa säilytettyihin verihiutaleisiin.

Patenttivaatimukset

1. Verihiutaleiden varastointiin sopiva steriili, plasmaa sisältämätön väliaine, t u n n e t t u siitä, että se käsittää fysiologisesti hyväksyttävää, elektrolyyttien vesiliuosta, joka sisältää yhdessä litrassa:

3,0 - 7,5 g dekstroosia;
3,0 - 6,0 g natriumsitraattia; ja
2,0 - 4,2 g natriumbikarbonaattia;

mainitun verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen ollessa isotonista, ja sen pH:n ollessa 6,8 - 7,4, ja mainitun verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen kyetessä säilyttämään verihiutaleita vähintään noin 10 vuorokautta vähintään noin 22 °C:n lämpötilassa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine, t u n n e t t u siitä, että se koostuu olennaisesti fysiologisesti hyväksyttävästä, elektrolyyttien vesiliuoksesta, joka sisältää yhdessä litrassa:

3,0 - 7,5 g dekstroosia;
3,0 - 6,0 g natriumsitraattia;
0,4 - 0,6 g sitruunahappoa; ja
2,0 - 4,2 g natriumbikarbonaattia;

mainitun verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen säilyttäessä verihiutaleita vähintään noin 14 vuorokautta vähintään noin 22 °C:n lämpötilassa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen, verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine, t u n n e t t u siitä, että dekstroosin pitoisuus on noin 7,035 g, natriumsitraatin pitoisuus on noin 4,471 g, sitruunahapon pitoisuus on noin 0,51 g, ja natriumbikarbonaatin pitoisuus on noin 3,0 g yhdessä litrassa tätä väliainetta.

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen, verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine, t u n n e t t u siitä, että yksi litra mainittua elektrolyyttiliuosta sisältää elektrolyytteinä:

- 6,4 - 7,6 g natriumkloridia;
- 0,2 - 0,4 g kaliumkloridia;
- 0,1 - 0,4 g kalsiumkloridia;
- 0,2 - 0,4 g magnesiumsulfaattia; sekä
- 0,1 - 0,6 g yksiemäksistä natriumfosfaattia.

5. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen, verihiutaleiden varastointiin sopiva väliaine, t u n n e t t u siitä, että yksi litra mainittua elektrolyyttiliuosta sisältää elektrolyytteinä:

- noin 6,45 g natriumkloridia;
- noin 0,375 g kaliumkloridia;
- noin 0,248 g kalsiumkloridia;
- noin 0,2 g magnesiumsulfaattia; sekä
- noin 0,355 g yksiemäksistä natriumfosfaattia.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukaisen, verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen käyttö ihmisverestä saatujen verihiutaleiden tiivisteen varastoimiseksi, mainitun verihiutaleiden varastointiin sopivan väliaineen ollessa isotonista ihmisveren suhteen.

7. Menetelmä verihiutaleiden säilyttämiseksi tarkoitetun verihiutaleiden varastointiin sopivan, plasmaa sisältämättömän väliaineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää fysiologisesti hyväksyttävän, elektrolyyttien vesiliuoksen valmistamisen siten, että elektrolyyttiliuoksen yhtä litraa kohden lisätään:

- 3,0 - 7,5 g dekstroosia;
- 3,0 - 6,0 g natriumsitraattia;
- 2,0 - 4,2 g natriumbikarbonaattia;

jolloin saadaan väliaine, joka on isotonista ja jonka pH on noin 6,8 - 7,4, jolloin olennainen osa siihen suspendoitavista

verihiutaleista pysyy elinkelpoisena vähintään noin 10 vuorokauden ajan vähintään noin 22 °C:n lämpötilassa.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhteen litraan elektrolyyttiliuosta lisätään

noin 7,035 g dekstroosia;

noin 4,471 g natriumsitraattia;

noin 3,0 g natriumbikarbonaattia; sekä

haluttaessa noin 0,51 g sitruunahappoa.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että elektrolyyttiliuoksena käytetään liuosta, joka litraa kohden sisältää elektrolyytteinä:

6,4 - 7,6 g natriumkloridia;

0,2 - 0,4 g kaliumkloridia;

0,1 - 0,4 g kalsiumkloridia;

0,2 - 0,4 g magnesiumsulfaattia; sekä

0,1 - 0,6 g yksiemäksistä natriumfosfaattia.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään liuosta, joka litraa kohden sisältää elektrolyytteinä:

noin 6,45 g natriumkloridia;

noin 0,375 g kaliumkloridia;

noin 0,248 g kalsiumkloridia;

noin 0,2 g magnesiumsulfaattia; sekä

noin 0,355 g yksiemäksistä natriumfosfaattia.

Patentkrav

1. Sterilt plasmafritt förvaringsmedium för blodplättar, k ä n n e t e c k n a t av att det innehåller en fysiologiskt kompatibel elektrolytvattenlösning, som i en liter lösning innehåller

3,0 - 7,5 g dextros;
3,0 - 6,0 g natriumcitrat; och
2,0 - 4,2 g natriumbikarbonat;

vilket förvaringsmedium för blodplättar är isotoniskt och har ett pH om 6,8 - 7,4, vilket förvaringsmedium för blodplättar förmår förvara blodplättar minst ca 10 dygn vid en temperatur om minst ca 22 °C.

2. Förvaringsmedium för blodplättar enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att det består väsentligen av en fysiologiskt kompatibel elektrolytvattenlösning, som i en liter lösning innehåller

3,0 - 7,5 g dextros;
3,0 - 6,0 g natriumcitrat;
0,4 - 6,0 g citronsyra; och
2,0 - 4,2 g natriumbikarbonat;

vilket förvaringsmedium för blodplättar förmår förvara blodplättar minst ca 14 dygn vid en temperatur om minst ca 22 °C.

3. Förvaringsmedium för blodplättar enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t av att halten av dextros är ca 7,035 g, halten av natriumcitrat är ca 4,471 g, halten av citronsyra är ca 0,51 g och halten av natriumbikarbonat är ca 3,0 g per liter av medium.

4. Förvaringsmedium för blodplättar enligt patentkravet 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a t av att en liter av elektrolytlösningen innehåller som elektrolyter

6,4 - 7,6 g natriumklorid;
0,2 - 0,4 g kaliumklorid;
0,1 - 0,4 g kalciumklorid;
0,2 - 0,4 g magnesiumsulfat; samt
0,1 - 0,6 g enbasiskt natriumfosfat.

5. Förvaringsmedium för blodplättar enligt patentkravet 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a t av att en liter av elektrolytlösningen innehåller som elektrolyter

ca 6,45 g natriumklorid;
ca 0,375 g kaliumklorid;
ca 0,248 g kalciumklorid;
ca 0,2 g magnesiumsulfat; samt
ca 0,355 g enbasiskt natriumfosfat.

6. Användning av förvaringsmediet för blodplättar enligt patentkravet 5 för förvaring av ett koncentrat av humana blodplättar, varvid förvaringsmediet för blodplättar är isotoniskt för humant blod.

7. Förfarande för framställning av ett plasmafritt förvaringsmedium för blodplättar, k ä n n e t e c k n a t av att förfarandet innefattar framställning av en fysiologiskt kompatibel elektrolytvattenlösning så, att till en liter av av elektrolytlösning tillsätts:

3,0 - 7,5 g dextros;
3,0 - 6,0 g natriumcitrat; och
2,0 - 4,2 g natriumbikarbonat;

varvid man erhåller ett medium som är isotoniskt och har ett pH om 6,8 - 7,4, varvid en väsentlig del av blodplättar som suspenderas i mediet förblir livskraftiga minst ca 10 dygn vid en temperatur om minst 22 °C.

8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t av att till en liter elektrolytlösning tillsätts

ca 7,035 g dextros;
ca 4,471 g natriumcitrat;
ca 3,0 g natriumbikarbonat; och
om så önskas 0,51 g citronsyra.

9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a t
av att man som elektrolytlösning använder en lösning som per
liter innehåller som elektrolyter:

6,4 - 7,6 g natriumklorid;
0,2 - 0,4 g kaliumklorid;
0,1 - 0,4 g kalciumklorid;
0,2 - 0,4 g magnesiumsulfat; samt
0,1 - 0,6 g enbasiskt natriumfosfat.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a t
av att man använder en lösning, som per liter innehåller som
elektrolyter

ca 6,45 g natriumklorid;
ca 0,375 g kaliumklorid;
ca 0,248 g kalciumklorid;
ca 0,2 g magnesiumsulfat; samt
ca 0,355 g enbasiskt natriumfosfat.