

Ocena jakości ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek czerwonych zamrażanych i rozmrażanych w systemie ACP 215

Leukodepleted red blood cell concentrates frozen and thawed in ACP 215 system; evaluation study

Agnieszka Żak¹, Elżbieta Lachert², Jolanta Antoniewicz-Papis², Anna Tomaszewska², Wiesław Tomaszewski³, Barbara Biedrzycka⁴, Ewa Potocka², Edyta Jarmocik¹, Justyna Mazur¹, Dariusz Blinowski¹, Adam Olszewski¹

¹Wojskowe Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa

²Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

³Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Samodzielny Zespół Publicznych Zakładów Opieki Zdrowotnej w Nowym Dworze Mazowieckim

⁴Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Wstęp: Kriokonserwacja umożliwia długoterminowe przechowywanie koncentratów krwinek czerwonych (KKCz). Zastosowanie automatycznego systemu ACP 215 (Haemonetics) pozwala na przeprowadzenie procedury zamrażania i rozmrażania KKCz w układzie zamkniętym. Zawieszenie KKCz w roztworze wzbogacającym pozwala na wydłużenie okresu ważności rozmrożonego składnika. Automatyzacja zapewnia powtarzalność i standaryzację procesu. Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości rutynowego wykorzystywania systemu ACP 215 do zamrażania i rozmrażania ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek czerwonych (UKKCz).

Materiał i metody: Ocenie poddano dwie procedury przygotowania KKCz do glicerolizacji w systemie ACP 215: przy wykorzystaniu filtrów do usuwania leukocytów z KKCz oraz przy wykorzystaniu filtrów do usuwania leukocytów z krwi pełnej (KP) (in-line). Do badań wykorzystano 30 jednostek UKKCz. Oznaczano: stężenie hemoglobiny, hematokryt (Ht), stopień hemolizy, pH, stężenie jonów potasu, stężenie glukozy, aktywność dehydrogenazy mleczanowej oraz oporność osmotyczną krwinek czerwonych. Badania prowadzono w ciągu 7 dni przechowywania w zamrożonych, a następnie rozmrożonych UKKCz (grupy badane) i w UKKCz przechowywanym w temperaturze 2–6°C (grupy kontrolne).

Wyniki: W pierwszym etapie badań (zamrażanie i rozmrażanie UKKCz otrzymanych po filtracji KKCz) stwierdzono znamienne niższe, niezgodne z zakresem normy, wartości Ht w grupie badanej (w porównaniu z grupą kontrolną). W drugim etapie badań (zamrażanie i rozmrażanie UKKCz otrzymanych po filtracji KP) wyniki badań zarówno w badanej grupie, jak kontrolnej mieściły się w zakresie normy.

Wnioski: Sposób przygotowania KKCz do procesu glicerolizacji w znaczący sposób wpływa na jakość rozmrożonego składnika, w związku z czym do rutynowej pracy w Wojskowym Cen-

trum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa zostanie wdrożona metoda mrożenia UKKCz uzyskanego po usunięciu KP w procedurze filtracji in-line.

Słowa kluczowe: koncentrat krwinek czerwonych, kriokonserwacja, glicerolizacja, deglicerolizacja, UKKCz

J. Transf. Med. 2011; 1: 32–44

Summary

Background: *Cryopreservation extends storage time of red blood cell concentrates (RBC). In the automatic ACP 215 (Haemonetics) system the unintentional bioburden risk during freezing/thawing is reduced as the procedure is performed within a closed system. Suspension of RBC in additive solution extends storage time of RBC. Automation assures procedure consistency and standardization. The aim of the study was to assess the routine use of ACP 215 system for freezing and thawing of leuko-depleted RBCs. Two procedures of RBC preparation for glycerolization in the ACP 215 system were evaluated: filters for removal of leukocytes from RBC and in-line filters for removal of leukocytes from whole blood (WB).*

Material and methods: *In the study we used 30 leuko-depleted RBC units. The following parameters were determined: Hb concentration, Ht, haemolysis, pH, K⁺ concentration, glucose concentration, LDH activity and osmotic resistance of red blood cells. The study was performed during 7-day storage of leuko-depleted RBCs after thawing.*

Results: *In the first study-stage (freezing and thawing of leuko-depleted RBCs after RBC filtration) the Ht and Hb values were significantly higher in the leuko-depleted RBCs control group than in the study group. In the second study-stage (freezing and thawing of leuko-depleted RBCs obtained after WB filtration) the parameters were within normal quality control range.*

Conclusions: *How RBCs are prepared for glycerolization has significant impact on the quality of the component after thawing, the Military Blood Transfusion Center is therefore planning to implement the method of freezing leuko-depleted RBCs obtained in the procedure of in-line filtration.*

Key words: red blood cell concentrate, cryopreservation, glycerolization, deglycerolization, leuko-depleted RBCs

J. Transf. Med. 2011; 1: 32–44

Wstęp

Opracowanie i wprowadzenie do preparatyki składników krwi płynów wzbogacających pozwoliło wydłużyć okres przechowywania koncentratu krwinek czerwonych (KKCz) do 42 dni. Taki okres przydatności na ogół wystarcza do rutynowego stosowania tego składnika, nie daje jednak możliwości gromadzenia zapasów KKCz w przypadku wyjątkowych potrzeb, takich jak: niespodziewane i nagłe zapotrzebowanie na dużą ilość koncentratów krwinek czerwonych (katastrofy, kataklizmy, wojny) lub na krew o rzadkim fenotypie. Dlatego od wielu lat jako alternatywną metodę przechowywania KKCz stosuje się kriokonserwację. Dzięki tej metodzie, polegającej na zamrażaniu KKCz przy użyciu roztworów kriochronnych (roztworu glicerolu o różnym

stężeniu), można wydłużyć czas przechowywania krwinek czerwonych przy jednoczesnym zachowaniu ich właściwości terapeutycznych.

Zgodnie z „Medycznymi zasadami pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązującymi w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi” [1], termin ważności KKCz rozmrożonego w systemie otwartym wynosi 8 godzin, natomiast 24 godziny w przypadku zastosowania systemu zamkniętego. Zastosowanie automatycznego systemu ACP 215 (*Haemonetics*) pozwala wykonać obie procedury (zamrażania i rozmrażania) w układzie zamkniętym i skutecznie zminimalizować ryzyko związane z mimowolnym przeniesieniem zanieczyszczeń mikrobiologicznych w trakcie preparatyki. Zawieszenie krwinek czerwonych w roztworze wzbogacającym pozwala na wydłużenie okresu

ważności rozmrożonego KKCz. Automatyzacja zapewnia ponadto powtarzalność procesu i większą standaryzację parametrów jakości w rozmrożonych KKCz. W kilku pracach na temat automatycznego procesu zamrażania i rozmrażania krwinek czerwonych autorzy powołują się na badania, w których dopuszcza się wydłużenie czasu przechowywania rozmrożonych KKCz w temperaturze 2–4°C do 14 dni [2–5]. Zgodnie z wytycznymi [1] zastosowanie niektórych urządzeń automatycznych podczas procedury rozmrażania umożliwia wydłużenie czasu przechowywania rozmrożonego KKCz powyżej 24 godzin, o ile preparatyka wykonywana jest w układzie zamkniętym, a krwinki zawieszono w roztworze wzbogacającym. Wydłużenie terminu ważności rozmrożonych KKCz umożliwiłoby optymalizację dystrybucji i transportu, a tym samym zwiększyłoby dostęp do rozmrożonych KKCz. W niniejszej pracy zastosowano kriokonserwację KKCz przy użyciu roztworu glicerolu o wysokim stężeniu (40%), a zamrożone jednostki przechowywano w temperaturze od –80°C do –84°C.

Celem pracy było zbadanie możliwości rutynowego wykorzystywania systemu ACP 215 do zamrażania i rozmrażania ubogoleukocytarnych KKCz (UKKCz). Oceniono także dwie procedury przygotowywania KKCz do glicerolizacji w systemie ACP 215:

1. przy wykorzystaniu filtrów do usuwania leukocytów z KKCz oraz
2. przy wykorzystaniu filtrów do usuwania leukocytów z krwi pełnej (KP) (*in-line*).

W pierwszym etapie pracy badano UKKCz uzyskane poprzez filtrację za pomocą filtrów przeznaczonych do KKCz. Przeprowadzono oznaczenia podstawowych parametrów kontroli jakości takich jak: stężenie hemoglobiny (Hb), hematokryt (Ht) i stopień hemolizy. W drugim etapie badań prowadzono filtrację KP, a następnie uzyskane wyniki poddano analizie w celu dokonania wyboru optymalnej procedury przygotowania ubogoleukocytarnego KKCz. Przeprowadzono badania walidacyjne z wykorzystaniem oznaczenia następujących parametrów: stężenie Hb, Ht, stopień hemolizy, stężenie jonów potasu (K^+), pH, zużycie glukozy, aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) oraz badanie oporności osmotycznej krwinek czerwonych.

Materiał i metody

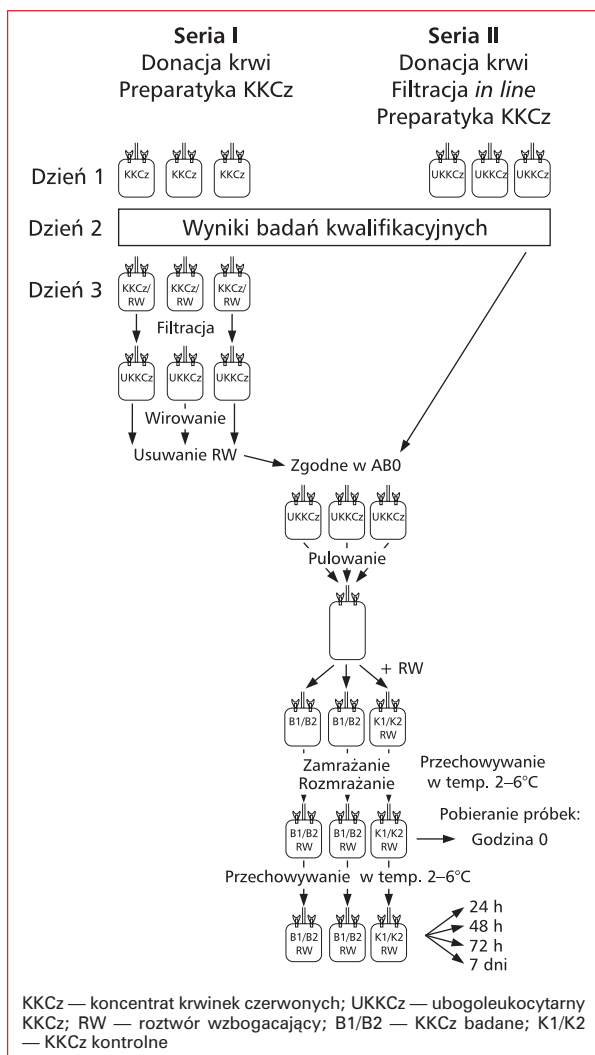
Pierwsza seria badań (filtracja KKCz)

Do pierwszej serii badań wykorzystano 15 jednostek KKCz otrzymanych metodą manualną. Krew pełną pobierano od dawców, u których stężenie Hb

wynosiło powyżej 14 g/dl, do potrójnych zestawów pojemników typu „góra-dół”, zawierających płyn konserwujący CPD (*citrate phosphate dextrose*) (Macpharma, Francja). Wszystkie etapy preparatyki wykonywano w systemie zamkniętym przy wykorzystaniu zgrzewarki do sterylnej łącznicy drenów TSCD (Terumo, Japonia). Po pobraniu krew wirowano w temperaturze 20°C w wirówce Juan KR4i (Juan, Francja) przez 15 min, 4000 × g. Odwirowane frakcje oddzielano za pomocą automatycznej prasy Optipress II (Baxter, Stany Zjednoczone). Oddzielone KKCz przechowywano w temperaturze 2–6°C bez dodawania roztworu wzbogacającego. Jednostki przeznaczone do glicerolizacji spełniały zalecenia specyfikacji systemu do zamrażania i rozmrażania (Ht > 75%, ubogoleukocytarne, bez roztworu wzbogacającego). Trzeciego dnia, po otrzymaniu ujemnych wyników badań wirusologicznych, jednostki KKCz (zgodne w układzie AB0), do których dodano po 100 ml roztworu wzbogacającego SAGM (*sodium chloride, adenine, glucose, mannitol*), poddawano filtracji (Leucolab LCG4; Macpharma, Francja). W celu usunięcia roztworu wzbogacającego i uzyskania odpowiedniej wartości Ht, każdą jednostkę KKCz wirowano (4°C; 4 min; 1615 × g), a następnie zlewano po 3 jednostki KKCz do pojemnika 1000 ml (Ravimed, Polska). Po dokładnym wymieszaniu, KKCz dzielono na 3 równe wagowo części. Do jednego z trzech pojemników, który stanowił kontrolę (K1), dodawano SAGM, pobierano próbkę do badań, a następnie przechowywano w temperaturze 2–6°C. Pozostałe dwa pojemniki z KKCz (B1), poddawano procesowi glicerolizacji i zamrażano w temperaturze –80°C. Po 24 godzinach przechowywania, KKCz z grupy B1 rozmrażano i poddawano procesowi deglicerolizacji w automatycznym systemie ACP 215 zgodnie z procedurą opracowaną przez Valeriego [6]. Po zakończeniu procesu i zawieszeniu krwinek w SAGM, pobierano próbki do badań (próbka w godzinie 0). Następnie z obydwu grup preparatów (K1 i B1) pobierano próbki: po 24, 48, 72 godzinach oraz po 7 dniach przechowywania. Wszystkie jednostki KKCz przechowywano w identycznych warunkach w temperaturze 2–6°C.

Druga seria badań (filtracja KP *in-line*)

Druga seria badań obejmowała 15 jednostek KKCz uzyskanych z KP pobranej do poczwórnych zestawów pojemników z filtrem *in-line* do krwi pełnej. Procedura preparatyki oraz pobierania próbek była identyczna jak opisana w sekcji dotyczącej pierwszej serii badań, z tym tylko wyjątkiem, że procesowi filtracji poddawano w systemie *in-line* krew pełną, z której następnie po odwirowaniu, za



Rycina 1. Schemat badań; otrzymywanie UKKCz przy zastosowaniu dwóch metod filtracji (KKCz i KP)

Figure 1. Procedure for leuko-depleted RBC preparation with two filtration methods

pomocą prasy manualnej uzyskiwano UKKCz (B2 — grupa badana; K2 — grupa kontrolna). Tą procedurę przedstawiono na rycinie 1.

Metody badań kontroli jakości

Badano:

- wartość Ht i stężenie Hb przy użyciu analizatora hematologicznego Coulter ACT 3 Diff (Beckman; Stany Zjednoczone);
- stopień hemolizy przy zastosowaniu aparatu Plasma Low (Hemocue; Szwecja);
- wartość pH przy użyciu pH-metru Microprocessor HI 9020 (Hanna Instruments, Stany Zjednoczone);

- stężenie potasu metodą pośrednią z zastosowaniem elektrod jonoselektywnych przy użyciu aparatu Integra 400 plus (Roche, Szwajcaria);
- stężenie glukozy metodą z heksokinazą przy użyciu aparatu Integra 400 plus (Roche, Szwajcaria);
- aktywność LDH metodą kinetyczną przy użyciu analizatora biochemicznego A-25 (BioSystems, Hiszpania);
- oporność osmotyczną metodą spektrofotometryczną przy użyciu spektrofotometru Lambda 12 (Perkin Elmer, Stany Zjednoczone);
- czystość mikrobiologiczną przy użyciu aparatu do hodowli krwi BacTec 9050 (Biomérieux, Francja) z zastosowaniem podłoża uniwersalnego typu Peds Plus dla drobnoustrojów tlenowych i beztlenowych (Biomérieux, Francja).

Statystyka

Obliczenia statystyczne: odchylenie standardowe (SD, *standard deviation*), test *t*-Studenta dla wyników sparowanych, wykonano przy użyciu programu Microsoft Excel. Różnice pomiędzy porównywanymi wynikami uznawano za istotne statystycznie przy *p* mniejszym niż 0,05.

Wyniki

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabelach: 1–3 oraz na rycinach 2–15.

W pierwszym etapie badań dla grup K1 i B1 oznaczano jedynie podstawowe parametry kontroli jakości: stężenie Hb, wartość Ht oraz stopień hemolizy. Stwierdzono znamienne niższe wartości Ht i stężenia Hb w grupie UKKCz badanych (B1) w porównaniu z UKKCz z grupy kontrolnej (K1). Stopień hemolizy w obu grupach (K1 i B1) spełniał wymagania normy i różnice nie były istotne statystycznie [1]. Wyniki Ht dla UKKCz z grupy badanej (B1) nie spełniały wymagań normy kontroli jakości dla tego rodzaju składnika, w związku z tym nie prowadzono dalszych badań dla tej grupy (tab. 1).

W drugim etapie badań porównywano wyniki badań UKKCz otrzymanego przy zastosowaniu filtracji krwi pełnej *in-line*. Stwierdzono niższe wartości Ht i stężenia Hb w grupie badanej (B2) w stosunku do grupy kontrolnej (K2). W tym przypadku otrzymane wartości Ht i stężenia Hb dla B2 i K2 spełniały normy kontroli jakości dla UKKCz z roztworem wzbogacającym po rozmrożeniu.

Dane przedstawione w tabeli 3 świadczą o tym, że wartości uzyskane dla Ht i stężenia Hb w grupie B2 (KKCz uzyskane po filtrowaniu krwi pełnej metodą *in-line*) były znacząco wyższe niż w grupie B1 (KKCz filtrowane po rozdziale KP). Różnice

Tabela 1. Badania kontroli jakości UKKCz otrzymanych metodą filtracji KKCz, następnie deglicerolizowanych w systemie ACP 215**Table 1.** Quality control of leuko-depleted RBCs obtained after filtration of RBC, then deglycerolized in the ACP 215 system

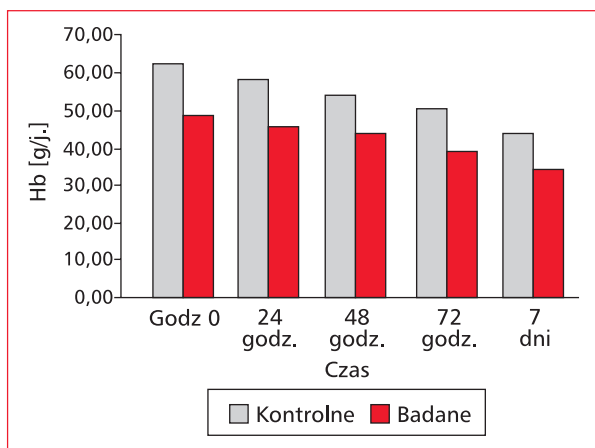
Parametry	K1	B1	K1	B1	K1	B1	K1	B1	K1	B1
	Godz. 0		24 godz.		48 godz.		72 godz.		7 dni	
Hemoglobina [g/j.]	47,96 ± 3,01	41,15 ± 3,17	44,32 ± 2,84	38,19 ± 2,99	40,14 ± 2,79	36,00 ± 2,52	36,66 ± 2,72	32,94 ± 2,05	31,00 ± 2,40	28,99 ± 1,94
Hematokryt (%)	59,70 ± 3,51	44,80 ± 3,20	59,46 ± 2,87	45,29 ± 3,37	59,24 ± 2,74	45,56 ± 4,21	59,98 ± 3,03	46,06 ± 2,71	59,98 ± 3,32	45,39 ± 2,89
Hemoliza (%)	0,22 ± 0,13	0,18 ± 0,08	0,26 ± 0,09	0,25 ± 0,07	0,25 ± 0,14	0,28 ± 0,05	0,31 ± 0,13	0,34 ± 0,04	0,31 ± 0,16	0,57 ± 0,12

Tabela 2. Badania kontroli jakości UKKCz otrzymanych z KP metodą filtracji *in-line*, następnie deglicerolizowanych w systemie ACP 215**Table 2.** Quality control of leuko-depleted RBCs obtained after in-line filtration of WB then deglycerized in the ACP 215 system

Parametry	K2	B2	K2	B2	K2	B2	K2	B2	K2	B2
	Godz. 0		24 godz.		48 godz.		72 godz.		7 dni	
Hemoglobina [g/j.]	61,94 ± 0,62	48,61 ± 1,21	57,86 ± 1,60	45,35 ± 1,10	54,05 ± 1,25	43,32 ± 2,88	50,24 ± 2,78	38,91 ± 1,63	43,74 ± 4,90	34,03 ± 3,96
Hematokryt (%)	60,68 ± 1,11	51,58 ± 1,61	61,02 ± 0,44	51,59 ± 0,94	61,44 ± 0,83	52,45 ± 3,38	61,70 ± 1,65	51,42 ± 0,80	61,74 ± 2,19	51,75 ± 0,77
Hemoliza (%)	0,21 ± 0,12	0,25 ± 0,15	0,34 ± 0,22	0,24 ± 0,13	0,23 ± 0,11	0,26 ± 0,17	0,22 ± 0,11	0,24 ± 0,09	0,30 ± 0,17	0,42 ± 0,13
pH	7,13 ± 0,05	6,62 ± 0,08	7,19 ± 0,17	6,59 ± 0,16	7,06 ± 0,22	6,60 ± 0,13	7,05 ± 0,16	6,53 ± 0,09	6,96 ± 0,12	6,51 ± 0,07
K ⁺ [mmol/l]	4,77 ± 0,88	0,70 ± 0,18	7,87 ± 1,54	4,42 ± 0,74	9,90 ± 2,81	6,92 ± 1,03	14,04 ± 1,63	8,87 ± 1,17	20,09 ± 4,60	15,49 ± 1,22
Glukoza [mg/dl]	498,67 ± 68,88	422,08 ± 73,35	487,04 ± 77,58	422,51 ± 57,46	443,54 ± 119,90	410,33 ± 70,40	498,41 ± 24,25	422,94 ± 72,45	408,13 ± 88,42	411,92 ± 47,39
LDH [j./l]	103,00 ± 33,31	18,10 ± 5,74	93,00 ± 42,37	19,00 ± 9,00	134,00 ± 5,00	31,00 ± 9,00	118,00 ± 11,00	22,17 ± 8,83	108,67 ± 32,33	20,50 ± 13,50

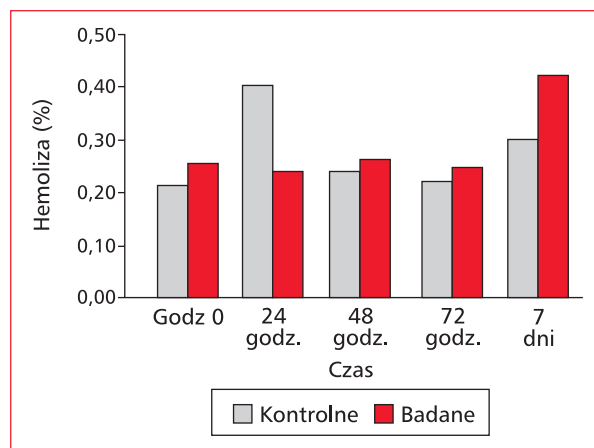
Tabela 3. Porównanie dwóch metod filtracji UKKCz, poddawanych deglicerolizacji w systemie ACP 215**Table 3.** Comparison of two methods of filtration of leuko-depleted RBC, then deglycerized in the ACP 215 system

Parametry	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
	Godz. 0		24 godz.		48 godz.		72 godz.		7 dni	
Hemoglobina [g/j.]	41,15 ± 3,17	48,61 ± 1,21	38,19 ± 2,99	45,35 ± 1,10	36,00 ± 2,52	43,32 ± 2,88	32,94 ± 2,05	38,91 ± 1,63	28,99 ± 1,94	34,03 ± 3,96
Hematokryt (%)	44,80 ± 3,20	51,58 ± 1,61	45,29 ± 3,37	51,59 ± 0,94	45,56 ± 4,21	52,45 ± 3,38	46,06 ± 2,71	51,42 ± 0,80	45,39 ± 2,89	51,75 ± 0,77
Hemoliza (%)	0,18 ± 0,08	0,25 ± 0,15	0,25 ± 0,07	0,24 ± 0,13	0,28 ± 0,05	0,26 ± 0,17	0,34 ± 0,04	0,24 ± 0,09	0,57 ± 0,12	0,42 ± 0,13



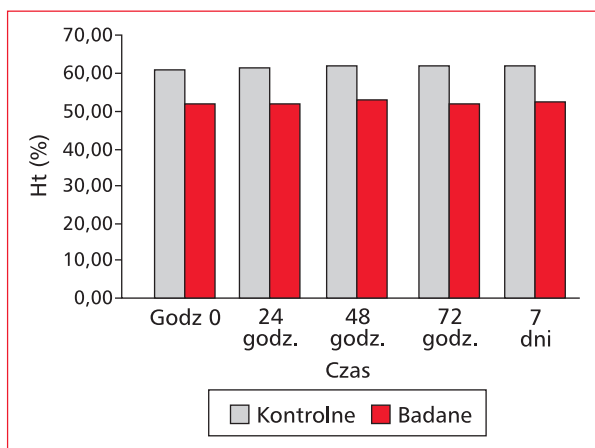
Rycina 2. Zmiany stężenia Hb podczas 7-dniowego przechowywania UKKCz

Figure 2. Changes in Hb values during 7-day storage of leukodepleted RBC



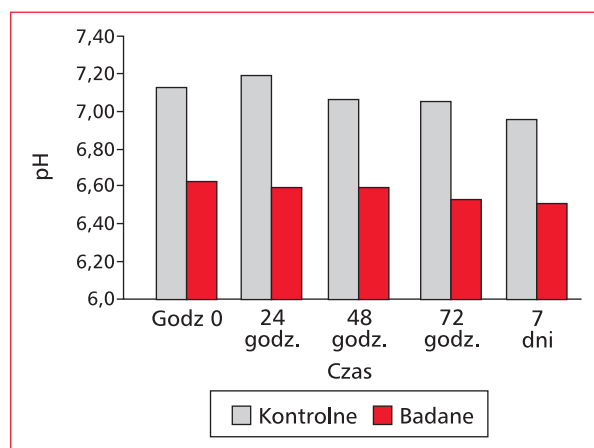
Rycina 4. Zmiany stopnia hemolizy podczas 7-dniowego przechowywania UKKCz

Figure 4. Changes in haemolysis during 7-day storage of leukodepleted RBC



Rycina 3. Zmiany wartości Ht podczas 7-dniowego przechowywania UKKCz

Figure 3. Changes in Ht values during 7-day storage of leukodepleted RBC



Rycina 5. Zmiany wartości pH podczas 7-dniowego przechowywania UKKCz

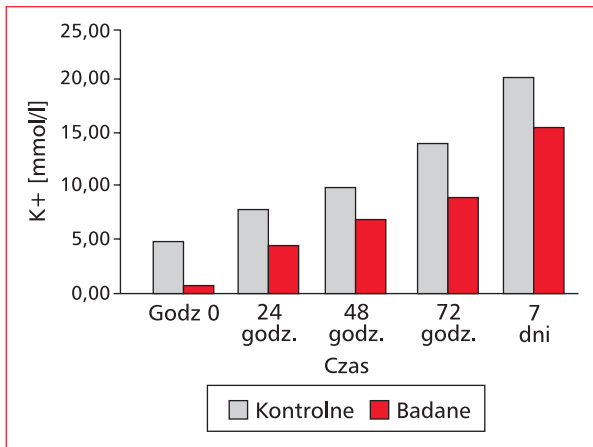
Figure 5. Changes in pH values during 7-day storage of leukodepleted RBC

w stopniu hemolizy pomiędzy grupami B2 i K2 nie były istotne statystycznie (tab. 2, ryc. 2–4) i w związku z tym wprowadzono badania pozostałych parametrów. Wartości pH w grupie B2 były znacząco niższe w stosunku do K2. Jednocześnie wartość pH w obydwu grupach podczas całego okresu przechowywania zmniejszyła się w grupie K2 o 0,17; a w grupie B2 o 0,11 (ryc. 5).

W grupie B2 po rozmrożeniu (godz. 0) stwierdzono jedynie śladowe ilości potasu (0,6 mmol/l), co było związane z odpłukiwaniem glicerolu podczas procedury rozmrażania (w grupie K2 stężenie potasu w tym samym czasie wynosiło $4,77 \pm 0,88$ mmol/l). W związku z tym, jako moment

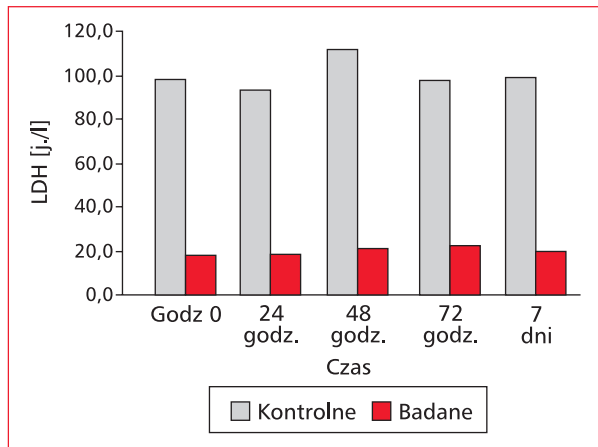
wyjściowy dla porównania stężenia potasu w obu grupach przyjęto 24 godzinę przechowywania od chwili rozmrożenia B2. W 7 dniu przechowywania stężenie potasu w grupie B2 wzrosło od tego czasu prawie czterokrotnie, a w grupie K2 około trzykrotnie (tab. 2, ryc. 6).

Po 7 dniach przechowywania w grupie B2 stwierdzono obniżenie stężenia glukozy jedynie o około 3%, natomiast w grupie K2 w tym samym czasie spadek stężenia glukozy wynosił 18% (w porównaniu z godziną 0). Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą badaną i kontrolną po 24 i 72 godzinach przechowywania (odpowiednio $p = 0,03$ oraz $p = 0,02$) (ryc. 7).



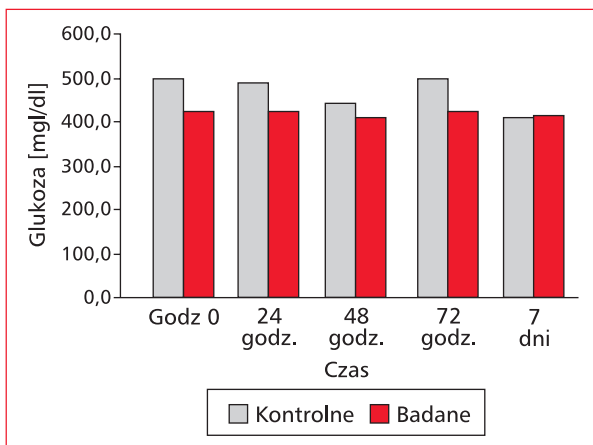
Rycina 6. Zmiany stężenia potasu (K⁺) podczas 7-dniowego przechowywania UKKCz

Figure 6. Changes in K⁺ concentration during 7-day storage of leukodepleted RBC



Rycina 8. Zmiany aktywności LDH podczas 7-dniowego przechowywania UKKCz

Figure 8. Changes in LDH activity during 7 day storage of leukodepleted RBC



Rycina 7. Zmiany stężenia glukozy podczas 7-dniowego przechowywania UKKCz

Figure 7. Changes in glucose concentration during 7-day storage of leukodepleted RBC

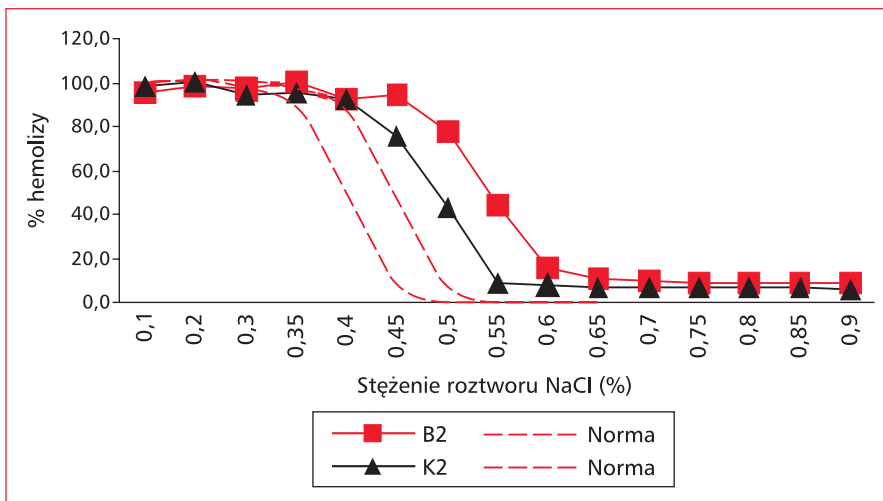
Aktywność LDH nie zmieniała się podczas całego okresu przechowywania ani w grupie badanej, ani w kontrolnej. Natomiast wartości LDH w grupie B2 były znacznie i znamienne niższe niż w grupie K2. Porównując zmiany stężenia LDH w obu grupach (K2 i B2) podczas przechowywania, zaobserwowano, że stężenie LDH stopniowo zwiększało się (w grupie K2 do 48 godz., a w grupie B2 do 72 godz.), a następnie obniżało (ryc. 8).

W badaniach uzyskano wyniki oporności osmotycznej odbiegające od zakresu normy dla świeżo

pobraną krwinek czerwonych (ryc. 9–15); początek hemolizy obserwowano dopiero przy stężeniu 0,7% NaCl (czyli zaobserwowano przesunięcie początku hemolizy w kierunku wyższego stężenia roztworu NaCl w porównaniu z normą). Podczas całego okresu przechowywania nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wynikach oporności osmotycznej krwinek czerwonych ani w grupie preparatów kontrolnych, ani badanych (ryc. 14, 15). Jednak w grupie badanej B2 stwierdzono mniejszą oporność osmotyczną krwinek niż w grupie kontrolnej K2.

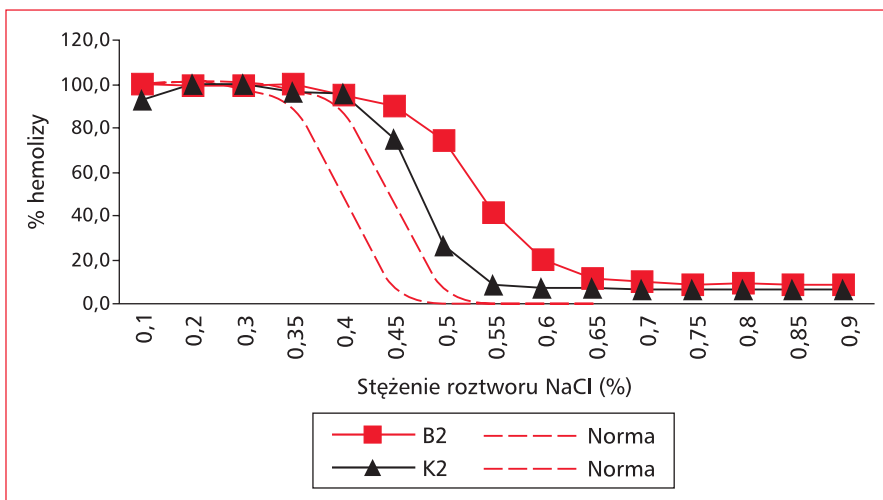
Dyskusja

Współczesne krwiodawstwo wykorzystuje zdobyte nowoczesnych technologii dla zapewnienia wysokiego standardu bezpieczeństwa procesu preparatyki krwi i wartości terapeutycznej otrzymywanych składników krwi. Obecnie centra krwiodawstwa i krwiolecznictwa na coraz większą skalę wprowadzają automatyczne metody pobierania i preparatyki krwi, alternatywne w stosunku do metod konwencjonalnych (manualnych). Metody automatyczne zapewniają nie tylko lepszą standaryzację procedur otrzymywania składników krwi, ale znacznie zmniejszają ryzyko mimowolnych zanieczyszczeń mikrobiologicznych, ponieważ w większości przypadków są przeprowadzane w układzie zamkniętym. Opracowany ostatnio przez firmę *Haemonetics* system do automatycznej glicerolizacji i deglicerolizacji KKCz umożliwia optymalizację procedury zamrażania i rozmrażania tego składnika krwi.



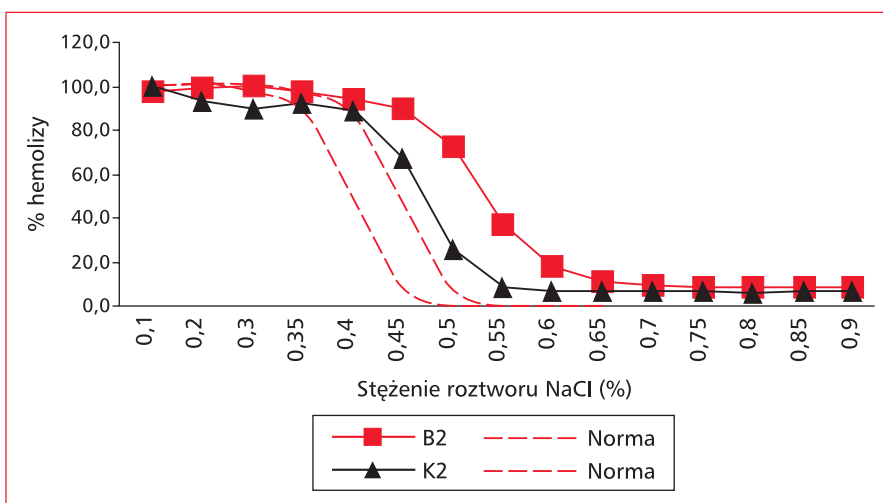
Rycina 9. Zmiany oporności osmotycznej w godz. 0

Figure 9. Changes in osmotic resistance at 0 h



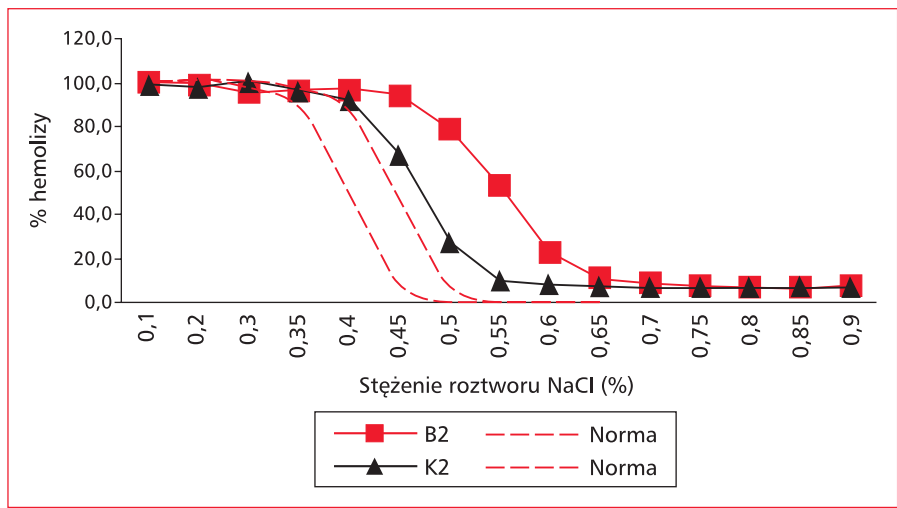
Rycina 10. Zmiany oporności osmotycznej po 24 godz. przechowywania

Figure 10. Changes in osmotic resistance after 24 hours of storage

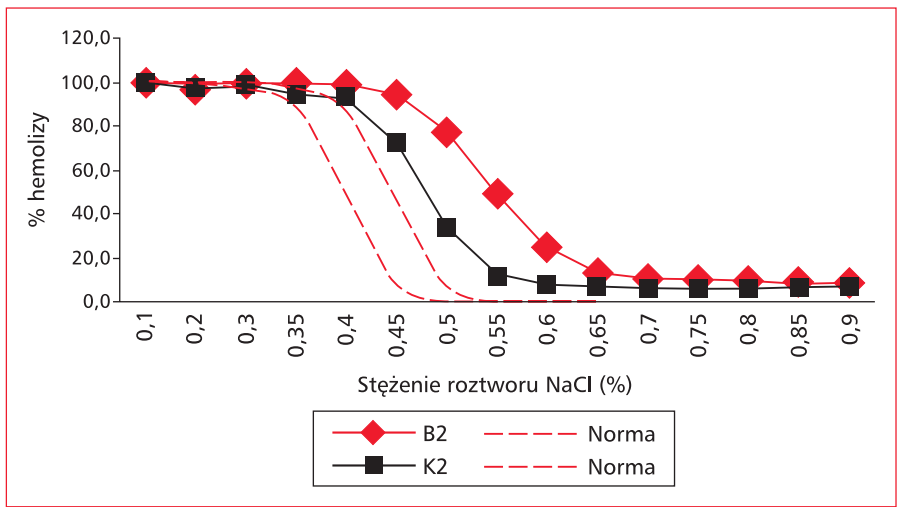


Rycina 11. Zmiany oporności osmotycznej po 48 godz. przechowywania

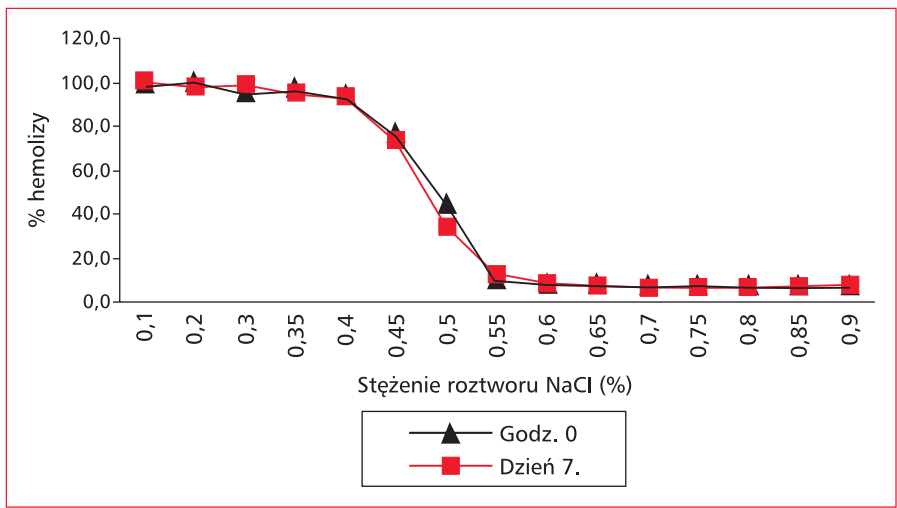
Figure 11. Changes in osmotic resistance after 48 hours



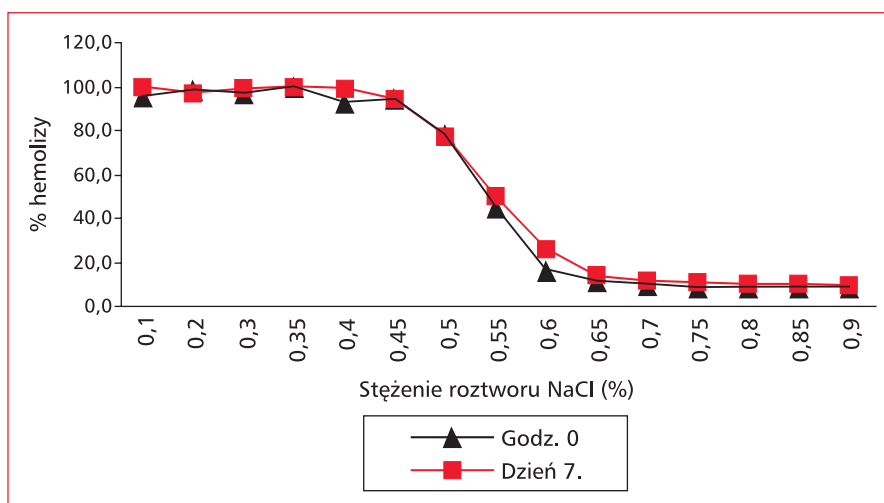
Rycina 12. Zmiany oporności osmotycznej po 72 godz. przechowywania
 Figure 12. Changes in osmotic resistance after 72 hours of storage



Rycina 13. Zmiany oporności osmotycznej po 7 dniach przechowywania
 Figure 13. Changes in osmotic resistance after 7 days of storage



Rycina 14. Zmiany oporności osmotycznej w grupie kontrolnej K2
 Figure 14. Changes in osmotic resistance in the control group K2



Rycina 15. Zmiany oporności osmotycznej w grupie badanej B2

Figure 15. Changes in osmotic resistance in the control group B2

Porównanie wyników otrzymanych w niniejszej pracy z wynikami innych autorów nie jest łatwe, ponieważ stosowane w różnych ośrodkach procedury glicerolizacji i deglicerolizacji znacznie się różnią. W pracy wykorzystywano wprawdzie te same roztwory płuczące i wzbogacające, ale poza tym stosowane metody zmodyfikowano i dostosowano do specyficznych warunków pracy Wojskowego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. W większości prac innych autorów nie stosowano porównań z grupą kontrolną, a jedynie porównywano parametry jakości KKCz przed zamrożeniem i po rozmrożeniu. W niektórych pracach porównywano podstawowe parametry jakości do 6–15 dnia przechowywania rozmrożonych KKCz [7–9].

Wprowadzenie nowej metody do rutynowego stosowania wiąże się z koniecznością wykonania badań walidacyjnych oceniających przede wszystkim parametry kontroli jakości danego składnika krwi. Niezwykle istotne jest udowodnienie, że uzyskiwany taką metodą składnik krwi ma odpowiednią wartość terapeutyczną, a standardowe parametry kontroli jakości nie zawsze pozwalają odpowiedzieć na to pytanie. Z tego powodu w badaniach walidacyjnych powinno się uwzględniać ocenę metaboliczną i funkcjonalną komórek zawartych w danym składniku. W przypadku krwinek czerwonych takimi parametrami mogą być między innymi: stężenie sodu i potasu, adenozyntrifosforan (ATP), 2,3-difosfoglicerynian (2,3-DPG), glukoza, LDH, oporność osmotyczna [10].

Utrzymanie struktury krwinki czerwonej w stanie nienaruszonym zależy od prawidłowego wewnątrzkomórkowego przebiegu procesów przemiany

materii. W trakcie przechowywania krwinek czerwonych oraz po ich rozmrożeniu dochodzi do wyczerpania układów enzymatycznych oraz do naturalnych ubytków różnych związków chemicznych biorących udział w tej przemianie. Z upływem czasu stwierdza się zachwianie równowagi między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym wskutek nagromadzenia produktów ubocznych uwolnionych w toku przemian, co wywołuje zaburzenie prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych, a w efekcie końcowym prowadzi do uszkodzenia struktury komórki. Proces zamrażania i rozmrażania niewątpliwie przyczynia się do nasilenia zachodzących zmian, co powoduje, że krwinki czerwone są szybciej usuwane z układu krążenia biorcy [11].

Do oceny *in vitro* ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek czerwonych wybrano najczęściej stosowane obecnie metody do oznaczania parametrów określających właściwości funkcjonalne krwinek czerwonych, takich jak: stężenie Hb, Ht, stopień hemolizy, pH, stężenie K^+ , stężenie glukozy, aktywność LDH. Badania przeprowadzane podczas 7-dniowego okresu przechowywania dostarczyły dodatkowych informacji o bardziej odległych skutkach zamrażania i rozmrażania niż dla rutynowo otrzymywanych rozmrożonych KKCz.

Hemoglobina stanowi 95% wszystkich wewnątrzkomórkowych białek krwinek czerwonych, a jej zawartość w czasie przechowywania jest podstawowym parametrem jakości krwinek. Zgodnie z wymaganiami kontroli jakości, zawartość Hb w jednostce KKCz powinna wynosić minimum 36 g [1]. W drugiej serii badań B2 (filtry *in-line*) całkowita zawartość hemoglobiny podczas 7-dniowego

okresu przechowywania rozmrożonych UKKCz spełniała normy kontroli jakości, należy jednak zauważyć, że znaczny spadek całkowitej zawartości Hb był związany z równoległym zmniejszeniem objętości jednostek, wynikającym z pobierania próbek. Należy się spodziewać, że podczas rutynowej pracy wyniki kontroli jakości rozmrażanych UKKCz będą lepiej spełniać jej parametry. Średnia strata zawartości hemoglobiny po rozmrożeniu wynosiła w grupie badanej B1 16%, a w B2 14% i była znacznie niższa od górnej akceptowalnej wartości określonej przez producenta w specyfikacji systemu ACP 215 (ok. 20%).

Wartości Ht w przypadku filtrów *in-line* (B2) były znacznie wyższe i spełniały warunki kontroli jakości w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla grupy badanej B1 (stosowania filtrów do KKCz), które nie spełniały wymogów kontroli jakości. Dlatego metodę tę poddano walidacji w celu wprowadzenia jej do rutynowego stosowania w Wojskowym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. W naszych badaniach, podobnie jak w pracach innych autorów, wartość Ht utrzymywała się w dolnej granicy zakresu normy (50–70%) dla rozmrożonych KKCz z roztworem wzbogacającym [2, 3, 9].

Wartość pH w badanej przez autorów tej pracy grupie B2 obniżyła się nieznacznie (z 6,63 do 6,53) w przeciwieństwie do wyników przedstawionych w pracy Bohonka, gdzie po 7 dniach przechowywania obserwowano lekką alkalizację środowiska (6,69–6,87). Bohonek stwierdził także znacznie niższą, niespełniającą norm kontroli jakości obowiązujących w Polsce, wartość Ht (40%) w stosunku do wartości przedstawionych w tej pracy. Przyczyną mogło być stosowanie innej metody zamrażania KKCz (metoda Van der Velde). Firma, która opracowała system do automatycznej glicerolizacji i deglicerolizacji KKCz, rekomenduje obecnie procedurę rozwiniętą i udoskonaloną przez Valeri'ego [4, 6, 12, 13].

Błona krwinki czerwonej utrzymuje równowagę osmotyczną i jonową komórki. Transport jonów i składników organicznych odbywa się przez błonę na zasadzie czynnego lub biernego transportu. Potas jest gromadzony w krwinkach czerwonych w wyniku aktywnego transportu, a jego stężenie w komórce jest około 27 razy większe niż w środowisku zewnętrznym. Na skutek strat energii w czasie przechowywania i uszkodzeń wywołanych zamrażaniem i rozmrażaniem dochodzi do osłabienia czynnego transportu i przechodzenia potasu na zewnątrz komórki w procesie dyfuzji, przy czym szybkość tego procesu zależy od składu płynu konserwującego lub roztworu wzbogacającego. Stężenie

potasu w preparatach, zamrażanych po 3 dniach przechowywania, było niższe niż w doniesieniach autorów stosujących zamrażanie KKCz po 6 lub 14 dniach. Stężenie potasu w grupie badanej B2 było z namiennie niższe niż w grupie kontrolnej, co pozwala sądzić, że sam proces zamrażania i rozmrażania nie nasila niekorzystnych zmian zachodzących w komórkach. Dlatego wskazane jest zamrażanie KKCz w możliwie jak najkrótszym czasie po pobraniu. Po 7 dniach przechowywania w grupie B2 stwierdzono 4-krotny wzrost stężenia potasu. Podobne wyniki uzyskali Bohonek i wsp., natomiast w pracy Valeri'ego stwierdzono nawet dziesięciokrotny wzrost stężenia potasu po 7 dniach przechowywania UKKCz [12, 13].

Metabolizm krwinki czerwonej bardzo silnie wiąże się ze stężeniem glukozy niezbędnej do wytworzenia podstawowego źródła energii dla krwinek, jakim jest ATP, konieczny dla utrzymania prawidłowego kształtu krwinek i ich podstawowych właściwości biochemicznych. Do prawidłowego przebiegu procesu glikolizy, w którym uzyskuje się ATP, niezbędne jest LDH. Stężenie glukozy i aktywność LDH w grupie B2 utrzymywały się na tym samym poziomie podczas całego okresu przechowywania rozmrożonych KKCz, co pozwala stwierdzić, że krwinki czerwone miały odpowiednie warunki metaboliczne do syntezy ATP. W badaniach Bandarenko i wsp. prowadzonych w warunkach podobnych do przedstawionych w tej pracy, stwierdzono niewielki spadek stężenia glukozy dopiero po 15 dniach przechowywania [5, 6]. Badania *in vivo* przeprowadzone przez Grose i Bandarenko potwierdzają skuteczność terapeutyczną rozmrożonych KKCz. Odzyskanie krwinek czerwonych w krążeniu biorcy wynosiło od 80 do 90% [7, 8].

Badanie oporności osmotycznej wnosi dodatkowe informacje o wartości terapeutycznej krwinek czerwonych, które umieszczone w roztworach hipotonicznych o wzrastającym stężeniu, po wchłonięciu nadmiernej ilości wody pękają, uwalniając hemoglobinę (hemoliza). Przy ocenie otrzymanych wyników oporności osmotycznej zwrócono uwagę na to, że już krwinki z grupy kontrolnej (K2) wykazywały zmniejszoną oporność osmotyczną w stosunku do normy dla świeżo pobranych krwinek czerwonych (0,45–0,3%). Zjawisko to może być związane z procesami preparatyki przygotowującymi jednostki do badania, takimi jak: wirowanie, filtrowanie, łączenie i podział jednostek o bardzo wysokim hematokrycie (>80%). Oceniając wpływ procesu zamrażania na oporność osmotyczną, wyniki uzyskane dla grupy badanej B2, porównano z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej K2 i wyka-

zono znacznie niższą oporność krwinek w grupie B2. Świadczy to o znaczącym wpływie procesu zamrażania i rozmrażania na oporność osmotyczną.

Na podstawie przeprowadzonych badań i po przeanalizowaniu wyników badań przedstawionych w piśmiennictwie, można wyciągnąć następujące wnioski:

- sposób przygotowania KKCz do procesu glicerolizacji w znaczący sposób decyduje o jakości rozmrożonego składnika;
- deglicerolizowany ubogoleukocytarny KKCz przygotowany z krwi pełnej poddanej filtracji *in-line* spełnia wymogi kontroli jakości i może być stosowany w sytuacjach wyjątkowych, gdy nie jest dostępny UKKCz przechowywany w temperaturze 4°C. Taka metoda przygotowania KKCz do glicerolizacji zostanie wprowadzona do rutynowej pracy w Wojskowym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa.

Wartość biologiczną koncentratów krwinek czerwonych można oceniać metodami pośrednimi *in vitro*, które omówiono powyżej. Jednak należy zauważyć, że najbardziej miarodajną metodą oceny skuteczności przetoczeń KKCz jest ocena stanu klinicznego pacjenta, wykonanie oznaczeń stężenia Hb i liczby krwinek czerwonych po przetoczeniu oraz czas przeżycia i odzyskanie krwinek czerwonych w układzie krążenia biorcy. Przeprowadzenie badań *in vivo* pozwala na lepszą ocenę przydatności danej metody do rutynowego stosowania.

Autorzy pracy serdecznie dziękują za pomoc w prowadzeniu badań: Jolancie Sobczyńskiej, Barbarze Saliszewskiej, Agnieszce Karcz i Dorocie Gruba z Wojskowego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa oraz Elżbiecie Wiśniakowskiej z Instytutu Hematologii i Transfuzjologii.

Piśmiennictwo

1. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. (red.). M. Łętowska. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2006 (z późniejszymi zmianami).
2. Valeri C.R., Ragno G., Pivacek L.E. i wsp. A multicenter study of *in-vitro* and *in-vivo* values in human RBCs frozen with 40-percent glycerol and stored after deglycerolization for 15 days at 4°C in AS-3: assessment of RBC processing in the ACP 215. *Transfusion* 2001; 41: 933–939.
3. Valeri C.R., Ragno G., Pivacek L. i wsp. *In-vivo* survival of apheresis RBCs, frozen with 40-percent glycerol, deglycerolized in the ACP 215, and stored at 4°C in AS-3 for up to 21 days. *Transfusion* 2001; 41: 928–932.
4. Valeri C.R., Srey R., Tilahun D. i wsp. The *in vitro* quality of red blood cells frozen with 40 percent (wt/vol) glycerol at –80°C for 14 years, deglycerolized with the Haemonetics ACP 215, and stored at 4°C in additive solution-1 or additive solution-3 for up to 3 weeks. *Transfusion* 2004; 44: 990–995.
5. Bandarenko N., Hay S.N., Holmberg J. i wsp. Extended storage of AS-1 and AS-3 leukoreduced red blood cells for 15 days after deglycerolization and resuspension in AS-3 using an automated closed system. *Transfusion* 2004; 44: 1656–1662.
6. Valeri C.R., Ragno G., Houten P. i wsp. Automation of the glycerolization of red blood cells with the high-separation bowl in the Haemonetics ACP 215 instrument. *Transfusion* 2005; 45: 1621–1627.
7. Grose H.L., Byrne K.M., Salata J.M. i wsp. *In vitro* variables of red blood cell components collected by apheresis and frozen 6 and 14 days after collection. *Transfusion* 2006; 46: 1178–1183.
8. Bandarenko N., Cancelas J., Snyder E.L. i wsp. Successful *in vivo* recovery and extended storage of additive solution (AS)-5 red blood cells after deglycerolization and resuspension in AS-3 for 15 days with an automated closed system. *Transfusion* 2007; 47: 680–686.
9. Gramber C., Holmberg J., Popovsky M. i wsp. Up to 21-day banked red blood cells collected by apheresis and stored for 14 days after automated wash at different times of storage. *Vox Sanguinis* 2006; 90: 40–44.
10. Korsak J., Łętowska M. *Transfuzjologia kliniczna*. α-medica press, Bielsko-Biała 2009.
11. Kubis J., Lachert E., Antoniewicz-Papis J., Dzieciatkowska A., Łętowska M. Zmiany biochemiczne w napromieniowanych koncentratkach krwinek czerwonych przechowywanych do 42 dni. *Journal of Transfusion Medicine* 2008; 1: 46–54.
12. Bohonek M. Concept of blood freezing program in the Czech Republic. *Vox Sanguinis* 2006; 91 (supl. 3): 710.
13. Valeri C.R., Linda E., Pivacek L.E. i wsp. *In vitro* and *in vivo* measurements of human RBCs frozen with glycerol and subjected to various storage temperatures before deglycerolization and storage at 4°C for 3 days. *Transfusion* 2001; 41: 401–405.