

## Nowe spojrzenie na zastosowanie składników krwi

(w świetle doniesień prezentowanych na 21. Regionalnym Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi [ISBT] w Lizbonie 18–22 czerwca 2011 roku)

Elżbieta Lachert, Jolanta Antoniewicz-Papis, Ryszard Pogłód

Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Podczas sesji plakatowych oraz prezentacji ustnych przedstawiono wyniki prac dotyczących nowego zastosowania składników krwi. Dotyczyły one:

- doświadczeń różnych ośrodków stosujących żele płytkowe uzyskiwane we współpracy z centrami krwiodawstwa;
- porównań różnych formuł inaktywowanego liofilizowanego osocza: Octaplas LG, Uniplus;
- oceny kropli do oczu otrzymywanych z allogenicznego surowicy, które stosuje się w ciężkich chorobach oka;
- zastosowania systemu Sangvia<sup>TM</sup> (Astra Tech Company, Sweden) przeznaczonego do reinfuzji krwi podczas operacji.

### Żele płytkowe

Polipeptydowe czynniki wzrostu i różnicowania przyspieszają proces gojenia ran, regulują proliferację, chemotaksję oraz biorą udział w różnicowaniu i metabolizmie komórek. Stosowanie czynników wzrostu pochodzenia płytkowego ma na celu spotęgowanie fizjologicznej odpowiedzi, jaka zachodzi podczas gojenia się rany [1]. Właściwości tych czynników są wykorzystywane podczas stosowania żelu płytkowego, który składa się z dwóch komponentów: 1) osocza bogatopłytkowego lub koncentratu krwinek płytkowych oraz 2) roztworu trombiny. W momencie aplikacji żelu, krwinki płytkowe pod wpływem trombiny ulegają aktywacji, w wyniku której dochodzi do szybkiego uwalniania z ziarnistości gęstych i z ziarnistości  $\alpha$  wielu aktywnych terapeutycznie czynników wzrostu, takich jak: EGF (*epidermal growth factor*) — naskórkowy czynnik wzrostu, FGF (*fibroblast growth factor*) — czynnik

wzrostu fibroblastów, PDGF (*platelet-derived growth factor*) — płytkowopochodny czynnik wzrostu, TGF (*transforming growth factor*) — transformujący czynnik wzrostu ( $\beta 1, \beta 2$ ), IGF (*insulin growth factor*) — insulinopodobny czynnik wzrostu i VEGF (*vascular endothelial growth factor*) — naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu.

W pracy Tremitera i wsp. z ośrodka w Neapolu oceniano zastosowanie żelu płytkowego w leczeniu zwyrodnienia kości i stawów, a zwłaszcza w łagodzeniu objawów i odbudowaniu czynności stawów [2]. Badaniom poddano 24 pacjentów (8 kobiet i 16 mężczyzn, w wieku 34–73), cierpiących na chorobę zwyrodnieniową stawu biodrowego i kolanowego lub z powodu stawu rzekomego. Autologiczny koncentrat krwinek płytkowych, podstawowy składnik żelu płytkowego otrzymywano za pomocą komercyjnego Systemu Vivostat (Bristol-Meyers Squibb Company, Denmark). W okresie od września do grudnia 2010 roku chorym pobierano krew w odstępach 21 dniowych i otrzymywano osocze bogatopłytkowe stanowiące materiał wyjściowy do otrzymania żelu płytkowego. Uzyskany żel płytkowy aplikowano za pomocą odpowiednio zmodyfikowanego urządzenia do uzyskania „spray’u”. Przed rozpoczęciem leczenia u każdego z pacjentów wykonywano badanie radiograficzne i rezonans magnetyczny. Skuteczność terapii oceniano po 30 i 60 dniach na podstawie uzyskanej punktacji w skali VAS (*visual analogue scale*) — wzrokowo-analogowej skali odczuwania bólu, gdzie VAS = 0 oznacza najmniejszy wyobraźalny poziom bólu, a VAS = 100 największy do wyobrażenia poziom bólu, oraz w skali WOMAC (*The Western Ontario MacMaster. Osteoarthritis Index*) — punktacji oceniającej ból i ograniczenia funkcjonalne. Po 6 i 12 miesiącach powtórzono ocenę,

Adres do korespondencji: dr n. farm. Elżbieta Lachert, IHiT, ul. Indiry Ghandi 14, 02–776 Warszawa, tel.: (22) 349 63 82, e-mail: elachert@ihit.waw.pl

a uzyskane wyniki porównano ze stanem sprzed leczenia. W 6. miesiącu po zakończeniu leczenia u 5 pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawu biodrowego stwierdzono znaczne zmniejszenie bólu i poprawę ruchomości w leczonym stawie biodrowym, poprawę w punktacji w skali WOMAC o 30% (średnia na początku badania — 72,6%, a po 6 miesiącach — 94,4%, poprawa w punktacji o 21,8%). Stwierdzono, że stosowanie żelu jest procedurą łatwą do przeprowadzenia, o znikomej inwazyjności i niepowodującą działań niepożądanych. Poprawę stwierdzono u wszystkich pacjentów.

Od kilku lat metody preparatyki i zastosowanie kliniczne żelu płytkowego stanowią przedmiot zainteresowania Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) w Warszawie [3]. Celem badania Misiaka i wsp. z Kliniki Chirurgii Ogólnej i Hematologicznej oraz Zakładu Transfuzjologii IHIT było zastosowanie autologicznego, mrożonego żelu bogatopłytkowego w leczeniu owrzodzeń troficznych kończyn dolnych. Mimo znacznego postępu, jaki dokonał się w medycynie, leczenie przewlekłych owrzodzeń troficznych kończyn dolnych stanowi niezwykle ważny problem kliniczny i społeczny. Nadal za przyczynę tej patologii uważa się niewydolność żylną i tętniczą kończyn dolnych. Poza próbami uzyskania poprawy ukrwienia kończyn metodami chirurgicznymi, jedną z metod leczniczych jest zastosowanie autologicznego żelu płytkowego. W cytowanym wyżej badaniu żel płytkowy stosowano u 25 pacjentów (10 kobiet, 15 mężczyzn) z trudno gojącymi się owrzodzeniami trwającymi od 4 miesięcy do 30 lat. U 20 pacjentów owrzodzenia umiejscowione były na podudziu, a u pozostałych na stopie, w obrębie pachwin i kości krzyżowej. U 10 chorych rozpoznano miażdżycę zarostową tętnic (w tym u 4 dodatkowo współistniejącą cukrzycę), u 10 rozpoznano przewlekłą niewydolność żylną, u 2 mieszaną niewydolność tętniczo-żylną, a u 3 — choroby rozrostowe układu krwiotwórczego i chłonnego (szpiczaka plazmocytozowego, chłoniaka nieziarniczego i przewlekłą białaczkę limfocytową). Koncentraty krwinek płytkowych pobierano metodą automatyczną, uzyskując objętość osocza bogatopłytkowego, którą następnie dzielono do pojemników na jednorazowe porcje (7–15 ml) i zamrażano. Trzy razy w tygodniu na owrzodzenia nakładano żel uzyskany po zmieszaniu rozmrożonego osocza bogatopłytkowego z trombiną. U żadnego z chorych nie obserwowano pogorszenia stanu miejscowego ani ogólnego związanego ze stosowaniem preparatu żelu płytkowego, natomiast u wszystkich chorych obserwowano zmniejszenie bólu, stopniowe wypełnianie się owrzodzenia ziarniną i zmniejszanie jego

powierzchni. W 12 przypadkach owrzodzenia uległy całkowitemu zagojeniu. U 10 chorych stwierdzono zmniejszenie powierzchni i głębokości owrzodzenia. U 2 chorych leczenie owrzodzenia zakończyło się amputacją części kończyny dolnej (należy zaznaczyć, że chorych tych już wcześniej zakwalifikowano do amputacji, a leczenie żelem stanowiło postępowanie „ostatniej szansy”). Autorzy stwierdzili, że wyniki leczenia w tej małej grupie chorych są zachęcające, a badania nad skutecznością leczenia owrzodzeń troficznych żelem płytkowym należy kontynuować, zwiększając jednak grupę chorych i uwzględniając podział na owrzodzenia tętnicze, żylnie, jatrogenne (po cytostatykach) oraz powstałe w przebiegu chorób układu krwiotwórczego.

W IHIT równoległe z oceną kliniczną prowadzono badania laboratoryjne oceniające jakość autologicznych koncentratów krwinek płytkowych. Wyniki badań autologicznych koncentratów krwinek płytkowych stosowanych u pacjentów Kliniki Chirurgii Ogólnej i Hematologicznej, zarówno przed zamrożeniem, jak i po rozmrożeniu, przedstawiono w pracy Lachert i wsp. [1]. W badaniu tym porównywano stężenie czynników wzrostu w koncentratkach krwinek płytkowych (KKP) uzyskanych od pacjentów metodą aferezy (przed zamrożeniem i po rozmrożeniu KKP) z ich stężeniem w osoczu bogatopłytkowym uzyskanym z krwi tych pacjentów. W analizowanych próbkach oznaczano następujące czynniki wzrostu: PDGF, pierwszy czynnik wzrostu pojawiający się w ranie, pobudzający rewaskularyzację, syntezę kolagenu i regenerację kości, TGF- $\beta$ 1, który uczestniczy w procesach gojenia tkanki łącznej i regeneracji kości, oraz FGF nasilający proliferację i różnicowanie wielu komórek. Stwierdzono, że stężenie czynników wzrostu w KKP było większe w porównaniu z kontrolą, którą stanowiło osocze bogatopłytkowe. I tak w KKP przed zamrożeniem stężenie TGF- $\beta$ 1 było siedmiokrotnie większe, PDGF-AB — czterokrotnie, a FGF — trzynastokrotnie większe, natomiast w KKP po rozmrożeniu stężenie TGF- $\beta$ 1 było dziewięciokrotnie większe, PDGF-AB — pięciokrotnie i FGF — trzydziestosiedmiokrotnie większe.

Kolejną pracą dotyczącą żelu płytkowego było doniesienie Paesano i wsp. z ośrodka włoskiego [4]. Celem tej pracy było ustalenie korelacji pomiędzy wiekiem, płcią i liczbą krwinek płytkowych dawców a stężeniem czynników wzrostu, które oznaczano w krwi pełnej i w koncentracie krwinek płytkowych, przed i po aktywacji krwinek płytkowych za pomocą trombiny i glukonianu wapnia. Autorzy wykazali wysokie stężenie PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1 i IGF, natomiast stężenie pozostałych czynników wzrostu (PDGF-BB,

TGF- $\beta$ 2) było śladowe. W wyniku przeprowadzonej analizy wykluczyli oni wpływ wieku oraz płci dawcy na stężenie czynników wzrostu. Chociaż Paesano i wsp. stwierdzili korelację pomiędzy zawartością czynników wzrostu a liczbą płytek w KKP, podkreślają jednak, że pracę tę należy kontynuować w celu wystandaryzowania stosowanych preparatów.

### Inaktywacja czynników chorobotwórczych w osoczu (Octaplas LG, Uniplus)

W pracy zespołu Hegera i wsp. z firmy Octapharma przedstawiono trzy formuły osocza inaktywowanego przy użyciu metody rozpuszczalnik/detergent (S/D): Octaplas LG, Uniplus oraz osocze liofilizowane [5]. Formuły Octaplas LG i Uniplus stanowią alternatywę dla osocza świeżo mrożonego i pozwalają na zwiększenie bezpieczeństwa jego stosowania. Podstawowym celem opracowania metody pozwalającej na uzyskanie liofilizowanego osocza, które można przechowywać w temp. 2–8°C lub w temperaturze pokojowej, było zwiększenie dostępności osocza w sytuacji kryzysowej. Przeprowadzono szeroką charakterystykę produktu Octaplas LG (n = 18), Uniplus (n = 3) oraz osocza liofilizowanego (n = 3). Zbadano aktywność czynników krzepnięcia, markery aktywacji, TGA (*thrombin generation assay*), poziom ADAMTS 13 i vWF (*von Willebrand factor*).

Proces wytwarzania liofilizowanego osocza oparto na technologii produkcji Octaplas LG/Uniplus, bez dodatkowych substancji stabilizujących. Produkt można rekonstruować w ciągu kilku minut przy użyciu wody do wstrzykiwań. Ponadto, wyniki prowadzonych w szerokim zakresie badań biochemicznych potwierdziły, że jakość Octaplas LG/Uniplus nie uległa pogorszeniu w wyniku przeprowadzenia dodatkowego etapu liofilizacji. Aktywność czynników krzepnięcia we wszystkich badanych produktach osocza wynosiła 0,6 j.m./ml lub więcej. Ponadto nie wykazano istotnych różnic w zawartości TGA i vWF. W badaniach wykazano, że Octaplas LG, Uniplus oraz ich postać liofilizowana są produktami o porównywalnej jakości. W porównaniu z produktami konwencjonalnymi Uniplus może być wszechstronnie stosowany, a co najważniejsze, zwłaszcza w sytuacjach nagłych i kryzysowych. Do najbardziej istotnych zalet produktów liofilizowanych należy szybki czas rekonstrukcji oraz możliwość ich przechowywania w temperaturze lodówki lub pokojowej. Octaplas LG, Uniplus i liofilizowane osocze to trzy postaci tego samego osocza przystosowane do użytku w zależności od potrzeb użytkowników.

### Allogeniczna surowica — krople do oczu

Do najważniejszych funkcji łez należy działanie przeciwbakteryjne i nawilżanie oka. Ostatnio coraz częściej spotykanym schorzeniem gałki ocznej jest zespół suchego oka, spowodowany niewystarczającym nawilżeniem rogówki i spojówki. Jedną z metod leczenia tego schorzenia, stosowaną od wielu lat, są krople sporządzone z autologicznej surowicy. Jest to preparat mający istotne znaczenie dla pacjentów, którzy nie tolerują gotowych produktów leczniczych zawierających w swoim składzie także substancje konserwujące. Restrykcyjna kwalifikacja autologicznych dawców do oddania krwi powoduje, że w niektórych przypadkach nie można jej pobrać w celu przygotowania autologicznej surowicy. Przeciwwskazaniem do pobrania krwi w celu zastosowania autologicznego są zakażenia, niedokrwistość, zaburzenia czynności ośrodkowego układu nerwowego i choroby układu sercowo-naczyniowego.

W takich przypadkach rozwiązaniem może być stosowanie krwi allogenicznej co zostało przedstawione w pracy Harritshoja i wsp. z Danii [6]. Krople allogeniczne (zgodne w układzie AB0) stosowano u 22 pacjentów z ostrymi uszkodzeniami powierzchni oka, u których wystąpiła oporność na konwencjonalne metody leczenia. Dawców surowicy (mężczyźni, ochotnicy) kwalifikowano zgodnie z zasadami duńskiej służby krwi (badania w kierunku obecności HIV, HBV, HCV), a otrzymaną surowicę rozcieńczano, uzyskując stężenie 20%, porcjowano i przechowywano w temperaturze –25°C. Zamrożone preparaty, zgodne w antygenach układu AB0 z biorcą dostarczano na zlecenie w ciągu 30 minut. Pacjentów z ostrym zespołem suchego oka leczono przez 2–4 tygodnie (podając krople 6 × dziennie). Badania przeprowadzono w dniu 0 oraz po 2 i 4 tygodniach leczenia. U żadnego z pacjentów nie stwierdzono działań niepożądanych związanych z leczeniem, u 14 pacjentów (63%) uzyskano subiektywną poprawę objawów, u 12 pacjentów (55%) doszło do poprawy zmian w warstwie zewnętrznej oka, potwierdzonej w badaniu przy użyciu lampy szczelinowej. U 10 z 11 pacjentów z suchym zapaleniem rogówki i spojówek ustąpiły objawy choroby. Częściowe lub całkowite ustąpienie zmian w rogówce stwierdzono w 9 na 11 przypadków. U chorych z zespołem nawracających nadżerek rogówki nie uzyskano poprawy po leczeniu surowicą allogeniczną. Na podstawie oceny klinicznej stwierdzono, że skuteczność leczenia zespołu suchego oka przy użyciu allogenicznej surowicy jest porównywalna ze skutecznością stosowania surowicy autologicznej.

## Reinfuzja krwi pobranej śródoperacyjnie i poddanej filtracji — zabieg wymiany stawu biodrowego

Przetaczanie krwi allogenicznej lub jej składników wiąże się z ryzykiem przeniesienia czynników chorobotwórczych lub wystąpieniem innych reakcji niepożądanych (np. w wyniku nieodpowiedniego doboru krwi). Dlatego, o ile to możliwe (jak np. w przypadku planowych operacji), lekarze powinni zabezpieczać pacjenta w krew autologiczną. Alternatywą dla transfuzji autologicznych jest obecnie śródoperacyjne i pooperacyjne odzyskanie krwi za pomocą systemu Sangvia TM.

Celem wieloośrodkowej pracy Thomassena i wsp. była ocena skuteczności systemu lub potwierdzenie wcześniej opublikowanych danych dotyczących bezpieczeństwa pobranej śródoperacyjnie krwi [7].

Przeprowadzono metodą podwójnie ślepej próby, randomizowane, prospektywne, wieloośrodkowe badanie, do którego zakwalifikowano chorych, u których wykonano operację pierwotnej lub wtórnej całkowitej wymiany stawu biodrowego. W badaniu uczestniczyło 216 chorych, z których część otrzymała autologiczną krew pobraną śródoperacyjnie przy użyciu systemu SangviaTM, natomiast u pozostałych nie stosowano krwi autologicznej. Niektórzy z nich otrzymywali dodatkowo transfuzje krwi allogenicznej, jeśli stężenie Hb wynosiło poniżej 8,5 g/dl. Chorych obserwowano w trakcie

pobytu w szpitalu i przez 2 miesiące po wypisaniu.

Porównano dane dotyczące wykorzystania krwi allogenicznej, wyniki badania morfologii krwi, dane dotyczące utraty krwi i wskaźnika zakażeń pooperacyjnych oraz dane dotyczące bezpieczeństwa leczenia (wartości niektórych badań biochemicznych krwi) i czasu trwania hospitalizacji. Z analizy tych danych wynika, że badana populacja była jednorodna pod względem demograficznym i pod względem zmiennych wyjściowych (tab. 1). Całkowita utrata krwi w badanej grupie wynosiła  $917 \pm 437$  ml, a objętość przetoczzonej pełnej krwi autologicznej pobranej śródoperacyjnie przy użyciu systemu SangviaTM oszacowano na  $522 \pm 339$  ml. W grupie pacjentów otrzymujących transfuzje autologiczne w porównaniu z pacjentami, którzy nie otrzymywali krwi autologicznej, stwierdzono mniejszą częstość przetoczeń allogenicznych (9 v. 13%), mniejszą liczbę decyzji o przetoczeniu (15 v. 26%), mniejszą objętość przetoczzonej krwi (756 v. 856 ml/2,3 v. 2,5 jednostki) oraz mniejszy wskaźnik transfuzji (2,3 v. 2,6). Jednak żadna z tych różnic nie była statystycznie znamienne. W grupie chorych otrzymujących krew autologiczną zaobserwowano także tendencję do większego pooperacyjnego stężenia Hb i EVF (*erythrocyte volume fraction*)/Hct. Pomiędzy obiema porównywanymi grupami nie stwierdzono różnic w wartościach wskaźnika zakażeń pooperacyjnych ani w zakresie wartości parametrów bezpieczeństwa leczenia (stężenie potasu,

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna i kliniczna chorych

Table 1. Demographic and baseline data

		Stosowano system Sangvia	Nie stosowano systemu Sangvia	Ogółem
		n = 106	n = 110	n = 216
Wiek (lata)	Średnio (SD)	67 (11)	65 (12)	66 (11)
	Mediana (min.–maks.)	69 (34–85)	67 (30–88)	67 (30–88)
BMI	Średnio (SD)	27,3 (4,6)	27,5 (4,6)	27,4 (4,6)
	Mediana (min.–maks.)	26,0 (17,8–41,1)	26,9 (18,8–43,7)	26,6 (17,8–43,7)
Płeć	Mężczyźni	30 (28%)	40 (36%)	70 (32%)
	Kobiety	76 (72%)	70 (64%)	146 (68%)
Klasyfikacja ASA*	I	28 (26%)	31 (28%)	59 (27%)
	II	59 (56%)	66 (60%)	125 (58%)
	III	19 (18%)	13 (12%)	32 (15%)
THR	Pierwotna	100 (94%)	104 (95%)	204 (94%)
	Wtórna	6 (6%)	6 (5%)	12 (6%)

SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała; THR (total hip replacement) — alloplastyka stawu biodrowego

\*Skala ASA — opracowana przez *American Society of Anaesthesiology* stosowana powszechnie klasyfikacja do oceny ryzyka operacyjnego związanego z wystąpieniem poważnych powikłań lub zgonu pacjenta

sodu oraz kreatyniny i wielkość przesączania kłębkowego/klirens kreatyniny). Nie wykazano również statystycznie znamiennych różnic w częstości występowania zdarzeń i reakcji niepożądanych.

Na podstawie analizy wyników tego badania autorzy stwierdzili, że można bezpiecznie stosować system Sangvia™, jednak badana grupa była zbyt mała, aby można było wyciągnąć bardziej ogólne wnioski dotyczące skuteczności stosowania tego systemu.

### Podsumowanie

Rozwój współczesnej transfuzjologii wymaga przygotowywania coraz bezpieczniejszych i coraz bardziej skutecznych tradycyjnie stosowanych składników krwi. Jednocześnie wdrażane są nowatorskie metody pobierania krwi i jej składników oraz opracowywane coraz doskonalsze techniki preparatyki umożliwiające łatwy i natychmiastowy dostęp do preparatów leczniczych. Celem omawianych powyżej prac przedstawianych podczas 21. Regionalnego Kongresu ISBT było przede wszystkim zasygnalizowanie nowych metod i nowych preparatów, które pozwolą na szersze niż dotychczas zastosowanie składników krwi w krwiolecznictwie.

### Piśmiennictwo

1. Lachert E., Misiak A., Antoniewicz-Papis J. i wsp. Evaluation of the concentration of platelet growth factors in Platelet Concentrate (PC), the basic component of Platelet-Gel. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 47, 4A-S14-02.
2. Tremitera E., Mottola M., Mininni M. i wsp. The platelet gel, the bearer of growth factors in the treatment of degenerative bone and joint diseases. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 192, P-280.
3. Misiak A., Lachert E., Szczepanik A.B. i wsp. Frozen autologous platelet-rich gel used for treatment of trophic ulceration. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 192, P-281.
4. Paesano L., D'Onofrio M., Leonardi G.M., Nocera G., Misso S., Nocera C. Activation of platelet gel from fresh PRP (Platelet Rich Plasma) and release of growth factors. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 193, P-283.
5. Heger A., Gruber G., Neisse-Svae A., Svae T.E., Romisch J. Octaplas LG, Uniplas and Lyophilised plasma — three different pharmaceutical formulations of the same virus inactivated coagulation active plasma. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 192: P-279.
6. Harritshoj L.H., Hansen M.B., Julian H.O. Ready-made allogenic serum eye drops for severe dry eye disease. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 193, P-282.
7. Thomassen B.J.W., Pilot P., Grohs J. i wsp. A prospective, randomized controlled trial of retransfusion of intra-operatively collected filtered whole blood in total hip surgery with the Sangvia blood reinfusion system. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 191, P-278.