VIA MEDICA

PRACA ORYGINALNA

Journal of Transfusion Medicine
2010, tom 3, nr 2, 49–54
Copyright © 2010 Via Medica
ISSN 1689–6017

Otrzymywanie metodą automatyczną zlewanych koncentratów krwinek płytkowych

Pooled platelet concentrates obtained with automatic method

Jolanta Antoniewicz-Papis[1], Elżbieta Lachert[2], Aleksandra Rosiek[2], Jolanta Kubis[2], Karolina Janik[1], Dariusz Piotrowski[3], Magdalena Łętowska[1]

[1]Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii
[2]Zakład Zapewnienia Jakości i Organizacji Służby Krwi Instytutu Hematologii i Transfuzjologii
[3]Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie

Streszczenie

Wstęp: *Koncentraty krwinek płytkowych (KKP) można otrzymać metodami konwencjonalnymi poprzez preparatykę pobranej krwi pełnej lub metodami aferezy. Proces zlewania kożuszków leukocytarno-płytkowych metodą manualną jest czasochłonny, wymaga różnego rodzaju specjalistycznego sprzętu oraz wysokich kwalifikacji personelu. Alternatywą jest automatyczne zlewanie kożuszków leukocytarno-płytkowych, umożliwiające uproszczenie preparatyki i eliminację błędów popełnianych przez operatora.*

Celem pracy była ocena parametrów jakościowych i ilościowych zlewanego KKP otrzymanego z kożuszków leukocytarno-płytkowych przy zastosowaniu automatycznego systemu OrbiSac (Caridian).

Materiał i metody: *Kożuszki leukocytarno-płytkowe poddawano preparatyce za pomocą systemu OrbiSac, uzyskując zlewany ubogoleukocytarny KKP. Jakość KKP badano bezpośrednio po otrzymaniu i podczas 5-dniowego okresu przechowywania, oceniając liczbę krwinek płytkowych, liczbę leukocytów, ekspresję antygenów CD42b i CD62, odpowiedź na szok hipotoniczny (HSR) i wartość pH.*

Wyniki: *Otrzymano łącznie 10 zlewanych ubogoleukocytarnych KKP o średniej objętości 315 ml i zawartości krwinek płytkowych zgodnej z wymaganiami. Odpowiedź na szok hipotoniczny (HSR) wykazywała wysoką wartość podczas całego okresu przechowywania. Ekspresja antygenu CD42b była wysoka, a w trakcie przechowywania nieznacznie malała. Ekspresja antygenu CD62 w trakcie przechowywania ulegała najpierw obniżeniu (w trzecim dniu), a następnie ponownemu wzrostowi (w piątym dniu). Wartości pH roztworów utrzymywały się na odpowiednim poziomie przez cały okres przechowywania.*

Wnioski: *System OrbiSac umożliwia uzyskiwanie z kożuszków leukocytarno-płytkowych zlewanych KKP o wysokiej jakości i parametrach zgodnych z założeniami. Niewątpliwą zaletą metody automatycznej jest możliwość jej standaryzacji oraz eliminacja błędów spowodowanych czynnikiem ludzkim.*

Słowa kluczowe: koncentrat krwinek płytkowych, aktywacja krwinek płytkowych, liczba krwinek płytkowych, usuwanie leukocytów

J. Transf. Med. 2010; 2: 49–54

Adres do korespondencji: dr n. farm. Jolanta Antoniewicz-Papis, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa, tel.: (22) 34 96 381, faks: (22) 34 96 376, e-mail: jpapis@ihit.waw.pl

Summary

Background: *Platelet Concentrates (PCs) may be obtained by conventional methods from whole blood or by apheresis. Buffy-coat pooling from whole blood by manual method is time consuming and requires a variety of special equipment and qualified staff. An alternative is automatic buffy coat pooling which simplifies the procedure and helps to eliminate human errors.*

The aim of our study was to evaluate the qualitative and quantitative parameters of pooled, leukoreduced PCs obtained from buffy coats with the OrbiSac (Caridian) automatic pooling system.

Material and methods: *Buffy coats were prepared in the OrbiSac system to obtain pooled leukoreduced PCs, the quality of which was immediately evaluated and then assessed during 5 days of storage. The following parameters were monitored: platelet count, leukocyte count, CD42b and CD62 antigen expression, hypotonic shock response and pH.*

Results: *We obtained ten leukoreduced PCs (mean volume 315 ml) with platelet count as required. During storage, the PC hypotonic shock response was high as was the CD42b antigen expression with a slight decreasing tendency; CD62 antigen expression first indicated decrease (storage day 3) then increase (storage day 5). Throughout the storage period the pH level was as required.*

Conclusions: *Leukoreduced PCs obtained from buffy coats with the OrbiSac (Caridian) system are high quality with parameters consistent with required values. Undisputable advantages of this automatic method is the elimination of human errors and method standardization.*

Key words: platelet concentrates, platelet activation, platelet count, leukocyte reducing procedure

J. Transf. Med. 2010; 2: 49–54

Wstęp

Krew i jej składniki są od wielu lat stosowane jako środki lecznicze, przy czym podstawową zasadą współczesnej transfuzjologii jest przetaczanie składników krwi dobranych zgodnie z indywidualnym zapotrzebowaniem chorego. Koncentraty krwinek płytkowych (KKP) stosuje się w celu zmniejszenia lub zapobiegania krwawieniom u chorych z małopłytkowością, wynikającą głównie z niedostatecznej produkcji krwinek płytkowych w szpiku, niekiedy także w przypadkach zaburzeń w funkcjonowaniu krwinek płytkowych. Wykorzystywane w tym celu krwinki płytkowe uzyskuje się przez preparatykę pobranej krwi pełnej (metody konwencjonalne) lub za pomocą separatora komórkowego (automatycznej aferezy) [1]. Metody aferezy zyskały na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci duże znaczenie, między innymi ze względu na możliwość pobrania od jednego dawcy kilku różnych składników krwi w czasie jednej donacji [2, 3]. Metody te są jednak kosztowne, nierzadko czasochłonne, ponadto wymagają specjalnego doboru dawców (m.in. ze względu na konieczność odpowiedniego dostępu do żył, najlepiej umożliwiającego podwójne wkłucie).

Ze względu na większą dostępność krwi pełnej pobranej od dawców metodami tradycyjnymi i niższy koszt jej preparatyki, można wykorzystać, w celu produkcji KKP, otrzymany manualnie z krwi pełnej kożuszek leukocytarno-płytkowy. W wyniku połączenia 4–8 jednostek kożuszka leukocytarno-płytkowego o objętości 50–60 ml można otrzymać leczniczą dawkę KKP. Proces zlewania, a następnie dalszą preparatykę standardowo wykonuje się metodą manualną. Procedura ta jest jednak czasochłonna, wymaga specjalistycznego wyposażenia oraz wysokich kwalifikacji personelu.

Alternatywą dla metod manualnych jest stosowanie automatycznych systemów służących do zlewania kożuszków leukocytarno-płytkowych (system OrbiSac — Caridian d. Gambro, ryc. 1) [4–8]. Zasada działania systemu OrbiSac polega na automatycznym łączeniu do 6 jednostek kożuszków leukocytarno-płytkowych oraz jednej jednostki osocza lub roztworu wzbogacającego, a następnie odwirowaniu preparatu w celu uzyskania KKP. W tym celu stosuje się fabryczny zestaw wyposażony w filtr antyleukocytarny i 2 pojemniki. Jeden z nich jest zakończony drenami umożliwiającymi sterylne przyłączenie pojemników z kożuszkami leukocytar-



©CaridianBCT, Inc. 2010; used with permission

Rycina 1. OrbiSac — automatyczne urządzenie do otrzymywania zlewanych koncentratów krwinek płytkowych

Figure 1. OrbiSac system designed for automated preparation of platelet concentrates

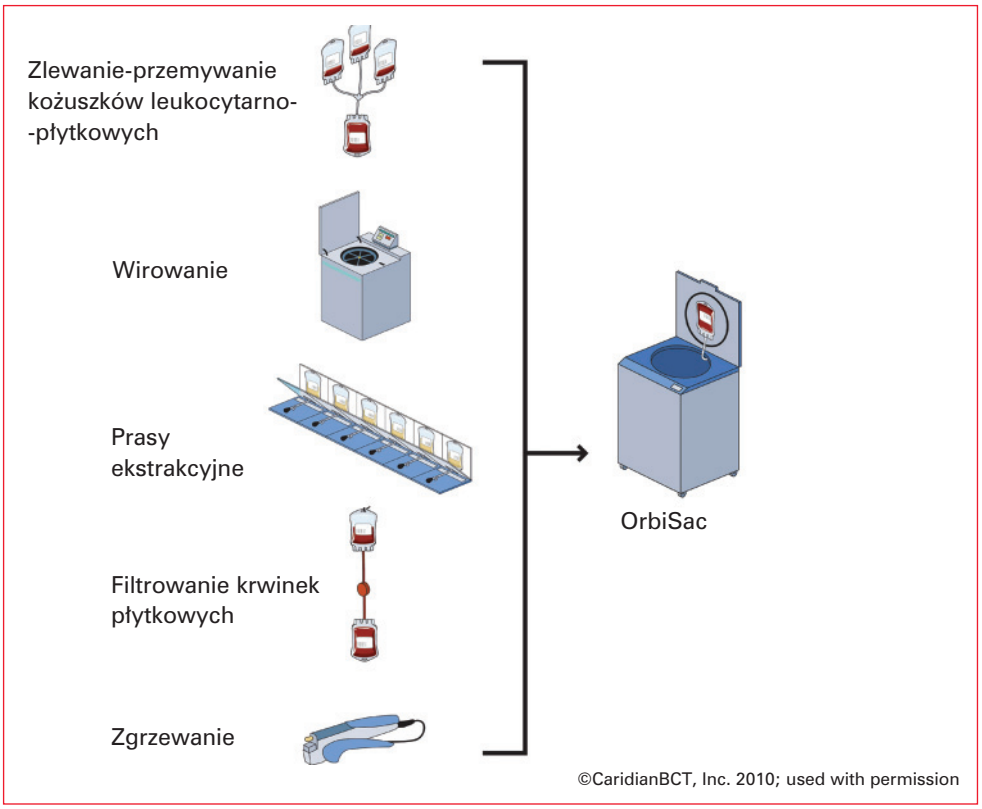
no-płytkowymi i osoczem. Drugi pojemnik służy do przechowywania KKP uzyskanego po uprzednim wirowaniu i filtrowaniu.

Zastosowanie systemu OrbiSac eliminuje 5 etapów preparatyki wykonywanych standardowo przez personel publicznej służby krwi, czyli:

— zlewanie i przemywanie kożuszków leukocytarno-płytkowych;
— wirowanie;
— rozdzielanie odwirowanego preparatu za pomocą prasy ekstrakcyjnej;
— redukcję zawartości leukocytów;
— zgrzewanie drenów.

Wszystkie te etapy wykonywane są automatycznie przez OrbiSac (ryc. 2).

Stosowanie metod automatycznych eliminuje problemy wynikające z błędów popełnionych w czasie preparatyki metodą manualną. Dodatkową zaletą jest eliminacja leukocytów i możliwość standardowego wytwarzania ubogoleukocytarnych KKP, a przez to między innymi zmniejszenia ryzyka alloimmunizacji biorcy antygenami HLA (*human leukocyte antigens*), przeniesienia zakażenia bakteryjnego, a także innych czynników zakaźnych (w tym wirusa cytomegalii) [9].



Rycina 2. Schemat przedstawiający oszczędność czasu dzięki zastosowaniu systemu OrbiSac

Figure 2. Saving time with OrbiSac system

Tabela 1. Zmiany zachodzące podczas przechowywania w koncentratach krwinek płytkowych (KKP) uzyskanych przy zastosowaniu systemu do automatycznego zlewania kożuszków leukocytarno-płytkowych OrbiSac

Table 1. Changes in Platelet count, CD42b and CD62 antigen expression, hypotonic shock response and pH during 5 day storage of PCs from buffy-coats obtained with OrbiSac automatic system

	Dzień 1.	Dzień 3.	Dzień 5.
Liczba krwinek płytkowych x $10^6/\mu l$	1,05 ± 0,11	1,02 ± 0,14	1,00 ± 0,10
pH	7,30 ± 0,07	7,45 ± 0,20	7,36 ± 0,12
HSR (%)	87,4 ± 3,8	83,2 ± 6,1	82,5 ± 4,7
Ekspresja CD42b (%)	93,6 ± 2,4	88,1 ± 4,6	85,8 ± 3,5
Ekspresja CD62 (%)	1,25 ± 0,51	0,68 ± 0,22	1,04 ± 0,32

HSR (*hypotonic shock response*) — odpowiedź na szok hipotoniczny

Celem niniejszej pracy była ocena parametrów jakościowych i ilościowych zlewanego KKP otrzymanego z kożuszków leukocytarno-płytkowych przy zastosowaniu automatycznego systemu OrbiSac.

Materiał i metody

Krew pełną pobieraną od dawców poddawano preparatyce w standardowych warunkach [10], otrzymując KKCz, osocze oraz kożuszek leukocytarno-płytkowy. Pojemniki zawierające po około 60 ml kożuszka leukocytarno-płytkowego pozostawiono w spoczynku w temperaturze pokojowej na około 18 godzin. Do dalszej preparatyki dobierano po 4 zgodne w grupie ABO kożuszki leukocytarno-płytkowe i jedną jednostkę uzyskanego w pierwszym etapie preparatyki zgodnego grupowo osocza ubogokomórkowego. Dalsza preparatyka odbywała się przy użyciu systemu OrbiSac, automatycznie łączącego wszystkie kożuszki i osocze, a następnie poddającego je wirowaniu i filtracji, w wyniku czego otrzymywano gotowy zlewany ubogoleukocytarny KKP.

W uzyskanych w wyżej opisany sposób koncentratach krwinek płytkowych oznaczano:

— liczbę krwinek płytkowych przy użyciu analizatora hematologicznego K-4500 (Sysmex);
— liczbę leukocytów manualnie w komorze Nageotte'a;
— ekspresję antygenów CD42b i CD62 za pomocą cytofluorymetru przepływowego Ortho Cytoron Absolute (Ortho) i przeciwciał monoklonalnych CD42BFITC i CD62PFITC (Beckman Coulter);
— odpowiedź na szok hipotoniczny (HSR, *hypotonic shock response*) za pomocą spektrofotometru Lambda 12 (Perkin Elmer; Stany Zjednoczone);
— pH za pomocą pehametru HI 9020 (Hanna Instruments).

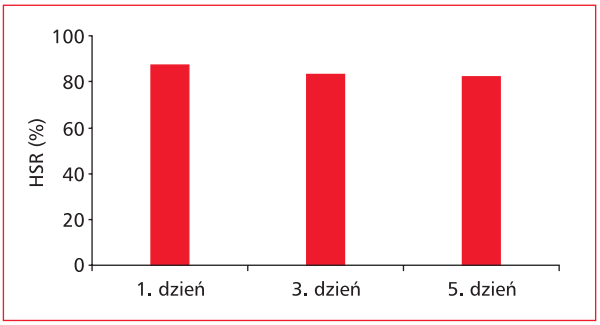
Wszystkie badania, z wyjątkiem liczby leukocytów, wykonywano w ciągu całego standardowego okresu przechowywania preparatów, określonego wytycznymi obowiązującymi w krwiodawstwie, to znaczy przez 5 dni [10].

Wyniki

W trakcie naszych badań poddano preparatyce krew pełną pobraną od 40 dawców, otrzymując 10 zlewanych KKP o średniej objętości 315 ml (290––332 ml), które następnie poddano wymienionym badaniom. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1 oraz na rycinach 3–6.

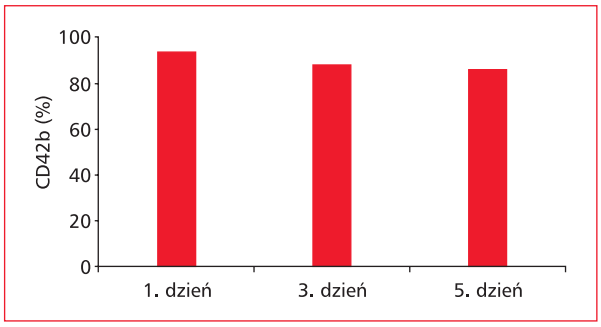
Liczba krwinek płytkowych

Wszystkie KKP zawierały liczbę krwinek płytkowych zgodną z wcześniej określonymi wymaganiami, czyli powyżej 3 x 10^{11} krwinek/preparat. Liczba krwinek płytkowych w przeliczeniu na 1 mikrolitr wynosiła, bezpośrednio po wykonaniu preparatyki,



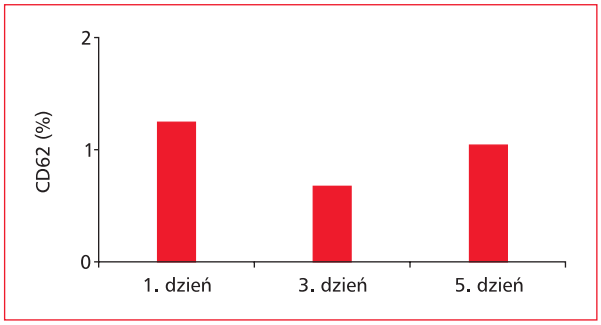
Rycina 3. Wpływ przechowywania KKP uzyskanych przy użyciu automatycznego systemu OrbiSac na odpowiedź na szok hipotoniczny (HSR)

Figure 3. Hypotonic shock response during 5 day storage of PCs obtained with OrbiSac automatic system



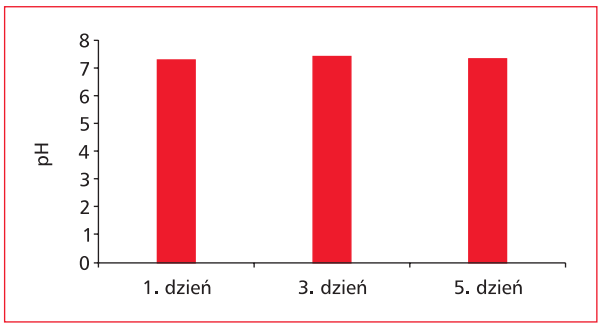
Rycina 4. Wpływ przechowywania KKP uzyskanych przy użyciu automatycznego systemu OrbiSac na ekspresję antygenu CD42b

Figure 4. CD42b antigen expression during 5 day storage of PCs obtained with OrbiSac automatic system



Rycina 5. Wpływ przechowywania KKP uzyskanych przy użyciu automatycznego systemu OrbiSac na ekspresję antygenu CD62

Figure 5. CD62 antigen expression during 5 day storage of PCs obtained with OrbiSac automatic system



Rycina 6. Wpływ przechowywania KKP uzyskanych przy użyciu automatycznego systemu OrbiSac na pH

Figure 6. Effect of 5 day storage on pH value of PCs obtained with OrbiSac automatic system

we wszystkich koncentratach średnio $1{,}05 \times 10^6$, co pozwalało na zachowanie jednakowych warunków przechowywania, zgodnych z zaleceniami dotyczącymi pojemników do przechowywania KKP [10]. Jest to zawartość odpowiednia dla zapewnienia równowagi gazowej uwarunkowanej zachodzącymi w krwinkach płytkowych przemianami metabolicznymi podczas całego okresu przechowywania.

Liczbę krwinek płytkowych w KKP w kolejnych dniach przechowywania przedstawiono w tabeli 1.

Liczba leukocytów

Wszystkie uzyskane KKP były ubogoleukocytarne, to znaczy zawierały poniżej 1×10^6 leukocytów/preparat.

Odpowiedź na szok hipotoniczny

Odpowiedź na szok hipotoniczny wykazywała wysoką wartość podczas całego okresu przechowywania KKP (ryc. 3).

Ekspresja antygenów CD42b i CD62

Uzyskane koncentraty krwinek płytkowych wykazywały wysoką ekspresję antygenu CD42b, co świadczy o prawidłowej strukturze błony komórkowej (ryc. 4). W trakcie przechowywania ekspresja ta nieznacznie malała, co wskazywało na niewielką aktywację. Również ekspresja antygenu CD62 w pierwszym dniu przechowywania wskazywała na niewielką aktywację krwinek płytkowych, w trakcie przechowywania ulegała jednak najpierw obniżeniu (w trzecim dniu), a następnie ponownemu wzrostowi (w piątym dniu) (ryc. 5). Może to wskazywać na odwracalną aktywację krwinek płytkowych, występującą w trakcie preparatyki w systemie OrbiSac.

Wartości pH

Wartości pH roztworów utrzymywały się na odpowiednim poziomie przez cały okres przechowywania, wykazując nieznaczny wzrost w jego trzecim dniu, a następnie spadek w piątym, przyjmując wartości wymagane w końcowym okresie przechowywania przez wytyczne obowiązujące w krwiodawstwie, to znaczy 6,4–7,4 (ryc. 6).

Zmiany zachodzące podczas przechowywania w koncentratach krwinek płytkowych (KKP) pobranych przy zastosowaniu systemu do automatycznego zlewania kożuszków leukocytarno-płytkowych OrbiSac przedstawiono sumarycznie w tabeli 1.

Dyskusja

Stały wzrost wymogów związanych z jakością, bezpieczeństwem oraz efektywnością preparatyki krwi i jej składników stosowanych w krwiolecznictwie sprzyja szerszemu wdrażaniu zautomatyzowanych metod. Techniki manualne, stosowane od lat w celu uzyskiwania KKP z kożuszków leukocytarno-płytkowych, wymagają dużego nakładu pracy i czasu, ponadto są trudne do standaryzacji i związane ze znaczącym ryzykiem popełnienia błędu przez operatora. Automatyzacja preparatyki otrzymywania KKP ze zlewanych kożuszków leukocytarno-płytkowych ma na celu otrzymywanie produktów o wysokiej jakości i zbliżonych wartościach takich parametrów ilościowych, jak liczba krwinek płytkowych i objętość koncentratu [4, 5]. Zdaniem wielu autorów uzyskane w ten sposób KKP charakteryzują się dobrą jakością nie tylko bezpośrednio po pobraniu, ale także podczas całego okresu przechowywania [4, 5, 11, 12]

Przedstawione w niniejszym opracowaniu wyniki pozwalają potwierdzić, że system OrbiSac umożliwia uzyskiwanie z kożuszków leukocytarno-płytkowych zlewanych KKP o wysokiej jakości. Wszystkie oceniane parametry świadczą o tym, że automatyczna technika preparatyki za pomocą systemu OrbiSac jest porównywalna pod względem jakości i efektywności ze standardową metodą manualną [4, 5, 12]. Niewątpliwą zaletą metody automatycznej jest natomiast możliwość jej standaryzacji, a także eliminacja ewentualnych błędów spowodowanych czynnikiem ludzkim, czyli wzrost bezpieczeństwa uzyskiwanych w ten sposób koncentratów krwinek płytkowych.

Piśmiennictwo

1. Łętowska M., Sabliński J., Sharf R., Seyfried H. (red. nauk. wyd. pol.): Leczenie krwią. Zasady postępowania klinicznego. Sekcja Transfuzjologiczna PTHiT, Warszawa, 2001.
2. Menichella G., Serafini R., Ciarli M. i wsp. A new blood donation strategy: automated blood collection (ABC). Int. J. Artif. Organs. 2001; 24: 173–177.
3. Rock G., Moltzan C., Alharbi A. i wsp. Automated collection of blood components: their storage and transfusion. Transfus. Med. 2003; 13: 219–225.
4. Janetzko K., Kluter H., van Waeg G. Fully automated processing of buffy-coat-derived pooled platelet concentrates. Transfusion 2004; 44: 1052–1058.
5. Larsson S., Sandgren P., Sjodin A. Automated preparation of platelet concentrates froom pooled buffy coats: *in vitro* studies and experiences with the OrbiSac system, Transfusion 2005: 45: 743–751.
6. Saekmose S., Homburg K., Albjerg L. Evaluating production of platelet concentrates using the OrbiSac centrifuge.Vox Sanguinis 2004; 87: S93–S145.
7. Santos M., Ferreira A.R., Sousa G. Automated processing of platelet concentrates using OrbiSac system. Vox Sanguinis 2006; 91 (supl. 3.): P724.
8. Curvers J., Heermans J. Responsiveness of pooled platelets produced by the OrbiSac BC System and stored in different media centrifuge. Vox Sanguinis 2004; 87: S93–S145.
9. Laupacis A., Brown J., Costello B. i wsp. Prevention of post-transfusion CMV in the era of universal WBC reduction: a consensus statement. Transfusion 2001; 41: 560–569.
10. Łętowska M. (red.). Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Warszawa 2009; (supl. 3).
11. Scott Murphy: Platelets from pooled buffy coats: an update, Transfusion 2005; 45: 634–639.
12. Vetlesen A., Mirlashari M.R., Ezligini F., Kjeldsen-Kragh J. Evaluation of platelet activation and cytokine release during storage of platelet concentrates processed from buffy coats either manually or by the automated OrbiSac system. Transfusion 2007; 47: 126–132.