

Nowe metody przechowywania płytek krwi i kontrola jakości w świetle doniesień prezentowanych na 23. Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi w Amsterdamie

**New procedures of platelet storage and quality control
presented during the 23rd Regional Congress of the
International Society of Blood Transfusion in Amsterdam**

Agata Płodzich, Elżbieta Lachert

Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Do przechowywania komórkowych składników krwi stosuje się różne roztwory wzbogacające, których zadaniem jest zarówno poprawa bezpieczeństwa przetaczanych składników krwi, jak i spowolnienie niekorzystnych zmian zachodzących w trakcie przechowywania. Aby osiągnąć ten cel, stosowany roztwór wzbogacający powinien zapewnić optymalne warunki przechowywania komórek krwi.

Podczas sesji plakatowych w ramach 23. Regionalnego Zjazdu Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*) przedstawiono wyniki prac dotyczących roztworów wzbogacających nowej generacji stosowanych do przechowywania koncentratów krwinek płytkowych (KKP).

Pacjentom, u których obserwowano poważne reakcje niepożądane po podaniu koncentratów krwinek płytkowych zawieszonych w osoczu, Bashir i wsp. zalecają stosowanie płytek krwi zawieszonych w ponad 90% roztworze wzbogacającym (PAS, *platelet additive solution*). Dotychczas stwierdzono skrócony czas przeżycia krwinek płytkowych po 24 godzinach ich przechowywania w zmniejszonej objętości osocza. Roztwory wzbogacające nowej generacji zawierają glukozę i dwuwęglan, co pozwala wydłużyć termin ważności preparatów pozbawionych osocza, ponieważ nie tylko dostarczają substratów metabolicznych dla płytek krwi, ale również, zwiększają pojemność buforową. Celem

pracy tej grupy naukowców było sprawdzenie (w warunkach *in vitro*) własności funkcjonalnych KKP otrzymanych zarówno z kożuszków leukocytrano-płytkowych, jak i metodą aferezy, zawieszonych w płynach wzbogacających nowej generacji, tj.: w PAS — 5 (Fenwal, Inc.) i w PAS — G (Hemonetics Corp.) oraz porównanie otrzymanych wyników z wynikami badań KKP zawieszonych w roztworze SSP+ i w 100% w osoczu. Do badań w trzecim dniu przechowywania przeznaczono KKP otrzymane z kożuszków leukocytrano-płytkowych (złano 5 kożuszków zgodnych w układzie ABO) oraz KKP uzyskane metodą aferezy. Każdy z KKP podzielono na 5 części z których 4 wirowano (2700 g przez 7 min). Po odwirowaniu usunięto z nich supernatant w postaci osocza i zastąpiono go 200 ml roztworu wzbogacającego według schematu: (i) SSP+, (ii) PAS — G, (iii) PAS — 5, (iv) uzupełniono osoczem, dodając taką samą objętość, jak roztworu wzbogacającego. Preparat piąty stanowił kontrolę, dlatego nie poddano go wirowaniu i nie usunięto osocza. Wszystkie preparaty pozostawiono na mieszkadle przez 2 godziny, a następnie rozpoczęto pobieranie próbek do badań (T = 0, 24, 36, 48, 72, 96 godzin po zawieszeniu w roztworach wzbogacających). Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że w preparatach krwinek płytkowych przechowywanych w PAS — G i w PAS — 5 wartości pH, HSR, czy stężenia ATP utrzymują się na wyższym poziomie w trakcie przechowywania

Adres do korespondencji: mgr Agata Płodzich, IHiT, ul. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 63 87, e-mail: a.plodzich@ihit.waw.pl

w porównaniu z krwinkami przechowywane w SSP+. Zawieszanie płytek krwi w PAS zawierającym glukozę i wodorowęglan może wydłużyć czas ich przechowywania [1].

Uyttenhove i wsp. przeprowadzili badania nowego płynu wzbogacającego o nazwie InterSol — G, firmy Fenwal. InterSol — G jest izotonicznym roztworem pozwalającym zastąpić 80% osocza stosowanego w trakcie przechowywania koncentratów krwinek płytkowych otrzymanych z kożuszków leukocytarno-płytkowych. Jest to pierwszy roztwór zawierający glukozę o właściwościach zbliżonych do właściwości osocza. Badania prowadzono w 5 ośrodkach (2 w Norwegii, 2 we Włoszech i 1 w Danii) z wykorzystaniem różnych metod otrzymywania koncentratów krwinek płytkowych. W każdym ośrodku otrzymano przynajmniej 100 jednostek KKP, z czego większość przetoczono pacjentom. W ośrodkach prowadzono szkolenia personelu, zbierano dane dotyczące kontroli jakości otrzymanych składników krwi, jak również gromadzono informacje o wszelkich zdarzeniach niepożądanych występujących u biorców. Otrzymano łącznie 550 jednostek koncentratów krwinek płytkowych. Wyniki prowadzonych prac wykazały, że koncentraty krwinek płytkowych przechowywane w nowym roztworze InterSol — G spełniały parametry kontroli jakości. W dwóch ośrodkach odnotowano zawartość płytek powyżej $2,0 \times 10^{11}/j.$ we wszystkich preparatach (zgodnie z wytycznymi UE), w jednym z ośrodków 99% KKP spełniało parametry kontroli jakości pod względem zawartości płytek krwi, natomiast w dwóch kolejnych — 97%. We wszystkich KKP wartości pH mieściły się w zakresie 6,60–7,45 (22°C). Nie zaobserwowano żadnych poważnych reakcji niepożądanych u biorców koncentratów krwinek płytkowych, zawierających badany roztwór. Tylko u dwóch pacjentów wystąpiły łagodne reakcje niepożądane; u jednego złe samopoczucie, u drugiego podrażnienie i zaczerwienienie skóry. Na podstawie uzyskanych wyników roztwór InterSol — G oceniono pozytywnie i dopuszczono do rutynowego stosowania w 4 z 5 ośrodków biorących udział w badaniach [2].

Badania płynu InterSol — G prowadziła także inna grupa naukowców. Isola i wsp. za cel pracy postawili sobie ocenę jakości koncentratów krwinek płytkowych w warunkach *in vitro*. Preparaty otrzymano poprzez zlanie 5 kożuszków leukocytarno-płytkowych, które przechowywano w mieszaninie roztworu InterSol — G (PAS IV, Fenwal) (80%) i osocza (20%). Badania prowadzono na 32 KKP w 1, 3, 5 i 7 dniu przechowywania. Oceniano następujące parametry: zawartość płytek krwi, pH,

zawartość leukocytów, jak również stężenie LDH, mleczanu, glukozy, zawartość rozpuszczalnej p-selektyny, ciśnienie parcjale O_2 i CO_2 . Wyniki porównano z wynikami badań KKP przechowywanych w mieszaninie składającej się z 35% roztworu InterSol (PAS III) i 65% osocza. Uzyskane dane liczbowe jednoznacznie sugerują że zastosowanie roztworu wzbogacającego InterSol — G (z dodatkiem glukozy) i zmniejszenie zawartości osocza w KKP korzystnie wpływa na parametry metaboliczne i aktywność płytek krwi. Do 7 dnia nie zaobserwowano niekorzystnych zmian będących skutkiem przechowywania preparatów [3].

Gwarancją odpowiedniej jakości koncentratów krwinek płytkowych jest stosowanie się do szeregu wymogów, a przede wszystkim restrykcyjnej kwalifikacji dawców krwi i jej składników oraz przestrzeganie procedur preparatyki i przechowywania koncentratów krwinek płytkowych. Dodatkowo prowadzona jest kontrola jakości krwi i jej składników, podczas której rutynowo, za pomocą analizatora hematologicznego, wykonuje się m.in. pomiar zawartości krwinek płytkowych. Stosowanie tej metody niesie za sobą pewne ograniczenia — nie ma możliwości określenia funkcjonalności płytek krwi znajdujących się w preparacie — nie można ocenić, czy płytki krwi występują w formie niezaktywowanej, czyli czy są zdolne do aktywacji w krążeniu biorcy. Nie można zatem przewidzieć, czy transfuzja będzie efektywna. Nowoczesna kontrola jakości zakłada wykorzystanie urządzeń, w których zastosowano innowacyjne rozwiązania i nowe technologie. Przykładem takiego urządzenia jest ThromboLux™ firmy *LightIntegra Technology Inc.* z Kanady. ThromboLux™ prezentowano podczas 23. Regionalnego Zjazdu Międzynarodowego Przetaczania Krwi (ISBT) w Amsterdamie 2–5 czerwca 2013 roku. Jest to urządzenie, za pomocą którego można przeprowadzać kontrolę jakości koncentratów krwinek płytkowych bezpośrednio przed przetoczeniem — przy łóżku chorego. ThromboLUX™ wykorzystuje zasadę dynamicznego rozpraszania światła (DLS, *dynamic light scattering*), za pomocą której można określić liczby płytek oraz mikropłytek w preparacie oraz oszacować zawartość płytek zaktywowanych. Z pojemnika pobiera się małą próbkę preparatu za pomocą jednorazowego, sterylnego zestawu, który następnie umieszczony zostaje w urządzeniu. Zakres pomiaru jest od 0 do 40, przy czym przyjęto, że wyniki dla KKP najwyższej jakości mieszczą się w przedziale 12–40 (odpowiednia funkcjonalność płytek krwi). Wynik pomiaru jest dostępny po około 15 minutach.

Wyniki badań przedstawione w wielu publikacjach naukowych wskazują na wysoką korelację między danymi uzyskanymi za pomocą metody DLS a skutecznością przetoczenia. Z uwagi na to, że technologia DLS pozwala wykrywać mikroagregaty w KKP, prowadzi się również badania nad wykorzystaniem ThromboLux i metody DLS do detekcji bakterii w koncentratkach krwinek płytkowych. Grupa naukowców z *University Hospital of Cologne* (Niemcy) przedstawiła wyniki badań, których celem była ocena przydatności urządzenia ThromboLux do wykrywania bakterii w sztucznie zanieczyszczonych koncentratkach krwinek płytkowych. Do badań wykorzystano KKP otrzymane zarówno metodą aferezy, jak i metodą manualną. Bezpośrednio po otrzymaniu KKP, wprowadzano do nich szczepy bakterii (*Bacillus thuringiensis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*) i przechowywano w standardowych warunkach. Próbkę pobierano przed wprowadzeniem bakterii oraz w 2, 3 i 4 dniu przechowywania po kontaminacji. Sterylne KKP posłużyły jako kontrola. Podczas przechowywania zakażonych koncentratów krwinek płytkowych, wszystkie wprowadzone szczepy bakterii namnożyły się, co skutkowało obniżeniem wyników pomiaru w skali ThromboLux (0–40). Największy spadek zaobserwowano w prepara-

tach zawierających szczep *Bacillus thuringiensis*. W KKP zakażonych innymi bakteriami obserwowano tylko nieznaczne obniżenie wartości pomiaru zapewne dlatego, że czynniki chorobotwórcze takie jak *Staphylococci* czy *Enterobacteriaceae* wchodzi w inne interakcje z płytkami krwi lub tworzą duże mikroagregaty o zróżnicowanej wielkości. Pilotażowe wyniki badań wskazują, że urządzenie ThromboLux będzie można wykorzystywać do oznaczania zanieczyszczeń bakteryjnych w KKP, jednak przed wprowadzeniem tej metody do rutynowego stosowania, niezbędne będzie przeprowadzenie dodatkowych badań [4].

Piśmiennictwo

1. Bashir S., Kemsley K., Min A., Swann D., Cardigan A., Storage of platelets resuspended in platelet additive solution (PAS) containing glucose and bicarbonate, *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1).
2. Uyttenhove A., Starace A., Broback B.S. i wsp. Multicenter evaluation of a new platelet additive solution containing glucose: Intersol – GTM, *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1).
3. Isola H., Laforet M., Agustoni O. i wsp. *In vitro* evaluation of leukocyte-depleted buffy coat pooled platelet concentrates suspended in an additive solution of fourth generation, Intersol – G, *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1).
4. Störmer M., Petrescu-Jipa V.M., Radojska S., Gathof B. S., Thrombolux platelet screening for quality control and bacterial detection, *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1).