

Wdrażanie nowych metod w krwiodawstwie i krwiolecznictwie

w świetle doniesień z XXV Zjazdu Polskiego Towarzystwa
Hematologów i Transfuzjologów
(Poznań, 25–28 września 2013)

Agata Płodzich¹, Elżbieta Lachert¹, Jolanta Antoniewicz-Papis²

¹Instytut Hematologii i Transfuzjologii

²Narodowe Centrum Krwi

W trakcie prezentacji ustnych i plakatowych dotyczących transfuzjologii, przedstawiono wiele prac odnoszących się do nowych metod analitycznych oceniających zmiany zachodzące w przechowywanych składnikach krwi, jak również do nowej aparatury, która może znaleźć zastosowanie w rutynowej pracy centrum.

Pogłębienie wiedzy na temat zmian metabolicznych zachodzących w trakcie przechowywania komórkowych składników krwi, takich jak koncentrat krwinek czerwonych (KKCz) czy koncentrat krwinek płytkowych (KKP), umożliwiło opracowanie specjalnych roztworów, w których na przykład krwinki czerwone można przechowywać do 42 dni. Wprawdzie roztwory takie (SAGM, ADSOL) stosowane są od lat w rutynowej praktyce w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa, nadal ukazuje się wiele prac dotyczących oceny ryzyka w związku ze zmianami zachodzącymi w trakcie przechowywania KKCz.

Podstawowym zadaniem krwinek czerwonych jest transportowanie tlenu do tkanek i komórek, powinny one zatem jak najdłużej zachować żywotność i spełniać swoje funkcje w krążeniu biorcy.

Krwinka czerwona nie posiada podstawowych organelli komórkowych, w tym także mitochondrium, dlatego nie może wytwarzać energii na drodze tlenowej. Głównym substratem energetycznym jest zatem glukoza, a jej beztlenowe przekształcanie w szlak glikolizy prowadzi do syntezy adenosynotrifosforanu (ATP) oraz kwasu 2,3-difosfoglicerynowego (2,3-DPG).

W procesach metabolizmu zachodzących w przechowywanych krwinkach czerwonych zużywana jest glukoza, która stanowi składnik zarówno płynów konserwujących, jak i wzbogacających. Powoduje to obniżenie zarówno ATP niezbędnego do utrzymania odpowiedniej elastyczności krwinek czerwonych, jak i 2,3-DPG — związku, który łączy się z hemoglobina, a którego zawartość wpływa na jej powinowactwo do tlenu. W trakcie przechowywania KKCz następuje także obniżenie pH osocza w wyniku nagromadzenia mleczanów i jonów wodorowych (H⁺) będących produktami glikolizy. Utrata energii w czasie przechowywania krwinek czerwonych skutkuje osłabieniem transportu czynnego i przechodzeniem potasu (K⁺) drogą dyfuzji na zewnątrz komórki. W wyniku tego obserwujemy znaczny wzrost stężenia tych jonów w osoczu. Wysokie stężenie potasu w osoczu, zwiększa ryzyko potencjalnych reakcji niepożądanych podczas przetaczania składników krwi noworodkom lub pacjentom z chorobami wieńcowymi. W czasie przechowywania KKCz obserwuje się zachwianie równowagi pomiędzy wnętrzem komórki, a środowiskiem zewnętrznym na skutek nagromadzenia produktów ubocznych metabolizmu. Wszystkie te czynniki prowadzą do uszkodzenia struktury błony komórkowej krwinki czerwonej, a tym samym do utraty zdolności reologicznych, fundamentalnej cechy krwinek czerwonych [1, 2].

Niektóre z tych zmian są odwracalne, na przykład obniżenie pH, obniżenie stężenia 2, 3-DPG, obniżenie zawartości ATP, podczas gdy inne mogą

wpływać nieodwracalnie na fizjologię krwinek czerwonych, a tym samym na ich funkcje i możliwość przeżycia w krążeniu biorcy [3].

Podczas XXV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów, który odbył się w Poznaniu w dniach 25–28 września 2013 roku, w czasie sesji Transfuzjologicznej, Jadwiga Fabijańska-Mitek wygłosiła referat na temat zastosowania cytometrii przepływowej oraz analizy proteomicznej do oceny parametrów erytrocytarnych białek błonowych podczas przechowywania KKCz. W swoim wystąpieniu przedstawiła wstępne wyniki badań składu białek w KKCz przechowywanym do 42 dni.

Obecnie coraz częściej podnoszona jest kwestia profilu bezpieczeństwa przetaczania długo przechowywanych krwinek czerwonych. Z tego względu konieczne stało się prowadzenie bardziej szczegółowych i zaawansowanych badań w tym zakresie. Wielu autorów sugeruje, że analiza proteomu (komponentu białkowego kodowanego przez genom) błony komórkowej krwinki czerwonej może dostarczyć cennych informacji na temat mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za starzenie się krwinek czerwonych w trakcie ich przechowywania [4, 5].

Narzędziem często wykorzystywanym podczas eksperymentów proteomicznych jest spektrometria masowa (MS, *mass spectrometry*) [5], która w naukach biologicznych stworzyła nowe perspektywy nie tylko dzięki możliwości dokładnego pomiaru masy badanej substancji, ale także dzięki możliwości jakościowego i ilościowego oznaczania związków występujących w mieszaninie [4]. Aktualnie znanych jest 1578 białek cytozolowych erytrocytu oraz 314 białek błonowych. Wszystkie one zostały zidentyfikowane przy użyciu metody MS [5].

W ciągu ostatnich kilku lat uwaga naukowców skupiła się na badaniu zmian proteomów krwinek czerwonych zachodzących w trakcie przechowywania KKCz lub ubogoleukocytarnego KKCz (UKKCz). Przeprowadzono wiele badań opartych na technikach proteomicznych. W trakcie tych badań analizowano zmiany jakościowe oraz ilościowe zarówno białek błonowych, jak i cytozolowych oraz badano procesy degradacyjne zachodzące w przechowywanych krwinkach czerwonych [5]. Wyniki tych badań jednoznacznie wskazują, że proteomika i narzędzia wykorzystywane do badań proteomicznych mogą być w przyszłości wykorzystywane do oceny zmian zachodzących w przechowywanych krwinkach czerwonych. Mogą także przyczynić się do doskonalenia procedur preparatyki oraz

poprawy warunków przechowywania krwi i jej składników [6].

Zanim jednak do tego dojdzie, konieczne jest opracowanie jednolitych procedur, na przykład oddzielania erytrocytów od retikulocytów oraz procedur izolacji białek. Jak wynika z doświadczeń badaczy, nie można opierać się na procedurach i metodach stosowanych przez naukowców badających proces starzenia się krwinek czerwonych w warunkach *in vivo* (izolujących krwinki czerwone ze świeżo pobranych próbek krwi), ponieważ może to prowadzić do nieprawidłowej interpretacji wyników. Z tego względu przygotowanie próbek do badań uważane jest za kluczowy etap badania proteomicznego [5]. Obok ujednoczenia procedur przygotowania i analizy materiału biologicznego równie ważne jest opracowanie i wdrożenie metod umożliwiających walidację uzyskanych wyników [4].

Po spełnieniu powyższych kryteriów metody proteomiczne będzie można skutecznie wykorzystywać do poznawania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw zmian zachodzących w trakcie przechowywania krwinek czerwonych oraz do opracowania nowych sposobów ich przechowywania. Przyczyni się to do zwiększenia bezpieczeństwa i skuteczności przetaczanych składników krwi.

Podczas sesji plakatowej przedstawiciele Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach przedstawili pracę na temat przemywania KKCz roztworem wzbogacającym. Przemywanie składników krwi stosuje się w celu usunięcia białek osocza, które mogą stać się przyczyną alergicznych reakcji poprzetoczeniowych o różnym stopniu nasilenia. Dotychczas przemywany KKCz (PKKCz) uzyskiwano przede wszystkim na drodze usunięcia osocza z jednej jednostki krwi pełnej i przemycie jej 0,9-procentowym roztworem soli fizjologicznej. Metoda ta pozwalała na przechowywanie PKKCz maksymalnie do 24 godzin od zakończenia preparatyki. Większa różnorodność i dostępność roztworów wzbogacających powoduje, że są one coraz częściej wykorzystywane w jednostkach służby krwi do przemywania KKCz. Roztwór wzbogacający SAGM zastosowano w celu otrzymania przemywanych KKCz pozbawionych kożuska leukocytarno-platekowego oraz przemywanych ubogoleukocytarnych KKCz. Ocena jakości przemywanych KKCz wykonano, porównując parametry, takie jak: stężenie białka, Ht, stężenie Hb i stopień hemolizy. Badania wykonywano przed preparatyką, po wykonaniu przemywania

i po 48 godzinach. Stwierdzono znaczące obniżenie stężenia białka w obu grupach badanych. W przypadku KKCz bez kożuszka leukocytarno-płytkowego stężenie białka obniżyło się z $2,4 \pm 0,0$ do $1,03 \pm 0,56$ g/l, a w przypadku UKKCz: z $2,4 \pm 0,0$ do $1,03 \pm 0,56$. Nie zaobserwowano również statystycznie znamienych różnic w stężeniu hemoglobiny (Hb), wartości hematokrytu (Ht) oraz w stopniu hemolizy [7].

Kolejną ciekawą pracę prezentowali przedstawiciele Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku. Tematem prezentacji był wpływ fal radiowych o różnych częstotliwościach, generowanych w systemie RFID (*radio-frequency identification*) na jakość koncentratów krwinek płytkowych.

Badano wpływ systemów HF o częstotliwości 13,56 MHz i UHF o częstotliwości 915 MHz na liczbę, funkcję i metabolizm płytek krwi w koncentraty krwinek płytkowych. W ramach badań oznaczano liczbę i morfologię krwinek płytkowych, pH, ATP oraz ekspresję antygenów CD63, CD62P, CD42a oraz liczby mikrocząstek pochodzenia płytkowego. Wykonano także badania oporności na szok hipotoniczny i badania zdolności do agregacji. Na podstawie wyników badań wykonanych w 1, 5 i 7 dniu przechowywania krwinek płytkowych stwierdzono, że we wszystkich badanych grupach wyniki nie różniły się w sposób istotny statystycznie. Stwierdzono zatem, że fale radiowe nie wpływają na jakość KKP przechowywanych przez 7 dni [8].

Podsumowanie

Współczesna transfuzjologia opiera się na zasadzie podawania pacjentowi tylko i wyłącznie brakującego składnika krwi. Z tego względu istotnego

znaczenia nabiera stałe dążenie do doskonalenia metod zapewniających maksymalne bezpieczeństwo i możliwie najwyższą jakość przetaczanych składników krwi. Wprowadzanie nowych metod preparatyki i przechowywania składników krwi musi być poprzedzone szczegółowymi badaniami; należy wykorzystywać nowoczesne metody analityczne do oceny funkcjonalności składników krwi oraz prowadzić badania jakościowe składników krwi przygotowywanych lub przechowywanych z wykorzystaniem nowych metod i urządzeń.

Piśmiennictwo:

1. Żak A., Lachert E., Antoniewicz-Papis J. i wsp. Ocena jakości ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek czerwonych zamrażanych i rozmrażanych w systemie ACP 215. *Journal of Transfusion Medicine* 2011; 4 (1): 32–44.
2. Kubis J., Lachert E., Jolanta Antoniewicz-Papis J. i wsp. Zmiany biochemiczne w napromieniowanych koncentraty krwinek czerwonych przechowywanych do 42 dni. *Journal of Transfusion Medicine* 2008; 1 (1): 46–54.
3. D'Alessandro A., Liunbruno G., Grazzini G., Zolla L. Red blood cell storage: the story so far. *Blood Transfusion* 2010; 8 (2): 82–88.
4. Płodzich A. Proteomika i jej zastosowanie w wybranych jednostkach chorobowych. *Journal of Transfusion Medicine* 2013; 6 (2): 48–59.
5. Fabijańska-Mitek J., Gmerek K., Łoniewska-Lwowska A. Zastosowanie cytometrii przepływowej oraz analizy proteomicznej w ocenie erytrocytarnych białek błonowych podczas przechowywania koncentratów krwinek czerwonych. *Acta Haematologica Polonica* 2013; 44: 265–270.
6. Łoniewska-Lwowska A., Fabijańska-Mitek J., Koza K. Dlaczego warto badać proteom krwinek czerwonych przechowywanych w bankach krwi. *Postępy Nauk Medycznych* 2012; 7: 595–598.
7. Mazur A., Król D., Rabenda N. i wsp. Dostosowanie roztworu SAGM w przemywaniu koncentratów krwinek czerwonych. *Acta Haematologica Polonica* 2013, 44: 122.
8. Rogowska A., Bujno M., Lipska A., Żebrowska A. Radziwon P. Wpływ fal radiowych generowanych w systemie RFID na jakość koncentratów płytek krwi. *Acta Haematologica Polonica* 2013, 44: 126.