

Markery poškození krevních buněk

Procházková R

Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec a Ústav zdravotnických studií, Technická univerzita v Liberci

Transfuze Hematol. dnes, 19, 2013, No. 4, p. 240-243

SOUHRN

Krevní buňky podléhají během odběru, zpracování a skladování významným morfoloogickým a biochemickým změnám. Struktura a funkce krevních buněk jsou ovlivněny řadou faktorů, počínaje technikou odběru, složením antikoagulačního roztoku, kontaktem s povrchem odběrového vaku či setu, metodou zpracování, obsahem leukocytů v produktu či způsobem deleukotizace. Metabolické a morfoloogické alterace erytrocytů i trombocytů v koncentrátech limitují jejich skladovatelnost a pravděpodobně mohou ovlivnit terapeutický efekt transfuze. Sdělení předkládá stručný přehled změn, které v krevních buňkách v průběhu skladování probíhají, možnosti monitorování buněčného poškození a shrnuje význam stanovení markerů buněčného poškození pro výzkum, validaci nových postupů a praxi.

KLÍČOVÁ SLOVA

krevní buňky, buněčné poškození, markery, aktivace

SUMMARY

Procházková R

Blood cell storage lesion

Blood cells are subjected to important morphologic and biochemical changes during collection, processing and storage. Their structure and function are influenced by a number of factors, such as collection technique, composition of coagulation solution, contact with the surface of the collection bag or set, method of processing and content of leukocytes in the product or leukodepletion method. Metabolic and morphologic alterations in red blood cells and platelets concentrates limit their storage and may be associated with delayed posttransfusion recovery in vivo.

The communication provides a brief summary of changes in blood cells during storage, the possibility to monitor cell injury and summarizes the significance of markers of cell injury research, validation of new procedures and practice.

KEY WORDS

blood cells, cell injury, markers, activation

ÚVOD

Krevní buňky podléhají během odběru, zpracování a skladování významným morfoloogickým a biochemickým změnám. Struktura a funkce krevních buněk jsou ovlivněny řadou faktorů, počínaje technikou odběru, složením antikoagulačního roztoku, kontaktem s povrchem odběrového vaku či setu, metodou zpracování a obsahem leukocytů v produktu, či způsobem deleukotizace (1, 2, 3, 4, 5). Metabolické a morfoloogické alterace u erytrocytů i trombocytů v koncentrátech limitují jejich skladovatelnost a dle některých autorů mohou ovlivnit terapeutický efekt transfuze (6, 7, 8). Některé z těchto změn jsou reversibilní a jiné ne (5).

Všechny mechanismy vedoucí k poškození krevních buněk během odběru a skladování nejsou dosud plně objasněny (8).

MORFOLOGICKÉ A METABOLICKÉ ZMĚNY KREVNÍCH BUNĚK

Krevní buňky podléhají během skladování apoptóze (9), procesu programované řízené buněčné smrti (10), ke které dochází přirozeně stárnutím krevních buněk během skladování (11), tento proces je doprovázen řadou morfoloogických a metabolických změn (12). **Morfoloogické změny** u trombocytů se projevují změnou diskoidního tvaru ve sférický (4). Erytrocyty násled-

kem zejména deplece adenosintrifosfátu (ATP) mění diskoidní tvar v echinocyt (13). **Metabolické alterace** krevních buněk se projevují ve změnách pH, zvýšení LDH v supernatantu, v konzumpci glukózy a produkci laktátu (14). Tyto změny odrážejí intenzitu probíhající anaerobní glykolýzy a mají význam pro metabolismus erytrocytů i trombocytů (15, 16). Produkce kyselin a následné snížení pH snižuje viabilitu a funkci krevních buněk.

MARKERY APOPTÓZY KREVNÍCH BUNĚK

V průběhu apoptózy dochází k externalizaci fosfatidylserinu na povrch buněčné membrány (5, 7, 8), u trombocytů navíc k expresi markerů aktivace. **Phosphatidylserin** (PS) je fyziologicky lokalizován na cytoplazmatické straně plazmatické membrány. V buňkách, které podléhají apoptóze, se fosfatidylserin translokuje na extracelulární stranu trombocytu při skladovací teplotě 22 °C (u erytrocytu při 4 °C) a uvolňuje do plazmy (5). Zde může být v solubilní formě detekován technikou ELISA. Membránová exprese může být prokázána po vazbě monoklonálních protilátek průtokovou cytometrií, která využívá vazby PS na annexin V. Přestože proces apoptózy doprovází řada změn, externalizace fosfatidylserinu na povrch buněčné membrány je považována za její časný znak (5).

Za moderní marker jakosti transfuzních přípravků je považován **annexin V**, globální marker apoptózy (17, 18, 19, 20). Jde o intracelulární glykoprotein, který je v buňkách fyziologicky obsažen v cytosolu a organelách. Jeho zvýšená plazmatická hladina je v přímé relaci se stupněm buněčného poškození a jeho stanovení je dnes používáno jako vysoce senzitivní parametr monitorování kvality trombocytových transfuzních přípravků (17, 18, 20). Při současném stanovení K⁺ a volného hemoglobinu je vhodným markerem buněčného poškození erytrocytových transfuzních přípravků (19).

Specifické změny při skladování erytrocytů („red cell storage lesion“) byly popsány již v roce 1956 Gibsonem (21). Tyto změny progredují během skladování a jsou ovlivněny složením antikoagulačních a skladovacích roztoků (5). Erytrocyty mohou být významně ovlivněny osmotickým šokem při kontaktu odebírané krve s hyperosmolárním antikoagulačním roztokem („red cell collection injury“) (21). Během skladování významně klesá obsah 2,3-difosfoglycerátu (2,3-DPG) a ATP. Po týdnu skladování se hladina 2,3-DPG snižuje až na 10 %, což může vést k redukci schopnosti uvolnit O₂ do mikrocirkulace (5, 22). Snížená hladina ATP může ovlivnit přežití erytrocytů tím, že sníží jejich pružnost a zvýší jejich destrukci při průchodu mikrokapilára-

mi. Obsah 2,3-DPG a ATP v erytrocytech se může po transfuzi obnovit (50–70 % za 1 den, plně za týden) (5). Hladina 2,3-DPG a ATP je významně ovlivňována i sníženou hodnotou pH. Hodnota pH reprezentuje metabolické změny, dále je ovlivněna vysokou koncentrací citrátu v antikoagulačním roztoku (pH 5,5–5,8) (15, 23). Moderní modifikované antikoagulační a skladovací roztoky mohou ovlivnit funkci erytrocytů tím, že oddálí snížení obsahu 2,3-DPG a ATP (24).

V průběhu skladování dochází ke změnám tvaru erytrocytu a změně integrity buněčné membrány, proces je spojen se zvýšením hladiny intracelulárního Ca²⁺ a poklesem pH a ATP. Následná buněčná dehydratace a vznik mikrovesikulací ovlivňují rheologické vlastnosti erytrocytů. Současně vlivem snížení činnosti Na⁺/K⁺ pumpy klesá obsah intracelulárního K⁺ (6), k jehož normalizaci dochází během několika hodin po transfuzi (15, 25).

Relativně novým markerem stavu erytrocytů je stanovení **CD47**. Jde o transmembránový glykoprotein, který je přítomen na většině tělesných buněk. V případě erytrocytů se jedná o tzv. „self-recognition marker“. Jeho přítomnost na povrchu erytrocytu představuje ochranu cirkulujících erytrocytů před fagocytózou (26), která je důležitá pro jejich přežití in vivo po transfuzi (27). Hladina CD47 v supernatantu přípravku odpovídá úrovni lýzy erytrocytů (26).

Specifickou změnou pro trombocyt je aktivace, odezva klidové destičky na specifické stimuly zprostředkovaná receptory různých typů (28). Aktivace trombocytu je spojena se snížením metabolické aktivity trombocytu a s morfologickými a funkčními změnami, které progredují od 3. dne skladování přípravku. Změna tvaru trombocytu z diskoidního na sférický se projevuje snížením až vymizením tzv. „swirling fenoménu“, který je v praxi známkou viability trombocytu. Tento proces je ovlivněn hodnotou pH. Za kritický pro viabilitu a funkci trombocytů je považován pokles pH pod hodnotu 6,2 (16, 29, 30). Současně dochází k degranulaci vnitřních granulárních struktur trombocytu, která vede k povrchové expresi makromolekul lokalizovaných původně intracelulárně v granulích destiček. Jednou z nich je **P-selektin** (CD62P), integrální membránový glykoprotein alfa-granulí, který se na povrchu klidové destičky nenalézá a jeho povrchová detekce je průkazem degradace alfa-granulí (27). Exprese P-selektinu na povrchu destičky umožňuje prostřednictvím specifické membránové molekuly PSGL-1 (CD162) její adhezi na granulocyty a monocyty a následné odstranění z cirkulace tkáňovými makrofágy (31). Stanovení exprese CD62P na povrchu trombocytů nebo jeho solubilní formy v supernatantu přípravku je používáno k posouzení aktivace

trombocytů v přípravku (7, 8). Zvýšení hladiny/exprese CD62P koreluje se vzestupem annexinu V a poklesem pH. Při hodnotách pH 6,2–6,8 dochází k expresi CD62P, která je po inkubaci trombocytu v plazmě reverzibilní. Při hodnotě pH < 6,2 již dochází k ireverzibilnímu poškození trombocytu s ireverzibilní expresí CD62P, která je spojena s uvolněním cytokinů z trombocytů (32).

Cytokiny, zejména IL-1 β , IL-6, IL-8, či RANTES, byly zkoumány v erytrocytových i trombocytových přípravcích. Byla prokázána souvislost mezi hladinou cytokinů v přípravcích a následnými nehemolytickými febrilními potransfuzními reakcemi (33). Zejména obsah IL-8 závisí na stupni kontaminace přípravku leukocyty a trombocytů (34). Obsah cytokinů v přípravcích může být ovlivněn i způsobem odběru krve, technologií jejího zpracování a dodatečnými procesy, jako filtrace produktu, které mohou mít vliv na aktivaci trombocytů a způsobit generaci cytokinů z trombocytů (32, 35). Stanovení cytokinů ve vhodných kombinacích tak může být vhodným indikátorem jakosti transfuzních přípravků (36, 37).

PRAKTICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ MARKERŮ POŠKOZENÍ KREVNÍCH BUNĚK

V běžné praxi se pro kontrolu jakosti transfuzních přípravků používají jednoduché testy *in vitro*, jako stanovení stupně hemolýzy u koncentrátů erytrocytů, pH a swirling fenomén u koncentrátů trombocytů (38). Klinický význam stanovení markerů poškození krevních buněk je stále zkoumán (5). Hodnocení markerů metabolického stavu krevních buněk, tj. stanovení hladiny glukózy, laktátu a LDH (7, 38), markerů apoptózy a aktivace buněk, např. annexinu V a exprese P-selektinu (4, 17), se používá zejména *in vitro* při zkoumání vlivu použitých materiálů a technologií na krevní buňky. V literatuře nalezneme řadu prací porovnávajících kvalitu trombocytových transfuzních přípravků získaných různými technologiemi – např. porovnání přípravků z buffy-coatů, z aferézy (39), trombocytů vyrobených manuálně či přístrojově (40). Zkoumání metabolického stavu trombocytů v různých aditivních roztocích pro jejich skladování přineslo jasný průkaz vyšší kvality trombocytů skladovaných v roztocích III. generace, zejména objasněním pozitivního vlivu K⁺ a Mg⁺⁺ na metabolismus trombocytů (41, 42). V současné době je tímto způsobem zkoumáno možné prodloužení skladování trombocytových transfuzních přípravků na více než 7 dnů (43, 44), vliv působení patogenní inaktivace na krevní buňky (45, 46, 47), či ozařování, resp. promývání transfuzních přípravků. Značná pozornost je věnována objasnění mechanismu potransfuzních reakcí, zejména vlivu působení mikrolipidových partikulí a možné souvis-

losti s TRALI (48). Aktuální je studium vlivu „stáří“ transfundovaných erytrocytů a jejich vlivu na lidský organismus (49).

LITERATURA

- Gemmell Ch. Activation of platelets by *in vitro* whole blood contact with materials: increases in microparticle, procoagulant activity and soluble P – selectin blood levels. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001; 12: 933-943.
- Gullikson H. Platelet storage media. *Transfus Apher Sci* 2001; 24: 241-244.
- Runkel S, Bach J, Anders C, et al. The impact of two whole blood inline filters on markers of coagulation, complement and cell activation. *Vox Sang* 2005; 88: 17-21.
- Seghatchian J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion. *Transfus Med Rev* 1997; 11: 130-144.
- Solheim BG, Flesland O, Seghatchian J, et al. Clinical implications of red blood cell and platelet storage lesions: an overview. *Transfus Apher Sci* 2004; 31: 185-189.
- Bessos H, Seghatchian J. Red cell storage lesions: The potential impact of storage-induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells. *Transf Apher Sci* 2005; 32: 227-232.
- Curvers J, van Pampus ECM, Feijge MAH, et al. Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. *Transfusion* 2004; 44: 49-58.
- Perrotta PL, Perrotta ChL, Snyder EL. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion* 2003; 43: 526-535.
- Dzik WH. Apoptosis, TGF beta and transfusion-related immunosuppression: Biologic versus clinical effects. *Transf Apher Sci* 2003; 29: 127-129.
- Bertino AM, Qi XQ, Xia Y, et al. Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37 °C. *Transfusion* 2003; 43: 857-866.
- Lang F, Foller M, Lang KS, et al. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membrane Biol* 2005; 205: 147-157.
- Leitner GC, Stohlawetz PJ, Stiegler G, et al. Quality of packed red blood cells and platelet concentrates by multicomponent collection using the MCS Plus device. *Journal of Clinical Apheresis* 2003; 18: 21-25.
- Wolfe LC. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. *Transfusion* 1985; 25: 185-202.
- Gutensohn K, Geidel K, Kroeger N, et al. Platelet function testing in apheresis products: flow cytometric, resonance thrombographic (RTG) and rotational thrombelastographic (roTEG) analyses. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 147-155.
- Hess JR. Red cell changes during storage. *Transfus Apher Sci* 2010; 43: 51-59.
- Dijkstra-Tiekstra MJ, Pietersz RNI, Huijgens PC. Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and *in vitro* and *in vivo* parameters. *Vox Sang* 2004; 87: 257-263.
- Krailadsiri P, Seghatchian P, Amiral J, et al. Annexin V, a new marker of platelet storage lesion: correlation with dMPV. *Transfus Sci* 1997; 18: 223-226.
- Krailadsiri P, Seghatchian J. Effect of processing and storage on pla-

- telet activation, cellular injury and microvesiculation. *Transfus Apher Sci* 2001; 24: 237-238.
19. Seghatchian J, Krailadsiri P. Red cell storage lesion assessed by the levels of potassium, hemoglobin and annexin V in supernatant. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 121-127.
 20. Tzima E, Walker JH. Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets* 2000; 11: 245 – 251.
 21. Gibson JG, Murphy WP, Scheitlin WA, et al. The influence of intracellular factors involved in the collection of blood in ACD on maintenance of red cell viability during refrigerated storage. *Am J Clin Pathol* 1956; 26: 858-873.
 22. Llohn A, Vetlesen A, Fagerhol MK, et al. The effect of pre-storage cooling on 2,3-DPG levels in red cells stored in SAG-M. *Transfus Apher Sci* 2005; 33: 113-118.
 23. Holme S, Elfath MD, Whitley P. Evaluation of in vivo and in vitro quality of apheresis- collected RBC stored for 42 days. *Vox Sang* 1998; 75: 212-217.
 24. Korte D, Korsten HGH, Verhoeven AJ. Prolonged maintenance of 2,3-diphosphoglycerate acid and adenosine triphosphate in red blood cells during storage. *Transfusion* 2008; 48: 1081-1089.
 25. Kim-Shapiro DB, Lee J, Gladwin MT. Storage lesion: role of red blood cell breakdown. *Transfusion* 2011; 51: 844-851.
 26. Annis AM, Sparrow RL. Expression of CD47 (integrin associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apher Sci* 2002; 27: 233-233.
 27. Sparrow RL, Healey G, Patton KA, et al. Red blood cell age determines the impact of storage and leukocyte burden on cell adhesion molecules, glycoprotein A and the release of annexin V. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 15-23.
 28. Loudová M, Krejsek J, Kopecký O, et al. Cytoimmunofluorometrie a její využití v detekci aktivované destičky. *Vnitř lék* 2001; 47: 175-180.
 29. Holme S, Sweeney S, et al. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss in vivo viability. *Transfusion* 1997; 37: 2-17.
 30. Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009; 41: 105-113.
 31. Perseghin P, Mascaretti L, Speranza T, et al. Platelet activation during plasma-reduced multicomponent PLT collection: a comparison between COBE Trima and Spectra LRS turbo cell separators. *Transfusion* 2004; 44: 125-130.
 32. Seghatchian MJ, Wadhwa M, Thorpe R. Cytokines in platelet concentrates: A comparison of apheresis platelet (Haemonetics) and filtered and unfiltered pooled buffy-coat derived platelet concentrates. *Transfus Sci* 1997; 18: 103-107.
 33. Lin SJ, Tzeng CH, Hao HY, et al. Cytokine release in febrile non-haemolytic red cell transfusion reactions. *Vox Sang* 2002; 82: 156-160.
 34. Wadhwa M, Seghatchian MJ, Dilger P, et al. Cytokine accumulation in stored red cell concentrates: effect of buffy-coat removal and leucoreduction. *Transfus Sci* 2000; 23: 7-16.
 35. Seghatchian J. Platelet storage lesion: An update on the impact of various leukoreduction processes on the biological response modifiers. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 125-130.
 36. Seghatchian J, Krailadsiri P, Dilger P, et al. Cytokines as quality indicators of leucoreduced red cell concentrates. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 43-46.
 37. Wadhwa M, Krailadsiri P, Dilger P, et al. Cytokine levels as performance indicators for white blood cell reduction of platelet concentrates. *Vox Sang* 2002; 83: 125-136.
 38. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 12th ed. Strasbourg, Council of Europe Publishing, 2006.
 39. Ali SF. Platelet activation of platelet concentrates derived from buffy coat and apheresis methods. *Transfus Apher Sci* 2011; 44: 11-13.
 40. Vetlesen A, Mirlashari MR, Ezligini F, Kjeldsen-Kragh J. Evaluation of platelets 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.
 41. Zhang JG, Carter JC, Culibrk B, et al. Buffy coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Transfusion* 2008; 48: 847-856.
 42. Diedrich B, Sandgren P, Jansson B, et al. In vitro and in vivo effects of potassium and magnesium on storage up to 7 days of apheresis platelet concentrates in platelet additive solutions. *Vox Sang* 2008; 94: 96-102.
 43. Gullikson H, AuBuchon JP, Vesterinen M, et al. Storage of platelets in additive solutions: a pilot in vitro study of the effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2002; 82: 131-136.
 44. Cardigan R, Sutherland J, Garwood M, et al. In vitro function of buffy coat-derived platelet concentrates stored for 9 days in CompoSol, PAS II or 100% plasma in three different storage bags. *Vox Sang* 2008; 94: 103-112.
 45. Tauszig ME, Picker SM, Gathof BS. Platelet derived cytokine accumulation in platelet concentrates treated for pathogen reduction. *Transfus Apher Sci* 2012; 46: 33-37.
 46. Picker SM, Tauszig ME, Gathof BS. Cell quality of apheresis-derived platelets treated with riboflavin-ultraviolet light after resuspension in platelet additive solution. *Transfusion* 2012; 52: 510-516.
 47. Seghatchian J, Hervit T, Putter JS. Effect of pathogen inactivation on the storage lesion in red cells and platelet concentrates. *Transfus Apher Sci* 2011; 45: 75-84.
 48. Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, et al. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. *Transfusion* 2011; 51: 886-893.
 49. Van de Watering L. Red cell storage and prognosis. *Vox Sang* 2011; 100: 36-45.

Doručeno do redakce: 2. 9. 2013

Přijato po recenzi: 2. 12. 2013

MUDr. Renata Procházková, Ph.D.

Transfuzní oddělení
Krajská nemocnice Liberec, a.s.

Baarova 15
460 63 Liberec
renata.prochazkova@nemlib.cz