
SOUHRNNÉ PRÁCE • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

Parametry kvality kryokonzervovaných erytrocytů rekonstituovaných v roztoku AS-3 (Nutricel)

Bohoněk M.¹, Petráš M.¹, Turek I.¹, Urbanová J.¹, Hrádek T.¹, Staropražská V.¹, Koštířová J.¹, Horčíčková D.¹, Duchková S.¹, Svobodová J.², Tejčková E.²

¹Oddělení hematologie, biochemie a krevní transfuze, Ústřední vojenská nemocnice, Praha

²Oddělení nukleární medicíny, Ústřední vojenská nemocnice, Praha

Souhrn

Práce je dílčím výsledkem projektu, jehož cílem byl vývoj a zavedení metodiky získávání a dlouhodobého skladování erytrocytů pro strategické, speciální a léčebné potřeby Armády České republiky a státu. Jako základní zkoumaná metoda bylo zvoleno mražení erytrocytů, získaných metodou dvojitě erythrocytaferézy, ve vysoké koncentraci glycerolu při -85 °C a teplotě skladování -65 °C a nižší. Glycerolizace a deglycerolizace erytrocytů, včetně jejich závěrečné resuspenze v Nutricelu (AS-3), byla prováděna uzavřeným a automatizovaným systémem na zařízení Haemonetics ACP 215. Stabilita EAK rekonstituovaných v AS-3 byla ověřena jak klinickým hodnocením u zdravých dobrovolníků pomocí tzv. indexu terapeutické účinnosti, tak biochemickými a hematologickými parametry. Rekonstituované erytrocytární jednotky byly hodnoceny ve dnech 0, 7, 14 a 21 po rozmražení ⁵¹Cr značenými erytrocyty ve dvou skupinách: mražené a skladované v primárních vacích (skupina A) a mražené a skladované po přepuštění do speciálních vaků pro hluboké zmražení (skupina B). Bylo měřeno 24hodinové přežívání autologních erytrocytů podáváných zdravým dobrovolníkům a stanoven index terapeutické účinnosti (ITE) za pomoci tzv. freeze-thaw-wash-recovery (FTW%) závislého na množství hemoglobinu v odpadu po promytí rozmražených erytrocytů. Celkem bylo zmrazeno, rekonstituováno a takto vyšetřeno 104 TU erytrocytů. Hodnocené erytrocyty v obou skupinách vykazují téměř shodné hodnoty ITE: 74,01 (±CI95 %: 71,97–76,04) a 74,02 (±CI95 %: 71,18–76,87) bez ohledu na délku sledované doby uchovávání po rekonstituci (21 dní). U skupiny B bylo zjištěno 4% snížení hodnoty přežití po 24 hod. a 4% zvýšení hodnoty FTW%. Hodnoty hemolýzy na konci doby skladování byly u všech hodnocených skupin nižší než 1%. Z hematologických a biochemických parametrů byly sledovány změny hemoglobinu, hematokritu, leukocytů, hemolýzy, osmolality, pH, K, P, ATP, NH₃ a 2,3-DPG. Také výsledky měření těchto laboratorních parametrů prokázaly dobrou použitelnost zmražených erytrocytů ještě 3 týdny po rozmražení, rekonstituci v Nutricelu a uchovávání při teplotě 2–6 °C.

Klíčová slova: kryokonzervace erytrocytů, hluboko zmražená krev, rekonstituce, glycerolizace, deglycerolizace, krizová krevní politika, Nutricel, AS-3, dvojitě erythrocytaferéza

Summary

Bohoněk M., Petráš M., Turek I., Urbanová J., Hrádek T., Staropražská V., Koštířová J., Horčíčková D., Duchková S., Svobodová J., Tejčková E.: Quality parameters of cryopreserved red cells reconstituted in AS-3 solution (Nutricel)

The article summarised partial results the project of evaluation and implementation method for collection and long-term storage packed red cells (RBC) for strategic, special and therapeutic findings Army of Czech Republic as well as the country. The essential surveyed method was freezing of RBC collected by double erythrocytapheresis in high glycerol at -80 °C and stored at -65 °C and lower. Glycerolisation, deglycerolisation and resuspension in Nutricel (AS-3) was performed with the Haemonetics ACP 215 machine by closed system. Stability of RBC in AS-3 was evaluated by clinical study with health volunteers by index of therapeutic effectiveness (ITE) as well as by biochemical and haematological parameters. Reconstituted RBC units were evaluated in days 0, 7, 14 and 21 after thawing by ⁵¹Cr labeled red cells in two groups: freezing and storage in primary collection bags (group A) and freezing and storage in special bags for deep freezing (group B). 24-hour survival autologous red cell at health volunteers were observed and set ITE and via “freeze-thaw-wash-recovery” (FTW%) dependent on amount of haemoglobin in waste after washing deglycerolised RBCs. Totally 104 RBC units were frozen, reconstituted and measured. Evaluated RBCs both groups were almost statistically identical ITE: 74.01 (±CI95%: 71.97–76.04), 74.02 (±CI95%: 71.18–76.87) and 74.5 (±CI95%: 71.62–77.38), respectively, regardless of storage time after RBCs deglycerolization. The 4-percent decrease of 24-hour posttransfusion survival (%) means as well as 4-percent increase of FTW% means were statistically significant between RBCs group B and A. Haemolysis in the end of storage was below 1% at both group. From haematological and biochemical parameters haemoglobin, haematocrit, leucocytes, haemolysis, osmolality, pH, potassium, phosphorus, ATP, ammoniac and 2,3-DPG were observed. Results of these tests demonstrate good applicability frozen RBC 3 week after thawing and reconstitution in Nutricel and following storage at 2–6 °C.

Key words: cryopreservation of red cell, deep frozen blood, reconstitution, glycerolisation, deglycerolisation, crisis blood policy, Nutricel, AS-3, double erythrocytapheresis

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 4, p. 208–216.

Úvod

Náhrada krve a zásobování krví a transfuzními přípravky je stálým strategickým a logistickým problémem zdravotnické služby armád celého světa, který vyplývá z podstaty krve jako léčiva, tj. biologického přípravku, který má omezenou dobu použitelnosti, specifické a omezující podmínky přepravy, skladování a aplikace pacientům (1). Stejně problematickou zůstává i tzv. krizová krevní politika státu, kdy při zachování obvyklých a běžně používaných postupů je obtížné zajistit dostatečné zásoby krve pro případ náhlého napadení státu, teroristického útoku nebo hromadného neštěstí.

Zabezpečení armády krví je řešeno systémem distribuce z vojenského transfuzního centra, které přímo zásobuje krví rozvinuté zdravotnické etapy. Pro náhle vzniklou potřebu je nutné mít k dispozici kdykoli mobilizovatelnou zásobu erytrocytů univerzální krevní skupiny 0. Tomuto požadavku nejlépe odpovídá strategický sklad kryokonzervovaných erytrocytů.

V ČR dosud problém nebyl řešen v rámci žádného resortu, nebyla dostupná ani alternativní náhrada v rámci zahraniční spolupráce. Zásoby krve pro potřeby AČR jsou tvořeny pouze běžnými transfuzními přípravky s limitovanou dobou použitelnosti, pro případy možné zvýšené potřeby jsou tyto zásoby navyšovány mimořádnými odběry a nákupy zatížené malou pružností a následnou vysokou mírou expirace. Nová bezpečnostní rizika v podobě globálního terorismu s možností vzniku masivních zdravotnických ztrát mezi obyvatelstvem problém okamžitých zásob krve povyšuje na úroveň celospolečenského zájmu, resp. strategické potřeby státu.

Jednou z možností, jak tyto situace řešit, je uchovávání hlubokomražené krve připravené speciálními postupy – kryokonzervací. Různé postupy kryokonzervace erytrocytů jsou obecně známy a používány již delší dobu. Limitujícím faktorem ale dosud byla zejména doba použitelnosti – zpravidla pouhý jeden den po rozmrazení – a tím velmi omezená operativnost použití takového přípravku. V posledních letech s nástupem nových technologií a resuspenzních roztoků se doba použitelnosti krve po rozmrazení a přípravě k podání (tzv. rekonstituci) prodloužila na 1–2 týdny.

Zásadním předmětem výzkumných prací našeho projektu byla validace metodiky umožňující výrobu kryokonzervovaných erytrocytů použitelných minimálně 3 týdny po rekonstituci.

Materiál a metodika

Metoda přípravy rekonstituovaných EAK

Pro získání erytrocytů byla použita metoda dvojité erythrocytaferézy na separátoru krevních komponent Haemonetics MCS+. Odebrané erytrocyty byly neprodleně zmrazeny s příměsí 40% glycerolu, pro napojování vaků byla použita sterilní svářečka vaků. Vlastní proces glyce-

rolizace je řízený a prováděný na automatickém zařízení Haemonetics ACP-215. Jednotky erytrocytů po glycerolizaci byly ihned zmrazeny v mechanickém mrazicím boxu Jouan VX-80 při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byly ponechány po dobu nejméně 24 hodin. Většina erytrocytů byla zmrazena v primárních PVC vacích Haemonetics, část byla před glycerolizací a zmrazením přepuštěna do speciálních vaků pro hluboké mražení Baxter (1, 4, 5, 9, 10).

Následně byly erytrocyty skladovány alespoň 30 dní při teplotě $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozmrazení erytrocytů se provádělo 30 min. ve vodní lázni při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v rozmrazovacím agitátoru lépe „třepačce“ Tool s následným 25 min. vytemperováním na pokojovou teplotu. Proces deglycerolizace a promytí rozmražených erytrocytů probíhal plně automatizovaně na zařízení Haemonetics APC 215 za použití 12% roztoku NaCl pro počáteční odstranění glycerolu z erythrocytárních korpuskulí a dále roztoku 0,9% NaCl + 0,2% dextransů k vmytí nadbytečného glycerolu z erythrocytární suspenze. Promyté erytrocyty byly resuspendovány v roztocích AS-3 (Nutricel). Objem rekonstituovaných erytrocytů byl v rozmezí 200 až 300 ml. Rekonstituované erytrocyty byly následně skladovány 7, 14, resp. 21 dní při teplotě $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Uspořádání studie

Klinická studie byla otevřená a trvala 12 měsíců. Klinické hodnocení, prováděné podle zásad správné klinické praxe, bylo povoleno Ředitelstvím vojenské zdravotnické služby AČR a schváleno etickou komisí Ústřední vojenské nemocnice Praha a prováděno podle zásad správné klinické praxe.

Do klinického hodnocení bylo zařazeno celkem 104 zdravých dobrovolníků (průměrný věk 36,4 let). Všichni dárči byli podrobně informováni o všech detailech a podepsali informovaný souhlas.

Subjekty byly rozděleny do dvou skupin:

- Skupina A: erytrocyty pro rozmrazení resuspendované v AS-3, skladované v primárním odběrovém vaku.
- Skupina B: erytrocyty po rozmrazení resuspendované v AS-3, skladované ve speciálním vaku pro hluboké zmražení.

Obě skupiny byly dále rozděleny na 4 podskupiny podle hodnocené doby uchovávání rekonstituovaných erytrocytů (0, 7, 14 a 21 dní) po rozmrazení. Rozdělení subjektů do skupin a podskupin je uvedeno v tabulce 1.

Měřené parametry

Po rekonstituci kryokonzervovaných erytrocytů, skladovaných minimálně 30 dní, v Nutricelu se provedla v čase 0, 7, 14 a 21 dní autologní transfuze (intravenózní infuze) u každého subjektu. Z důvodu měření primární klinické veličiny byly erytrocyty označeny radioizotopem ^{51}Cr .

Z buněčné suspenze rekonstituovaných erytrocytů v roztoku Nutricel se odebral vzorek 20 ml, který se značil radioizotopem ^{51}Cr při koncentraci přibližně 800 kBq (odpovídající zhruba 0,22 μCi). Značení se provedlo přidáním roztoku ^{51}Cr v roztoku chromanu sodného v množ-

ství 1 ml. Tato radioaktivní dávka odpovídala přibližně 20 % běžně aplikované aktivity používané při diagnostickém stanovení. Po smíchání buněčné suspenze s radioizotopem se provedla inkubace při normální teplotě 20–25 °C po dobu 60 minut. Následně se přidaly 2 ml Celaskonu inj. a směs se znovu promíchala. Takto připravený přípravek se podával subjektu transfuzí (intravenózní infuzí). Objem klinicky hodnoceného přípravku byl podán transfuzí v délce doby kratší než 10 minut (cca 7 minut při rychlosti 60 kapek/min). Radioaktivita ^{51}Cr vázaná na erythrocyty byla u dobrovolníků měřena po 10, 20 a 30 minutách a 24 hodin po infuzi.

Index terapeutické účinnosti, ITE (%) (3, 4, 7, 11, 12, 14, 16) představuje procentuální množství erythrocytů, které přežily po 24 hodinách po aplikaci, vztažené k relativnímu celkovému počtu erythrocytů přítomných v transfuzním přípravku, vyjádřeným jako FTW %. Veličina FTW% (freeze-thaw-wash recovery) je vypočtena z hodnot hemoglobinu v odpadu po promytí rozmražených erythrocytů a celkového hemoglobinu v transfuzní jednotce.

$\text{FTW}\% = 100 - (\text{Hb}(\text{odpad}) \times 100 / (\text{Hb}(\text{odpad}) + \text{Hb}(\text{TU})))$ (3, 4, 8, 10, 12).

Hodnota ITE% byla vypočtena na základě 24hodinového přežívání erythrocytů.

$\text{ITE}\% = \text{FTW}\% \times 24\text{hodinové potransfuzní přežití erythrocytů} (\%) / 100$.

Veličina 24hodinového potransfuzního přežití erythrocytů se stanovuje jako procentuální část odhadovaného 100% potransfuzního přežití erythrocytů.

Vedle klinické primární veličiny se stanovovaly i sekundární veličiny reprezentované hematologickými a biochemickými parametry (3–6, 8–15, 17, 18, 19): hematokrit a koncentrace hemoglobinu v přípravku a v odpadu po promytí (fotomericky, Advia 120 Bayer), koncentrace hemoglobinu v supernatantu (spektrofotometrie, Konelab 60i, Kone), objem jednotky erythrocytů (gravimetrie, ACP-215 Haemonetics), procento hemolýzy (výpočtem), obsah příměsí leukocytů (mikroskopicky v Nageotteově komůrce), osmolalita (osmometr, Fiske 2400, Advanced Instruments), pH (pH meter Beckmann), draslík (ISE, nepřímá potenciometrie, Konelab 60i, Kone), fosfor a amoniak (spektrofotometrie, Konelab 60i, Kone), ATP, (bioluminescence, Konelab 60i., Kone), 2,3-DPG (fotometrie, Konelab 60i, Kone). Každý přípravek byl navíc hodnocen na kontrolu sterility podle Českého lékopisu.

Statistická analýza

Ke statistické analýze byl použit pro srovnávání všech sledovaných primárních i sekundárních veličin mezi skupinami i uvnitř skupin nepárový t-test (Mann-Whitney U-test), s $p < 0,05$ při dvoustranném intervalu spolehlivosti.

Pro srovnávání všech sledovaných veličin v časové posloupnosti (tj. podskupin: 0–7–14–21 dní po rekonstituci) byla použita metoda Kruskal-Wallis test (neparametrická ANOVA), porovnávající všechny hodnoty k hodnotám ve skupině v čase 0, s $p < 0,05$ při dvoustranném intervalu spolehlivosti.

Výpočty byly prováděny statistickým softwarem StatMate společnosti GraphPad (verze 1.01i, 16/1/1998) určený k biostatistickým výpočtům klinických studií.

Výsledky

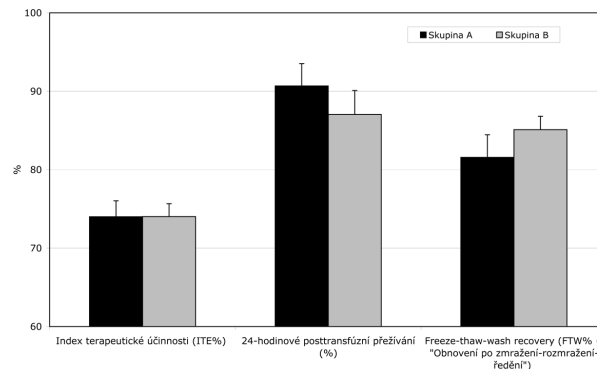
Hodnoty indexu terapeutické účinnosti (ITE%), zvoleného jako primární veličina pro určení účinnosti rekonstituovaných erythrocytů, byly po dobu 21 dní po rekonstituci v Nutricelu téměř konstantní a všechny případné odchylky nebyly statisticky významné. Navíc rozdíly hodnot ITE% byly mezi skupinami statisticky nevýznamné nezávisle na době skladování po rekonstituci – A: 74,01 ($\pm\text{CI}95\%$: 71,97–76,04), B: 74,02 ($\pm\text{CI}95\%$: 71,18–76,87). Byl pozorován statisticky významný rozdíl ve 24hodinovém přežití EAK (%), stejně jako u FTW% mezi skupinami A-B (tab. 2 a graf 1).

Tab. 1. Rozdělení počtu subjektů do obou skupin a podskupin.

Autologní transfuze	Skupina A	Skupina B
Čas 0 po rekonstituci	23	10
Čas 7 dní po rekonstituci	14	10
Čas 14 dní po rekonstituci	15	10
Čas 21 dní po rekonstituci	13	10
Počet subjektů celkem	65	40

Tab. 2. ITE %, 24hodinové přežívání erythrocytů (%) a FTW % erythrocytů bez ohledu na dobu jejich uchovávání (0–21 dní).

	Skupina A	Skupina B
Index terapeutické účinnosti (ITE %)		
Průměr ($\pm 95\%$ CI)	74,01 (71,97–76,04)	74,02 (71,18–76,87)
P	0,9572	
24hodinové přežívání erythrocytů (%)		
Průměr ($\pm 95\%$ CI)	90,68 (89,03–92,32)	87,05 (84–90,1)
P	0,0219	
Freeze-thaw-wash recovery (FTW %)		
Průměr ($\pm 95\%$ CI)	81,57 (80,01–83,14)	85,11 (83,74–86,47)
P	0,0026	



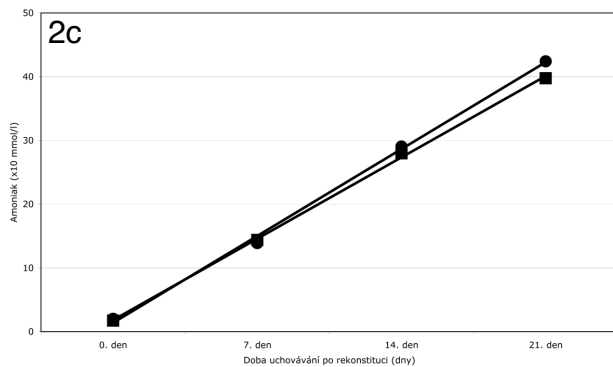
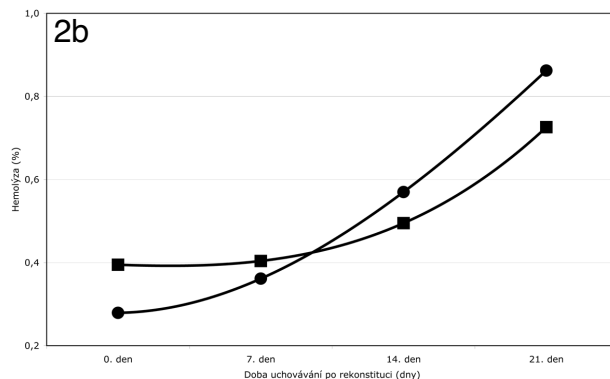
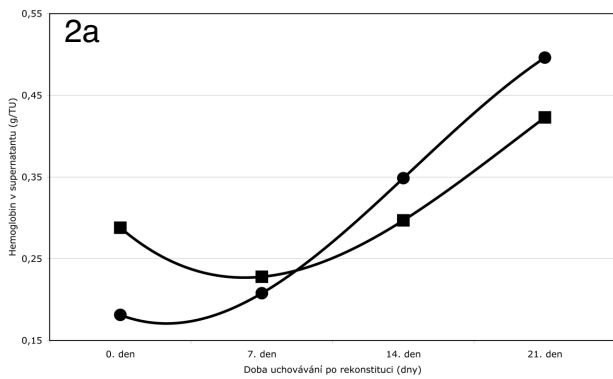
Graf 1. Index terapeutické účinnosti (ITE %), 24hodinové přežívání erythrocytů (%) a Freeze-thaw-wash recovery (FTW %) bez ohledu na délku doby uchovávání po rekonstituci (■ Skupina A; ■ Skupina B).

Tab. 3. Primární i sekundární parametry.

Parametr	Den	Skupina A	Skupina B
Index terapeutické účinnosti (ITE %)	0	74,83 (71,67–78)	77,56 (72,78–82,34)
	7	72,38 (68,02–76,74)	73,17 (68,96–77,37)
	14	77,21 (73,61–80,81)	73,88 (64,07–83,69)
	21	70,59 (64,01–77,18)	71,84 (66,82–76,86)
	P		0,1476*
24hodinové přežívání erytrocytů (%)	0	90,28 (87,30–93,26)	90,38 (85,22–95,53)
	7	90,58 (87,38–93,78)	85,99 (81,62–90,36)
	14	94,16 (92,08–96,23)	85,95 (75,11–96,79)
	21	87,47 (82,37–92,58)	86,21 (81,06–91,36)
	P		0,0605*
Freeze-thaw-wash recovery (FTW %)	0	82,89 (80,80–84,99)	85,99 (83,11–88,86)
	7	79,81 (76,58–83,03)	85,12 (82,35–87,89)
	14	81,97 (78,92–85,01)	85,93 (82,82–89,05)
	21	80,69 (74,9–86,48)	83,38 (79,89–86,87)
	P		0,4992*
Hemoglobin (g/TU)	0	34,36 (33,38–35,34)	38,54 (37,12–39,95)
	7	32,17 (30,99–33,35)	30,96 (29,22–32,70)
	14	32,91 (32,22–33,60)	32,24 (30,88–33,59)
	21	31,38 (29,73–33,02)	31,67 (30,60–32,74)
	P		0,0013*
Hemoglobin v odpadu (g/TU)	0	7,18 (6,16–8,20)	6,38 (4,82–7,93)
	7	8,21 (6,76–9,65)	5,48 (4,23–6,73)
	14	7,37 (5,93–8,81)	5,33 (4,02–6,64)
	21	7,79 (5,02–10,55)	6,43 (4,74–8,12)
	P		0,5742
Hemoglobin v supernatantu (g/TU)	0	0,18 (0,16–0,21)	0,29 (0,25–0,32)
	7	0,21 (0,18–0,23)	0,23 (0,18–0,27)
	14	0,35 (0,20–0,49)	0,30 (0,24–0,35)
	21	0,50 (0,21–0,78)	0,42 (0,36–0,48)
	P		< 0,0001*
Hemolýza (%)	0	0,28 (0,24–0,32)	0,40 (0,35–0,44)
	7	0,36 (0,32–0,41)	0,40 (0,32–0,49)
	14	0,57 (0,33–0,81)	0,50 (0,40–0,59)
	21	0,86 (0,41–1,31)	0,73 (0,62–0,83)
	P		< 0,0001*
Hematokrit (%)	0	0,45 (0,44–0,46)	0,47 (0,47–0,48)
	7	0,44 (0,42–0,45)	0,45 (0,43–0,47)
	14	0,46 (0,44–0,48)	0,46 (0,45–0,48)
	21	0,44 (0,42–0,46)	0,45 (0,44–0,47)
	P		0,1258*
Počet leukocytů (x10 ⁹ /TU)	0	0,044 (0,032–0,055)	0,016 (0,004–0,028)
	7	0,025 (0,017–0,033)	0,004 (–0,002–0,01)
	14	0,031 (0,020–0,043)	0,01 (0,003–0,018)
	21	0,029 (0,012–0,047)	0,012 (0,00–0,024)
	P		0,0945
Extracelulární draslík (mmol/l)	0	1,75 (1,49–2,00)	2,36 (1,93–2,79)
	7	9,86 (8,58–11,15)	9,55 (8,76–10,35)
	14	15,28 (14,03–16,54)	16,52 (14,69–18,34)
	21	16,52 (15,03–18,01)	15,74 (14,7–16,78)
	P		< 0,0001*
Amoniak (mmol/l)	0	20,1 (17,4–22,80)	17,4 (12,7–22,10)
	7	139,0 (119,1–158,9)	143,9 (124,7–163,1)
	14	290,4 (253,4–327,4)	279,8 (247,6–312,0)
	21	424,1 (396,4–451,7)	397,5 (375,3–419,8)
	P		< 0,0001*
pH	0	6,69 (6,67–6,70)	6,74 (6,70–6,77)
	7	6,57 (6,55–6,58)	6,61 (6,57–6,64)
	14	6,51 (6,49–6,54)	6,53 (6,49–6,56)
	21	6,47 (6,45–6,50)	6,50 (6,47–6,53)
	P		< 0,0001*
2,3-DPG (μmol/g Hb)	0	5,5 (4,72–6,29)	6,35 (5,03–7,68)
	7	0,33 (0,14–0,52)	0,28 (0,15–0,42)
	14	0,45 (0,15–0,75)	0,19 (0,1–0,28)
	21	0,43 (0,15–0,71)	0,21 (0,12–0,31)
	P		< 0,0001*
Osmolalita (mOsm/l)	0	291,5 (289,7–293,3)	296,4 (293,7–299,1)
	7	298,4 (296,1–300,7)	300,3 (298,8–301,8)
	14	302,4 (298,8–306,0)	303,5 (302,2–304,8)
	21	303,8 (294,7–312,8)	302,3 (300,6–304,0)
	P		< 0,0001*
Fosfor (mmol/l)	0	10,12 (9,34–10,89)	10,45 (9,78–11,12)
	7	10,73 (10,27–11,2)	11,55 (11,16–11,95)
	14	10,83 (9,97–11,70)	11,43 (11,16–11,70)
	21	11,1 (10,53–11,66)	11,42 (11,16–11,67)
	P		0,0768*
ATP (μmol/g Hb)	0	6,46 (5,19–7,73)	4,84 (3,90–5,78)
	7	7,60 (5,67–9,52)	4,23 (2,56–5,91)
	14	6,84 (5,37–8,31)	4,24 (2,75–5,74)
	21	7,39 (5,28–9,51)	4,68 (3,64–5,72)
	P		0,5973*

*) Kruskal-Wallis test (neparametrická ANOVA)

TU = transfuzní jednotka



Graf 2. Hemoglobin v supernatantu, hemolýza a amoniak v závislosti na době uchování erytrocytů po rekonstrukci (● Skupina A; ■ Skupina B).

Změny průměrných hodnot ITE%, FTW% a 24hodinového přežití EAK (%) v závislosti na době uchování po rekonstrukci, tj. v čase 0–7–14–21 dní, nejsou v jednotlivých skupinách statisticky významné ($p > 0,05$) – tabulka 3.

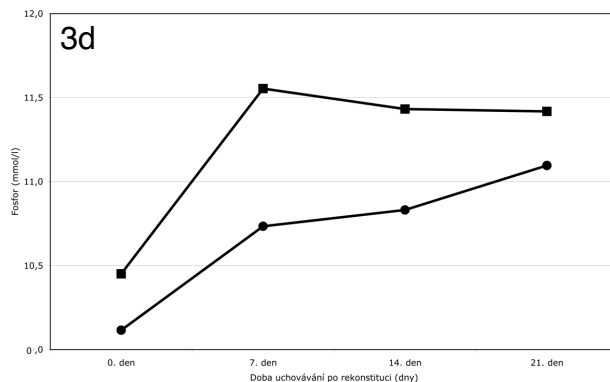
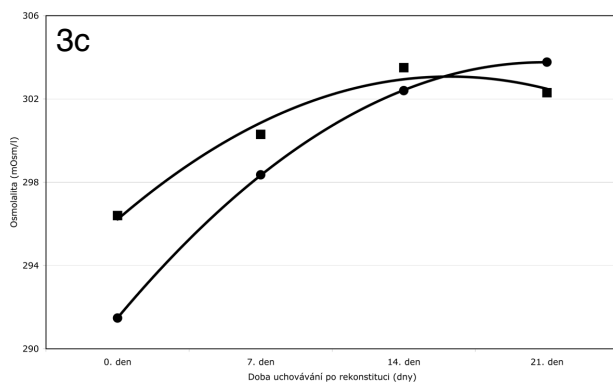
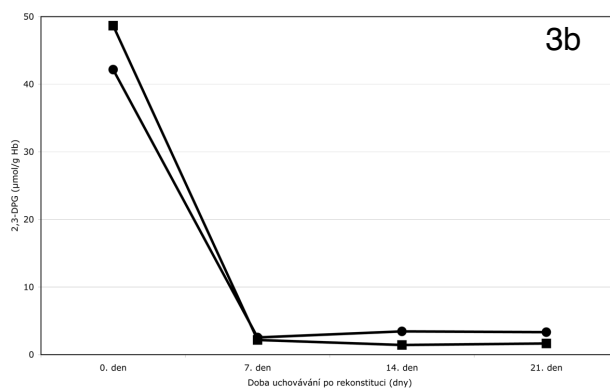
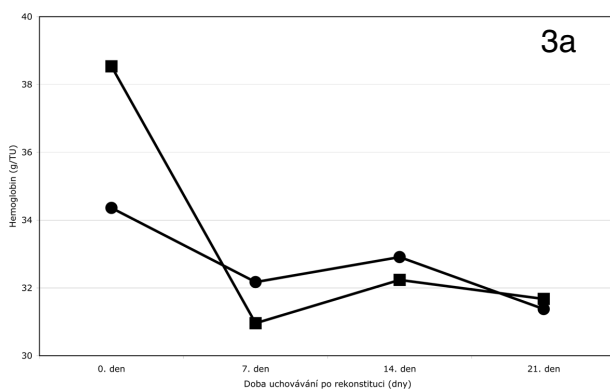
Hodnoty hemoglobinu s časem uchování rekonstituovaných EAK klesají – graf 3. Zatímco tento pokles je

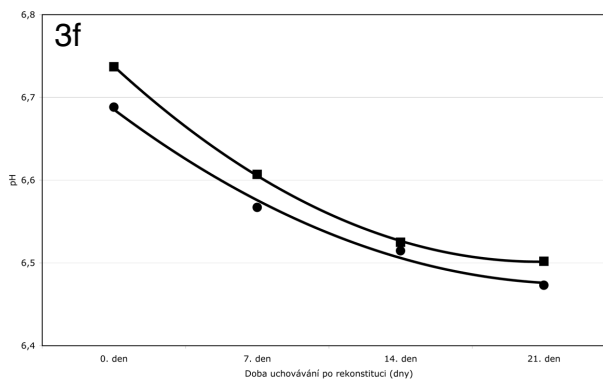
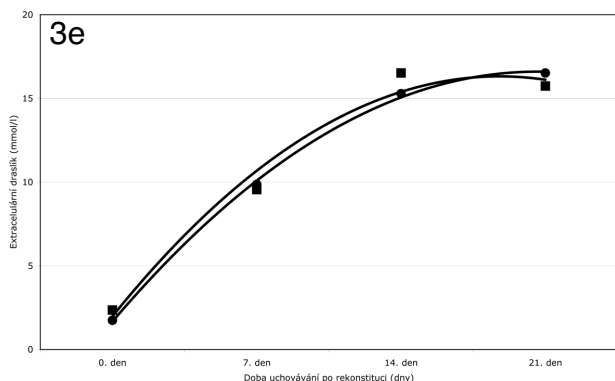
statisticky velmi významný v období 0–7 dní ($p = 0,0022$), následně jsou změny statisticky nevýznamné a hodnoty lze považovat za konstantní ($p > 0,05$). Tento trend lze pozorovat v obou skupinách.

Vzhledem k tomu bylo možné stanovit empirický vztah mezi indexem terapeutické účinnosti (%) a technologickým parametrem hemoglobin v odpadu. Protože nebyla potvrzena statisticky významná závislost rekonstituovaných EAK na změně vaku před zmražením EAK, lze stanovit závislost ITE% na hemoglobinu v odpadu ze všech naměřených hodnot v celém souboru dat.

Statistická analýza pomocí tzv. run testu potvrdila, že odchylky naměřených dat od lineární závislosti jsou statisticky nevýznamné $p = 0,1447$. I když přímka stanovená regresní metodou ne zcela dokonale popisuje tuto závislost, může být dostatečně dobře použita pro odhad indexu terapeutické účinnosti každé transfuzní jednotky rekonstituovaných EAK, neboť hemoglobin v odpadu je snadno stanovitelný u každé jednotky.

Přesnost odhadu se zvýší v případě, že se odhad provede na základě mezních křivek hodnot ITE% ležících





Graf 3. Hemoglobin, 2,3-DPG, osmolalita, fosfor, extracelulární draslík a pH v závislosti na době uchovávání erytrocytů po rekonstituci (● Skupina A; ■ Skupina B).

Tab. 4. Parametry regresní přímky závislosti ITE% na hemoglobinu v odpadu.

Parametr	Hodnota	Standardní chyba	95% limit spolehlivosti	
			Dolní	Horní
Směrnice přímky (a)	-1,697	0,1701	-2,03	-1,364
Průsečík osou Y (b)	86,176	1,323	83,583	88,768
Průsečík osou X				50,78
Korelační koeficient (r)				-0,65
r ²				0,4225
Standardní odchylka S _{y.x}				6,344
Počet měření				138
P (odchylka od linearity)				0,144

v intervalu 95% limitu spolehlivosti v závislosti na hemoglobinu v odpadu. Parametry přímky jsou uvedeny v tabulce 4 a závislost parametru ITE% na hemoglobinu v odpadu je znázorněna v grafu 4.

Množství hemoglobinu stanoveného v rekonstituovaných EAK koresponduje s některými biochemickými parametry a naznačuje ustanovování rovnováhy EAK v rekonstitučních roztocích, ke které dochází během prvních 7 dní (možná i během kratší doby po rekonstituci). Tímto způsobem se chová zejména 2,3-DPG a osmolalita, ovšem trend osmolality je inverzní (viz graf 3).

Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl parametrů ITE% a 24hodinové přežití EAK (%) v závislosti na době uchovávání rekonstituovaných EAK. Změny hodnot hemoglobinu v supernatantu i hemolýzy v závislosti na čase uchovávání jsou proto způsobené rozpadem nevitálních erytrocytů bezprostředně po rekonstituci. Hodnoty hemolýzy a hemoglobinu v supernatantu nekorespondují s účinností vitálních rekonstituovaných erytrocytů během doby uchovávání 0–21 dní po jejich rekonstituci.

Trend časového vývoje hemolýzy a hemoglobinu v supernatantu (v závislosti na době uchovávání po rekonstituci) je rostoucí a vždy v dané skupině shodný pro oba parametry. Po dobu prvních 7 dní se ukazuje, že jsou hodnoty hemolýzy a hemoglobinu v supernatantu téměř konstantní (odchylky nejsou statisticky významné).

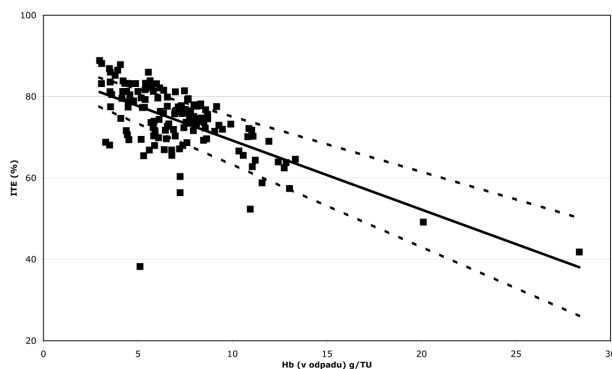
Hematokrit a leukocyty byly na čase uchovávání rekonstituovaných EAK nezávislé, neboť nebyla prokázána jednoznačná statistická významnost odchylek průměru sledovaných parametrů v různých časech uchovávání rekonstruovaných EAK. Detailnějším rozбором byly některé odchylky statisticky významné, ale vzhledem k zazname-

nanému trendu hodnot a směrodatným odchylkám lze tuto významnost přiřadit náhodnému jevu měření.

I když byla zjištěna statistická významnost odchylek průměrných hodnot hematokritu a leukocytů mezi oběma skupinami, lze tuto skutečnost přiřadit k nepárovému měření a podmínkám technologické přípravy rekonstituovaných EAK, neboť průměrné hodnoty se od sebe liší v předpokládaném rozmezí. Vliv změny vaku před zmražením s největší pravděpodobností nesouvisí se změnou hodnot hematokritu nebo leukocytů.

Množství draslíku a amoniaku v rekonstituovaných EAK s dobou uchovávání po rekonstituci rostou, zatímco pH klesá. Časové změny všech tří parametrů byly statisticky až extrémně významné.

Množství draslíku zpočátku roste rychleji a po 7. dni se trend růstu zpomaluje. Naopak hodnoty pH během prvních 7 dní klesají rychle a následně se klesající trend zpomaluje.



Graf 4. Závislost ITE% na hemoglobinu v odpadu po rekonstituci (... ±95%CI, — lineární závislost, ■ naměřené hodnoty).

Tab. 5. Parametry kvality erytrocytů kryokonzervovaných po rekonstituci.

Parametr	Požadavek na kvalitu EAK	Četnost provádění kontrol
Objem	> 200 ml	u všech jednotek
Hemolýza na konci uchovávání	< 1 %	4 jednotky měsíčně
Hemoglobin (supernatant)	< 0,5 g/TU	u všech jednotek
Hematokrit	> 0,4	u všech jednotek
Hemoglobin	> 30 g/TU	u všech jednotek
Hemoglobin v odpadu	< 12 g/TU	u všech jednotek
ITE% (odhad výpočtem)	> 60 %	u všech jednotek
Osmolalita	< 340 mOsm/l	1% všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně
Leukocyty	< 0,1x10 ⁹ buněk/TU	1% všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně
Sterilita	Sterilní	1% všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně

Vývoj množství draslíku a hodnot pH pravděpodobně souvisí s ustálením rovnováhy rekonstituovaných EAK během uchovávání při teplotě 2–6 °C, která se významně ustanovuje během prvních 7 dní.

Množství amoniaku roste s dobou uchovávání v obou skupinách (tj. bez ohledu na výměnu vaku před zmražením). Tento trend růstu odpovídá velmi dobře lineární závislosti (v intervalu 0–21 dní po rekonstituci). Rostoucí přítomnost amoniaku souvisí s největší pravděpodobností s odbouráváním hemoglobinu z původně nevitálních erytrocytů vzniklých po rekonstituci.

Všechny tyto tři biochemické parametry se statisticky mezi oběma skupinami významně nelišily.

Parametr 2,3-DPG statisticky významně klesá během prvních 7 dní a následně je téměř konstantní. Tento trend je stejný pro obě skupiny, tj. bez ohledu na výměnu vaku před zamražením EAK. S největší pravděpodobností se 2,3-difosfoglycerát uvolněný po rekonstituci EAK reverzibilně váže na hemoglobin, což by vysvětlovalo jeho rychlé ubývání.

S ustálenou rovnováhou po rekonstituci souvisí i parametr osmolality. Hodnoty osmolality s časem uchovávání rekonstituovaných EAK pozvolna rostou, přitom nejrychlejší nárůst je pozorován během prvních 7 dní. Tento parametr souvisí s množstvím uvolněného zbytkového glycerolu. To znamená, že postupně dochází k uvolnění glycerolu, který nebyl vymyt během rekonstituce EAK. S největší pravděpodobností může ovlivňovat hodnoty pH i množství draslíku.

Průměrné hodnoty množství fosforu v EAK, rekonstituovaných v Nutricelu, byly ve skupině A časově nezávislé. Vzhledem k tomu, že Nutricel obsahuje fosfátový pufr, šlo jen o statistickou významnost způsobenou měřením, nikoli sledovaným jevem. Navíc hodnoty obou skupin byly v závislosti na čase uchovávání velmi blízké.

Hodnoty ATP se s časem uchovávání rekonstituovaných AEK statisticky nemění a dokonce nebyly zjištěny statisticky významné odchylky mezi oběma skupinami tzn. hodnoty ATP jsou nezávislé na době uchovávání rekonstituovaných EAK (v čase 0–21 dní).

Podobné výsledky vykazují i hodnoty extracelulárního draslíku, jejichž změny v čase byly podstatně výraznější a statisticky významné ($p < 0,01$) během prvních 14 dnů po rekonstituci erytrocytů, ale rozdíl mezi 14. a 21. dnem byly malé a statisticky méně významné ($p > 0,01$).

Všechny jednotky erytrocytů byly po rekonstituci a skladování při 4 ± 2 °C sterilní.

Na základě vyhodnocených výsledků měření lze sestavit parametry a jejich kritéria pro stanovení jakostní kvality transfuzního přípravku EAK rekonstituovaných v Nutricelu. Přehled je uveden v tabulce 5.

Diskuse

Studie hodnotí vlastnosti a klinickou použitelnost kryokonzervovaných erytrocytů zmražených ve 40% glycerolu po jejich rozmražení a rekonstituci na reprezentativním souboru dat získaných z otevřené klinické studie a současného in vitro sledování laboratorních parametrů. Potvrdila se pracovní hypotéza o dobrých vlastnostech erytrocytů získaných dvojitou erythrocytaferézou pro dlouhodobé skladování v hodnoceném resuspenzním roztoku. Jako referenční rekonstituční roztok byl použit rovněž SAG-M (20), který nevykázal dobrou použitelnost erytrocytů 7 dní po rekonstituci (2–6). Vzhledem ke známým limitům tohoto roztoku dále již testován nebyl i přes jeho snadnou dostupnost na trhu. Erytrocyty resuspendované v AS-3 vykazovaly velmi dobré vlastnosti i 21. den skladování a potvrdily tak potenciál tohoto rekonstitučního roztoku (13–16).

Byly porovnány vlastnosti erytrocytů zmražených v primárních vacích a mražených ve speciálních vacích pro kryokonzervaci po předchozím převedení a z hlediska dalšího použití ověřen minimální vliv přepouštění erytrocytů s primárního sběrného vaku do vaku skladovacího.

Při detailním rozboru (nepárový Mann-Whitney test) je pozorována statistická významnost odchylky průměrné hodnoty 24hodinového přežití EAK v Nutricelu po 14 dnech uchovávání vzhledem ke stejné hodnotě bezprostředně po rekonstituci ($p = 0,0316$). Vzhledem k tomu, že se jedná pouze o ojedinělou statistickou významnost, její příčinou může být náhodný jev měření, nikoli skutečná závislost na době uchovávání rekonstituovaných EAK. Celková průměrná hodnota ITE % pro erytrocyty rekonstituované v roztoku AS-3 a skladované při 4 ± 2 °C po dobu až 21 dní byla 74 %, což odpovídá hodnotám z ostatních literárních zdrojů (3, 4, 11, 12). Podobně tomu bylo i u hodnot 24hodinového přežívání značených erytrocytů.

I když průměrné hodnoty ITE% obou skupin se statisticky nelišily ($p = 0,9572$), byl mezi nimi pozorován statisticky významný rozdíl v hodnotách 24hodinové přežití EAK a FTW%. Vzhledem k tomu, že FTW% reprezentuje kvalitu technologie, lze tento rozdíl přiřadit spíše k technologickému postupu než k vitalitě získaných EAK po rekonstituci. 24hodinové přežití EAK rekonstituovaných v Nutricelu, které byly před zmrazením převedeny do jiného vaku, se snížilo o necelé 4 % ($p = 0,0219$, statisticky významná změna), což může být velmi dobře vykompenzováno zvýšením množství EAK v transfuzní jednotce tak, jak ukazují hodnoty v tabulce 2, kde ITE% jsou u obou skupin prakticky shodné.

Parametr FTW% je vypočten z naměřených hodnot hemoglobinu v odpadu. Analýza dat potvrdila téměř dokonalou lineární závislost tohoto parametru na hemoglobinu v odpadu. Obdobnou závislost lze předpokládat u parametru ITE%.

Lineární empirická závislost ITE% na hemoglobinu v odpadu pomáhá odhadnout vitalitu rekonstituovaných erytrocytů v získané transfuzní jednotce zejména jako spodní limit na 95% intervalu spolehlivosti této aproximace. To lze vyjádřit vztahem, který odpovídá podmínkám měření a technologické přípravy na OHBKT ÚVN: $\text{min. ITE}(\%) = -2,03 \times \text{Hb}(\text{odpad}) + 85,583$.

Závislost primární veličiny (ITE%) na vybraných hematologických parametrech (hemoglobin v transfuzní jednotce, hemolýza na konci doby uchovávání, hemoglobin v supernatantu, hematokrit nebo počet leukocytů) nebyla v žádné skupině pozorována. Lze proto předpokládat, že všechny tyto sledované parametry s účinností rekonstituovaných erytrocytů nesouvisí a pravděpodobně popisují procesy závislé na nevitálních erytrocytech po rekonstituci.

Hematologické a biochemické parametry naznačují ustavování rovnováhy EAK po rekonstituci, ke které dochází během prvních 7 dní po rekonstituci. Vzhledem k tomu, že vitalita rekonstituovaných EAK zůstává po rekonstituci během sledovaného období 0–21 dní konstantní, lze se domnívat, že všechny zaznamenané změny u některých vybraných biochemických a hematologických parametrů souvisejí s degradací nevitálních erytrocytů během doby uchovávání. Jedná se o hemolýzu, hemoglobin v supernatantu, hemoglobin v transfuzní jednotce, draslík, amoniak, pH, 2,3-difosfoglycerát a osmolalitu.

Skutečnost, že některé, touto studií stanovené, parametry kvality kryokonzervovaných erytrocytů po rekonstituci se liší od evropských „Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components“ (dále Guide) je dáno omezenými možnostmi tohoto dokumentu, který nemůže zohledňovat všechny specifické vlastnosti speciálních přípravků. Např. hodnota hemoglobinu v supernatantu je dle Guide v den 0, resp. ihned po rekonstituci 0,2 g/TU, ale námi stanovený parametr kvality 0,5 g/TU je konstruován na den 21 po rekonstituci a jeho hodnoty jsou i ve shodě s literárními údaji (3, 4, 8, 10, 12, 17). Obdobný důvod je i při stanovení vyšší tolerance

hemolýzy na konci doby uchovávání, aniž by některý z těchto parametrů měl vliv na klinické vlastnosti a použití přípravku.

Nižší stanovené hodnoty hemoglobinu v TU naopak reflektují metodiku přípravy z dvojité erythrocytaferézy, kdy vzhledem k původnímu záměru mrazení a skladování v primárních odběrových vacích (skupina A) bylo z důvodu objemového limitu vaku zvoleno nižší množství odebírané krve – 200 ml/TU tak, aby ve vaku byl ještě dostatečný prostor pro přidání glycerolu.

Literatura

1. **Hess JR, Thomas MJ.** Blood use in war and disaster: lessons from the past century. *Transfusion* 2003 Nov; 43(11): 1622–33.
2. **Hess JR.** Red cell freezing and its impact on the supply chain. *Transfus Med* 2004 Feb; 14(1): 1–8. Review.
3. **Valeri CR, Ragno G, Pivacek LE, Srey R, Hess JR, Lippert LE, Mettelle F, Fahie R, O'Neill EM, Szymanski IO.** A multicenter study of in vitro and in vivo values in human RBCs frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol and stored after deglycerolization for 15 days at 4 degrees C in AS-3: assessment of RBC processing in the ACP 215. *Transfusion* 2001 Jul; 41(7): 933–9.
4. **Valeri CR, Ragno G, Pivacek L, O'Neill EM.** In vivo survival of apheresis RBCs, frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol, deglycerolized in the ACP 215, and stored at 4 degrees C in AS-3 for up to 21 days. *Transfusion* 2001 Jul; 41(7): 928–32.
5. **Hess JR, Hill HR, Oliver CK, Lippert LE, Greenwalt TJ.** The effect of two additive solutions on the postthaw storage of RBCs. *Transfusion* 2001 Jul; 41(7): 923–7.
6. **Valeri CR, Pivacek LE, Cassidy GP, Ragno G.** Posttransfusion survival (24-hour) and hemolysis of previously frozen, deglycerolized RBCs after storage at 4 degrees C for up to 14 days in sodium chloride alone or sodium chloride supplemented with additive solutions. *Transfusion* 2000 Nov; 40(11): 1337–40.
7. **Fairbanks VF, Klee GG, Wiseman GA, Hoyer JD, Tefferi A, Pettit RM, Silverstein MN.** Measurement of blood volume and red cell mass: re-examination of ^{51}Cr and ^{125}I methods. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22(2): 169–86; discussion 186a–186g. Review.
8. **Lecak J, Scott K, Young C, Hannon J, Acker JP.** Evaluation of red blood cells stored at -80 degrees C in excess of 10 years. *Transfusion* 2004 Sep; 44(9): 1306–13.
9. **Bandarenko N, Hay SN, Holmberg J, Whitley P, Taylor HL, Moroff G, Rose L, Kowalsky R, Brumit M, Rose M, Sawyer S, Johnson A, McNeil D, Popovsky MA.** Extended storage of AS-1 and AS-3 leukoreduced red blood cells for 15 days after deglycerolization and resuspension in AS-3 using an automated closed system. *Transfusion* 2004 Nov; 44(11): 1656–62.
10. **Valeri CR, Srey R, Tilahun D, Ragno G.** The in vitro quality of red blood cells frozen with 40 percent (wt/vol) glycerol at -80 degrees C for 14 years, deglycerolized with the Haemonetics ACP 215, and stored at 4 degrees C in additive solution-1 or additive solution-3 for up to 3 weeks. *Transfusion* 2004 Jul; 44(7): 990–5.
11. **Valeri CR, Pivacek LE, Cassidy GP, Ragno G.** In vitro and in vivo measurements of gamma-radiated, frozen, glycerolized RBCs. *Transfusion*. 2001 Apr; 41(4): 545–9.
12. **Valeri CR, Pivacek LE, Cassidy GP, Ragno G.** In vitro and in vivo measurements of human RBCs frozen with glycerol and subjected to various storage temperatures before deglycerolization and storage at 4 degrees C for 3 days. *Transfusion* 2001 Mar; 41(3): 401–5.
13. **Valeri CR, Pivacek LE, Cassidy GP, Ragno G.** 24-hour ^{51}Cr post-transfusion survival, ^{51}Cr life span and haemolysis of red blood cells stored at 4 degrees C for 56 days in AS-3. *Vox Sang* 2001 Jan; 80(1): 48–50.
14. **Valeri CR, Pivacek LE, Ouellet R, Gray A.** A comparison of methods of determining the 100 percent survival of preserved red cells. *Transfusion* 1984 Mar-Apr; 24(2): 105–8.

15. Valeri CR, Pivacek LE, Cassidy GP, Ragno G. The survival, function, and hemolysis of human RBCs stored at 4 degrees C in additive solution (AS-1, AS-3, or AS-5) for 42 days and then biochemically modified, frozen, thawed, washed, and stored at 4 degrees C in sodium chloride and glucose solution for 24 hours. *Transfusion* 2000 Nov; 40(11): 1341–5.
16. Valeri CR, Pivacek LE, Cassidy GP, Ragno G. Volume of RBCs, 24- and 48-hour posttransfusion survivals, and the lifespan of (51)Cr and biotin-X-N-hydroxysuccinimide (NHS)-labeled autologous baboon RBCs: effect of the anticoagulant and blood pH on (51)Cr and biotin-X-NHS elution in vivo. *Transfusion* 2002 Mar; 42(3): 343–8.
17. Hess JR, Kagen LR, van der Meer PF, Simon T, Cardigan R, Greenwalt TJ, AuBuchon JP, Brand A, Lockwood W, Zanella A, Adamson J, Snyder E, Taylor HL, Moroff G, Hogman C. Interlaboratory comparison of red-cell ATP, 2,3-diphosphoglycerate and haemolysis measurements. *Vox Sang* 2005 Jul; 89(1): 44–8.
18. Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, Truijens-de Lange R, Stekkinger PS, Bakker JC, Lagerberg JW, Brand A, Verhoeven AJ. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. *Transfusion* 2003 Feb; 43(2): 157–64.
19. Grose HL, Byrne KM, Salata JM, Renta FJ, Stroncek DF. In vitro variables of red blood cell components collected by apheresis and frozen 6 and 14 days after collection. *Transfusion* 2006 Jul; 46(7): 1178–83.
20. Nepublikovaná data ze Závěrečné zprávy: „Otevřené klinické hod-

nocení účinnosti erytrocytů z aferézy kryokonzervovaných rekonstituovaných v Nutricelu nebo SAG-M u zdravých dobrovolníků“, 18. 8. 2005.

Grant

Výsledky této práce vychází z projektu výzkumu Ministerstva obrany České republiky, „Kryokonzervace erytrocytů – vybudování banky na dlouhodobou úschovu krve: Strategická krevní banka“, číslo 030121387.

Poděkování

Děkujeme společnosti Vian Praha za technickou podporu provedení studie, zvláštní dík také patří společnosti Haemonetics CZ po vedením MUDr. Heleny Malé, za pomoc a podporu projektu.

pplk. MUDr. M. Bohoněk

Oddělení hematologie, biochemie a krevní transfuze

Ústřední vojenská nemocnice

U vojenské nemocnice 1200

169 02 Praha 9

e-mail: milos.bohonek@uwn.cz

Došlo do redakce: 30. 6. 2006

Přijato: 21. 8. 2006



KAZUISTIKY Z MOLEKULÁRNÍ GENETIKY

Jan Lebl, Milan Macek jr., hlavní autoři a pořadatelé

Obsáhlý soubor 70 kazuistik dětských pacientů s monogenními onemocněními, na němž se podílel více než stočlenný autorský kolektiv odborníků z České republiky i ze zahraničí, obsahuje ty nejzajímavější případy z jejich klinické praxe. Autoři se soustředili jak na nejčastější choroby, tak i na onemocnění vzácná, ale z různých pohledů důležitá (buď z etnického hlediska, nebo z hlediska modelových patogenetických aspektů). Sborník je rozčleněn do 15 okruhů, týkajících se jednotlivých onemocnění (hyperglykémie, malý vzrůst, hemostáza, hypertenze, obezita, bolesti břicha, plicní onemocnění, poruchy sluchu, štítná žláza, nadledviny, lipidy, kriticky nemocný novorozenec, neurogenetická onemocnění, vývojové anomálie, srdeční vady), a doplněn bohatou fotodo-

kumentací. Autoři kazuistik uvedené příběhy se svými pacienty osobně prožili; jsou mezi nimi příběhy smutné i příběhy se šťastným koncem, všechny ale přispěly k poznání a poučení.

Vydal Galén v roce 2006, ISBN 80-7262-418-0, formát 155 x 225 mm, brož., 219 str., cena 190 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz