

Małgorzata Dorman

WPLYW CZASU PRZECHOWYWANIA KONCENTRATU KRwineK CZERWONYCH NA UWALNIANIE MIKROCZĄSTEK ORAZ MORFOLOGIĘ KRwineK CZERWONYCH

Streszczenie

Długie przechowywanie krwinek czerwonych prowadzi do głębokich zmian biochemicznych i morfologicznych w krwinkach czerwony, zwanych „storage lesion”. Opisywane zmiany w krwi budzą dwie poważne obawy, a mianowicie co ze skutecznością i bezpieczeństwem przetoczeń. Wymaga to odpowiedzi na pytania:

- 1) czy przetoczenie krwinek czerwonych o długim okresie przechowywania jest mniej skuteczne w utlenowaniu tkanek i usuwaniu CO₂ niż krwinek świeżych?
- 2) czy przetaczanie krwinek czerwonych o dłuższym czasie przechowywania związane jest z większą liczbą poważniejszych reakcji poprzetoczeniowych?

Częściową odpowiedzią na drugie pytanie były podjęte badania własne. Jedną ze zmian morfologicznych krwinek czerwonych jest uwalnianie mikrocząsteczek z błony komórkowej. Mikrocząsteczki pochodzenia czerwonokrwinkowego mogą odpowiadać za reakcje poprzetoczeniowe, np. TRALI, niosą ze sobą potencjał prozapalny i prokoagulacyjny. Kolejnym problemem związanym z mikrocząsteczkami powstałymi z krwinek czerwonych są zmiany zachodzące w KKCz pod wpływem procedur pobierania krwi, przechowywania, stosowana metod konserwacji, a także rodzajów otrzymanych KKCz. Badania własne są pierwszą próbą oceny zależności stężenia mikrocząsteczek pochodzących z krwinek czerwonych od rodzaju KKCz w czasie ich przechowywania. Z tego też powodu celem badań własnych było:

- 1) porównanie wpływu rodzaju metod otrzymywania koncentratów krwinek czerwonych na uwalnianie mikrocząsteczek;
- 2) ocena wpływu czasu przechowywania krwinek czerwonych na uwalnianie mikrocząsteczek pochodzenia czerwonokrwinkowego;
- 3) ustalenie, czy czas przechowywania koncentratu krwinek czerwonych i ich rodzaj wpływa na morfologię krwinek;

- 4) ocena wpływu czasu przechowywania i rodzaj składnika krwi na potencjał prozapalny przechowywanych krwinek czerwonych.

Badaniem objęto 150 jednostek koncentratów krwinek czerwonych, w tym 50 jednostek KKCz z roztworem wzbogacającym SAGM, 50 jednostek KKCz pozbawionych kożuszka leukocytno-płytkowego z roztworem wzbogacającym SAGM i 50 jednostek ubogoleukocytnego KKCz z roztworem wzbogacającym SAGM. Badania stężenia mikrocząsteczek pochodzenia czerwokrwińkowego (RMPs), morfologię, stężenie cytokin, wykonano w każdej jednostce koncentratu krwinek czerwonych w 2, 20, 36 dniu przechowywania. Badania stężenia mikrocząsteczek wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej. W celu zwiększenia specyficzności metody zastosowano własną modyfikację polegającą na jednoczesnym znakowaniu mikrocząsteczek przy użyciu aneksyny V FITC oraz glikoforyny A. Zastosowanie w badaniach własnych podwójnego znakowania mikrocząsteczek wzmocniło reakcję, znacznie ułatwiło ich poszukiwanie i określenie ich stężenia. Odrębnością badań było porównanie stężenia mikrocząsteczek pochodzenia czerwokrwińkowego w zależności od rodzaju KKCz i czasu ich przechowywania.

Oceniając w badaniach własnych stężenie mikrocząsteczek w zależności od rodzaju koncentratu krwinek czerwonych i czasu przechowywania stwierdzono, że znaczny wzrost stężenia mikrocząsteczek występuje w koncentraty krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym w porównaniu do koncentratu krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym, pozbawionym kożuszka leukocytno-płytkowego lub ubogoleukocytnego koncentratu krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym. Wyniki badań własnych wykazały, że w koncentraty krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym nastąpił istotny statystycznie wzrost ($p < 0,05$) stężenia mikrocząsteczek w 20 dniu przechowywania w porównaniu do 2 dnia. W 36 dniu zmiany były nieznamienne statystycznie.

Wyniki badań własnych stężenia mikrocząsteczek pochodzenia czerwokrwińkowego w koncentracie krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym, pozbawionym kożuszka leukocytno-płytkowego wykazały wysokie stężenie mikrocząsteczek w 2 dniu przechowywania i było to najwyższe stężenie mikrocząsteczek w obserwowanych punktach czasowych, średnia wartość 11,335. W 20 dniu przechowywania obserwowano istotne statystycznie zmiany stężenia mikrocząsteczek w porównaniu z 2 dniem przechowywania ($p_{2-20} = 0,001$) a następnie w 36 dniu stwierdzono ponowny znamienny wzrost stężenia mikrocząsteczek do wartości średniej 8,881 ($p_{20-36} = 0,031$). Wysokie stężenie mikrocząsteczek w pierwszym punkcie czasowym badania, jest prawdopodobnie skutkiem manualnej metody preparatyki tego rodzaju koncentratu krwinek czerwonych. Wymuszony

nacisk na krwinki czerwone, pozwalający wyizolować kożuszek leukocytno-płytkowy mógł spowodować stres prowadzący do znacznego uwalniania mikrocząstek z błony komórkowej krwinek.

Porównując wyniki badań stężenia mikrocząstek w różnym czasie przechowywania ubogoleukocytnego koncentratu krwinek czerwonych nie wykazano istotnie statystycznie różnic. Obserwowano nieznaczny wzrost stężenia mikrocząstek między 20 a 36 dniem przechowywania, wzrost ten był nieznamienisty statystycznie.

W badaniach własnych oceniono stężenie mikrocząstek pochodzenia czerwonekrwinkowego w różnych rodzajach KKCz w zależności od czasu przechowywania. Wyniki wykazały, że po 20 dniu przechowywania wartość średnia stężenia mikrocząstek w koncentracie krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym jest istotnie statystycznie wyższa niż średnia wartość stężenia mikrocząstek w koncentracie krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym, pozbawionym kożuszka leukocytno-płytkowego (28,54 vs 4,54) i średnia wartość stężenia mikrocząstek w UKKCZ (28,54 vs 12,23). Można stwierdzić nieznamienisty statystycznie wzrost mikrocząstek w składnikach krwi o obniżonej liczbie leukocytów i płytek krwi wykazujący nieznaczny trend wzrostowy do ostatniego dnia przechowywania.

Oceniając zmiany morfologiczne w koncentraty krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym w zależności od czasu przechowywania stwierdzono istotny statystycznie wzrost średniej objętości krwinki (MCV) ($p < 0,05$) w kolejnych badanych punktach czasowych. W koncentracie krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym, pozbawionym kożuszka leukocytno-płytkowego obserwowano niewielki wzrost średniej objętości krwinki, ale nie wykazywał on różnic istotnie statystycznych ($p > 0,05$). Oceniając zmiany morfologiczne krwinek czerwonych w ubogoleukocytnym KKCz nie wykazano zmian w wartościach MCV. Powiększenie objętości krwinek czerwonych może świadczyć o zmianie kształtu komórek.

W badaniach własnych oceniając stężenie cytokin: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-13, TNF- α w badanych rodzajach koncentratów krwinek czerwonych w 2, 20 i 36 dniu przechowywania, stwierdzono istotny statystycznie wzrost stężenia cytokiny IL-1 β w koncentracie krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym w 36 dniu przechowywania ($p < 0,05$). Badania własne wykazały istotne statystycznie obniżenie stężenia IL-4 w 20 dniu przechowywania koncentratu krwinek czerwonych z roztworem wzbogacającym a 36 dniu stężenia IL-4 nie wykrywano. W badaniach własnych otrzymano istotny statystycznie wzrost stężenia IL-12p40 w 20 dniu przechowywania koncentratu krwinek czerwonych z roztworem

wzbogającym ze średniej wartości 1,62 do 1,7. W 36 dniu przechowywania wykazano istotny statystycznie wzrost interleukiny do wartości średniej 6,78.

Wyniki badań wykazują wzrost stężenia IL-1 β w koncentracie krwinek czerwonych z roztworem wzbogającym, pozbawionym kożuszka leukocytno-płytkowego w 20 dniu przechowywania do wartości średniej 3,7. Wzrost stężenia IL-1 β utrzymywał się do 36 dnia przechowywania do wartości średniej 6,1 ($p < 0,05$). Wykazano, istotnie statystyczny wzrost stężenia IL-12p40 w 20 dniu przechowywania ($p_{2-20} = 0,033$) w koncentracie krwinek czerwonych z roztworem wzbogającym, pozbawionym kożuszka leukocytno-płytkowego.

Stężenie IL-1 β w badaniach własnych utrzymywało się przez cały czas przechowywania w granicach normy w ubogoleukocytnym KKCz, natomiast w koncentracie krwinek czerwonych z roztworem wzbogającym po 20 dniach przechowywania obserwowano nieznaczny wzrost stężenia badanej cytokiny do wartości 0,31, następnie w 36 dniu wzrost ponad pięciokrotny (1,85; 20-36+0,0001). Stwierdzono, że obniżenie liczby leukocytów w czasie przechowywania KKCz korelowało ze wzrostem stężenia IL-1 β . Nie wykryto natomiast obecności IL-6 i TNF- α w żadnym badanym składniku krwi.

Na podstawie wyników badań sformułowano następujące wnioski:

- 1) zubożenie koncentratów krwinek czerwonych w leukocyty zmniejsza uwalnianie się mikrocząsteczek z krwinek czerwonych, a tym samym może zmniejszyć występowanie niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych. Stężenie mikrocząsteczek pochodzenia czerwonekrwinkowego zależy od metody i rodzaju otrzymywanego koncentratu.
- 2) długi czas przechowywania koncentratu krwinek czerwonych wpływa na zwiększone uwalnianie się mikrocząsteczek z błony komórkowej krwinek czerwonych. Ustalanie profilów przechowywania powinno wprowadzić spersonalizowane leczenie koncentratem krwinek czerwonych.
- 3) czas przechowywania wpływa na zmianę kształtu krwinek czerwonych utrudniając przepływ przez drobne naczynia krwionośne;
- 4) przechowywanie koncentratu krwinek czerwonych może powodować wzrost aktywności prozapalnej przetaczanych koncentratów krwinek czerwonych.

Summary

"THE INFLUENCE OF STORAGE TIME OF RED BLOOD CELLS TO THE RELEASE OF RED BLOOD CELL-DERIVED MICROPARTICLES AND THE BLOOD CELL COUNT"

Elongated repository of red blood cells leads to severe biochemical and morphological changes within red blood cells called "storage lesion". The described changes in the blood raise two serious concerns about the efficacy and safety of transfusions. This requires answering the following questions:

- 1) is KKCz transfusion with a long shelf life less effective in oxygenating tissues and removing CO₂ than fresh blood cells?
- 2) is transfusion of KKCz with a longer storage period associated with a larger number of more serious post-transfusion reactions?

The second question was partially answered in own research. One of the morphological changes of red blood cells is the release of microparticles from the cell membrane. Red blood cell microparticles may be responsible for post-transfusion reactions, e.g. TRALI, carry pro-inflammatory and pro-coagulant potential. Another problem, associated with microparticles which come from red blood cells, are changes occurring in KKCz under the influence of blood withdrawal procedures, storage, used maintenance methods, as well as types of KKCz obtained. Own research is the first attempt to assess the dependence of the concentration of microparticles derived from red blood cells on the type of red blood cells concentrates in the time of their storage. For this reason, the purpose of own research was:

- 1) to compare the impact of the type of methods of obtaining red blood cell concentrates on the release of microparticles;
- 2) to assess the influence of the storage time of red blood cells on the release of microparticles of erythroid flora;
- 3) to determine whether the storage time of the red blood cell concentrate and their type influences the blood cell count;
- 4) to assessment of the influence of storage time and the type of blood component on the pro-inflammatory potential of stored red blood cells.

The study involved 150 units of red blood cell concentrates, including 50 KKCz units with SAGM enriching solution, 50 KKCz units lacking buffy coat and SAGM enrichment

solution and 50 KKCz lean monocyte units with SAGM enriching solution. Tests: red blood cell microparticles (RMPs), morphology, and cytokine concentration were performed in each unit of red blood cell concentrate on the 2nd, the 20th and the 36th day of storage. Examination of microparticles concentration was performed by means of flow cytometry. In order to increase the specificity of the method, our own modification based on the unambiguous marking of microparticles using Annexin V FITC and glycoforine A was used. The use of double labelling of microparticles in own studies strengthened the reaction and significantly facilitated their search and determination of their concentration. A separate study was carried to compare the concentration of red blood cell microparticles depending on the type of KKCz and their storage time.

Assessing the concentration of microparticles in own studies depending on the type of red blood cell concentrate and storage time, it was found that a significant increase in the concentration of microparticles occurs in concentrates of red blood cells with enriching solution, as compared to concentrated red blood cells with enrichment solution devoid of buffy-leukocyte plaque or poorly concentrated concentrate of red blood cells with enriching solution. The research results showed that in red blood cell concentrates with enriching solution there was a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the concentration of microparticles on day 20 of storage, as compared to day 2. On day 36, the changes were statistically insignificant.

The results of own studies on the concentration of red blood cell microparticles in red blood cell concentration with enriching solution, devoid of buffy coat, showed high concentration of microparticles on day 2 of storage, and it was the highest concentration of microparticles at observed time points, mean value of 11,335. On the 20th day of storage, statistically significant changes in the concentration of microparticles were observed compared to the 2nd storage day ($p_{2-20} = 0.001$), and then on the 36th day there was a significant increase in the concentration of microparticles to the average value of 8.881 ($p_{20-36} = 0.031$). The high concentration of microparticles in the first time point of the study may be the result of a manual method of preparation of this type of red blood cell concentrate: forced pressure on the red blood cells to isolate the leucocytic plaque coat could cause stress leading to a significant release of microparticles from the cell membrane of the blood cells.

When comparing the results of the microparticle concentration measurements at different time of storage of the poor blood cells of the red blood cell concentrate, no statistically significant differences were found. There was a slight increase in the concentration of microparticles between the 20th and 36th day of storage, however, this increase was statistically insignificant.

In own study, the concentration of red blood cell microparticles in different types of KKCz was evaluated depending on the time of storage. The results showed that after the 20th day of storage the mean concentration of microparticles in the red blood cell concentration with enriching solution is statistically significantly higher than the mean value of the concentration of microparticles in the red blood cell concentration with enriching solution, devoid of buffy coat (28.54 vs 4.54) and the average value of the concentration of microparticles UKKCZ (28.54 vs. 12.23). One may conclude that there is a statistically insignificant increase in microparticles in blood components with a reduced number of leukocytes and platelets showing a slight upward trend up to the last day of storage.

When assessing morphological changes in concentrates of red blood cells with enriching solution depending on the time of storage, a statistically significant increase in mean blood volume (MCV) was found ($p < 0.05$) at subsequent time points. In the red blood cell concentrate with enrichment solution lacking buffy-leukocyte plaque, a slight increase in mean blood volume was observed, but it did not show statistically significant differences ($p > 0.05$). When evaluating morphological changes of red blood cells in the KKCz poor blood cells, no changes in MCV values were observed. Enlarging the volume of red blood cells may indicate a change in the cell shape.

In own studies, the cytokines concentration: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-13, TNF- α in the examined types of concentrates of red blood cells at 2, 20 and on the 36th day of storage, a statistically significant increase in the concentration of IL-1 β cytokine in the red blood cell concentration with the enriching solution was observed on the 36th day of storage ($p < 0.05$). Own studies showed a statistically significant decrease in IL-4 concentration on the 20th day of storing red blood cell concentrate with enriching solution, and on the 36th day of IL-4 concentration was not detected. In the study, a statistically significant increase in IL-12p40 concentration was obtained on day 20 of storing red cell concentrate with enriching solution with mean values of 1.62 to 1.7. On the 36th day of storage, a statistically significant increase in interleukin up to an average of 6.78 was demonstrated.

The results show an increase in the concentration of IL-1 β in the red blood cell concentration with an enriching solution, devoid of buffy coat on the day of storage to the average value of 3.7. The increase in IL-1 β concentration was maintained until the 36th day of storage to an average value of 6.1 ($p < 0.05$). A statistically significant increase in IL-12p40 concentration was observed on the 20th day of storage ($p_{2-20} = 0.033$) in the red blood cell concentrate with an enriching solution, devoid of buffy-leukocyte plaque.

The concentration of IL-1 β in own studies was maintained within the norm throughout the storage in the ubiquitocyte of KKCz, whereas in the red blood cell concentrate with the enriching solution after 20 days of storage, a slight increase in the concentration of the test cytokine to 0.31 was observed and then on day 36 a rise over fivefold (1.85; 20-36 + 0.0001). A reduction in the number of leukocytes during storage of KKCz was found to correlate with an increase in IL-1 β concentration. However, no presence of IL-6 and TNF- α was detected in any blood component tested.

Based on the results of the research, the following conclusions were formulated:

- 1) depletion of red blood cell concentrates into leukocytes reduces the release of microparticles from red blood cells, and thus may reduce the occurrence of undesired post-transfusion reactions. The concentration of red blood cell microparticles depends on the method and type of concentrate obtained;
- 2) long storage time of the red blood cell concentrate affects the increased release of microparticles from the red cell membrane. Determining the storage profiles should introduce personalized treatment with a red blood cell concentrate;
- 3) storage time affects the change in the shape of red blood cells, making it difficult to flow through small blood vessels;
- 4) storage of the concentrate of red blood cells may increase the pro-inflammatory activity of the transfused concentrates of red blood cells.