

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

**KRYKONZERVACE ERYTCYTŮ A JEJÍ VYUŽITÍ V CIVILNÍM A
VOJENSKÉM ZDRAVOTNICTVÍ**

Bakalářská práce



Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Vít Řeháček

Hradec Králové 2013

Eliška Sládková

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu bakalářské práce MUDr. Vítu Řeháčkovi a svému konzultantovi pplk. MUDr. Miloši Bohoňkovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Dále děkuji kolegyni Věře Staropražské za praktické rady.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 30.4.2013

.....

ZADÁNÍ PRÁCE - CÍL PRÁCE

Cílem této práce je podat ucelený pohled na problematiku kryokonzervace erytrocytů a prezentovat výsledky měření kontrolních parametrů u těchto transfuzních přípravků. Dále je cílem popsat celý proces výroby tak, jak je zaveden na Oddělení hematologie, biochemie a krevní transfuze při Ústřední vojenské nemocnici - Vojenské fakultní nemocnici Praha.

ANOTACE

Téma mé bakalářské práce je Kryokonzervace erytrocytů a její využití v civilním a vojenském zdravotnictví. Tato práce se skládá z části teoretické a části praktické.

První část práce přibližuje základy kryobiologie, druhy kryoprotektiv a vlastní kryokonzervací erytrocytů. Práce popisuje jednotlivé kroky procesu vedoucímu až k finálnímu transfuznímu přípravku, tzn. druhy odběrů krve, její zpracování před glycerolizací, vlastní glycerolizace a mrazení. Dále je popsána problematika skladování zmrazených transfuzních přípravků a jejich rozmrazení a deglycerolizace.

Druhá část práce, která je praktická, se zabývá kontrolou kvality kryokonzervovaných erytrocytů. Popisuje jednotlivé parametry kvality a seznamuje s naměřenými výsledky jednotlivých parametrů.

ANNOTATION

The theme of my final paper is Cryoconservation of erythrocytes and its use in civilian and military healthcare. This work consist of theoretical part and practical part.

The first part of the thesis introduces cryobiology basics, types of cryoprotectants and the cryopreservation of erythrocytes itself. The thesis describes individual procedural steps leading to the final transfusion product, i.e. methods of blood collection, blood's pre-glycerolisation processing, glycerolisation itself and freezing. Furthermore, it describes issues associated with storage of frozen blood products, as well as with their thawing and deglycerolisation.

The second part, which is practical, deals with quality control of cryopreserved erythrocytes. It describes various quality parameters and acquaints readers with the results of such measured parameters.

Obsah

ZADÁNÍ PRÁCE - CÍL PRÁCE	4
1 Úvod.....	8
2 Základy kryobiologie	10
2.1 Kryoprotektiva	11
2.1.1 Intracelulární (penetrující) kryoprotektiva.....	11
2.1.2 Extracelulární (nepenetrující) kryoprotektiva.....	12
3 Kryokonzervace erytrocytů	13
4 Metodika kryokonzervace erytrocytů v ČR – ÚVN Praha	15
4.1 Získávání erytrocytů ke kryokonzervaci	15
4.1.1 Získávání erytrocytů ke kryokonzervaci z plné krve.....	16
4.1.2 Získávání erytrocytů ke kryokonzervaci dvojitou erythrocytaferézou	17
4.2 Příprava krve před kryokonzervací	19
4.2.1 Příprava erytrocytů resuspendovaných de leukotizovaných (ERD) z plné krve pro kryokonzervaci	19
4.2.2 Příprava erytrocytů ke kryokonzervaci získaných dvojitou erythrocytaferézou	20
4.2.3 Příprava ERD ke kryokonzervaci z externího pracoviště	21
4.3 Vlastní kryokonzervace.....	21
4.4 Rekonstituce.....	24
5 Kontrola kvality	28
5.1 Parametry kontroly kvality.....	28
5.1.1 Standardní parametry kvality	28
5.1.2 Parametry kvality používané při validačních studiích.....	31
5.2 Metodika vzorkování.....	32
5.2.1 Získávání vzorků pro kontrolu kvality.....	32
5.2.2 Metody měření jednotlivých parametrů.....	32
5.2.2.1 Sterilita	33
5.2.2.2 Infekční markery.....	34
5.2.2.3 Objem transfuzního přípravku	35
5.2.2.4 Hemoglobin ve finálním transfuzním přípravku	35
5.2.2.5 Hemoglobin v odpadu.....	35

5.2.2.6 Hemoglobin v supernatantu.....	36
5.2.2.7 Hematokrit.....	36
5.2.2.8 Reziduální leukocyty.....	36
5.2.2.9 Hmotnost odpadu.....	37
5.2.2.10 Osmolarita.....	37
5.2.2.11 Hemolýza na konci doby použitelnosti.....	37
6 Výsledky.....	39
6.1 Objem transfuzního přípravku.....	39
6.2 Hemoglobin ve finálním transfuzním přípravku.....	40
6.3 Hemoglobin v odpadu.....	41
6.4 Hemoglobin v supernatantu.....	42
6.5 Hematokrit.....	43
6.6 Reziduální leukocyty.....	44
6.7 Hmotnost odpadu.....	45
6.8 Osmolarita.....	46
6.9 Hemolýza na konci doby použitelnosti.....	47
6.10 Zhodnocení výsledků.....	48
7 Závěr.....	50
8 Seznam zkratk.....	51
9 Seznam vyobrazení.....	53
9.1 Seznam obrázků.....	53
9.2 Seznam tabulek.....	53
9.3 Seznam grafů.....	54
10 Seznam použité literatury.....	55

1 Úvod

Krev je biologický materiál, který vyžaduje speciální podmínky při zpracování, uchování a transportu. Z toho vyplývá i omezená doba použitelnosti, zejména u nativních buněčných přípravků. U erytrocytových přípravků je doba použitelnosti 42 dní (při skladovací teplotě 2 až 6 °C), u trombocytů pouze 5 dní (při skladovací teplotě 20 až 24 °C) (12).

Omezená doba použitelnosti standardně vyráběných transfuzních přípravků neumožňuje vytvářet jejich dostatečné zásoby pro nečekané události krizového charakteru, protože by mnoho přípravků zbytečně exspirovalo a zvyšovaly by se náklady transfuzních oddělení. Stejně tak běžné postupy výroby neumožňují dlouhodobé skladování transfuzních přípravků vzácných skupin a autologních odběrů.

Jsou situace, kdy je potřeba v jednom okamžiku a na jednom místě velké množství transfuzních přípravků, navíc univerzálního použití (univerzálních krevních skupin). Takovými situacemi jsou hlavně hromadná neštěstí, válečné konflikty či teroristické útoky (9, 24, 25). Řešení těchto situací je v dnešní době čím dál naléhavější. Při těchto situacích velmi často standardní zásoby krevních bank nestačí a dochází k akutnímu nedostatku krve, především skupiny 0 RhD pozitivní a 0 RhD negativní.

Jeden ze způsobů, který tyto problémy řeší, je kryokonzervace erytrocytů, umožňující uchovávat erytrocyty v hlubokém zmrazení po dobu až třiceti let, s možností následné rekonstituce (55).

V České republice až do nedávna nebylo žádné pracoviště, které by se kryokonzervací erytrocytů zabývalo. To se změnilo v roce 2003, kdy byl v Ústřední vojenské nemocnici v Praze, ve spolupráci s Ministerstvem obrany, zahájen projekt na vybudování „strategické krevní banky“.

Projekt probíhal v letech 2003 až 2005 s cílem vyvinout a validovat metodu mrazení a následné rekonstituce erytrocytů s co nejdelší dobou expirace po rozmrazení (16).

Do té doby bylo běžné, že doba použitelnosti rekonstituovaných erytrocytů byla 24 hodin, maximálně 1 až 2 týdny (24, 26). V ÚVN Praha se podařilo v rámci tohoto výzkumného projektu dobu použitelnosti rekonstituovaných erytrocytů prodloužit na 3 týdny. Byly vypracovány standardní operační postupy, proběhlo in vitro testování vybraných laboratorních parametrů, dále proběhlo klinické hodnocení, které ověřilo

terapeutickou účinnost kryokonzervovaných erytrocytů a začalo postupné naplňování krevní banky, ve které se počítá s uskladněním až 3000 transfuzních jednotek.

Tato krevní banka není určena jen pro vojenské účely, či pro hromadná neštěstí. Kryokonzervované erytrocyty řeší i problémy mírové medicíny. V krevní bance se uchovávají autologní odběry pacientů se vzácnými aloprotilátkami proti erytrocytům, které znemožňují použití běžného transfuzního přípravku. V bance se dále uchovávají dárcovské erytrocyty pro pacienty s antigeny s nízkou frekvencí výskytu, u nichž je zvýšené riziko tvorby protilátek. Krevní banka spolupracuje se zahraničními pracovišti a v případě potřeby zajišťuje výměnu kryokonzervovaných erytrocytů mezi Českou republikou a zbytkem světa.

2 Základy kryobiologie

Kryobiologie se zabývá studiem působení nízkých teplot a mrazu na buňky a tkáň. Tento vědní obor studuje chování živých systémů při jakékoli teplotě nižší než je základní fyziologické rozmezí, jako je například podchlazení organismu a přírodní hibernace. Kryobiologie stojí na rozhraní mezi fyzikou a biologií.

Za miliony let vývoje se organismy přizpůsobily odolávat stresu z nízkých teplot. Pochopení toho, jak se příroda vyrovnala s principy fyziky a biologie je velmi zajímavé. Příkladem takového přizpůsobení jsou stromy, jejichž větve mohou po vhodné aklimatizaci přežít přímé ponoření do tekutého dusíku (1).

Dalším příkladem přizpůsobení se nízkým teplotám jsou žáby, některé želvy, hadi a mloci. Tito živočichové našli způsob, jak přežít v relativně nízkých teplotách pod bodem mrazu (cca $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$) a za několik týdnů po rozmrazení se spontánně zotavit (2). Ukazuje se, že klíčem k úspěchu těchto živočichů je tvorba přírodních kryoprotektivních látek, především glycerolu a glukózy, a schopnost kontrolovat ukládání ledových krystalků mimo důležité orgány (3). Některé rostliny také dokáží řídit ukládání krystalků ledu pomocí bariér a tím ochránit citlivé oblasti primárního dělivého pletiva (tzv. apikální meristémy). Při poklesu teploty k bodu mrazu dojde k přesunu vody z meristém a vzniklé ledové krystaly tyto pro rostlinu životně důležité oblasti nepoškodí. Rostlinné meristémy přežijí dehydrataci a tím i období mrazu.

Studiem těchto přírodních mechanismů se člověk snaží rozvíjet další odvětví kryobiologie, které by bylo prospěšná i pro něj. Jedním z nich je kryochirurgie. I když předmětem tohoto oboru je buňky usmrcovat a ne je zachovávat. Kryochirurgie používá zmrazení ke zničení tkání, zejména maligní tkáň, a zároveň minimalizuje poškození okolní zdravé tkáň. Kryochirurgie se běžně používá pro léčbu kožních nádorů, ale stále častěji se využívá i k léčbě rakoviny jater, prostaty a prsu (52).

Dalším významným podoborem kryobiologie je kryokonzervace buněk a tkání. Dnes je to běžně užívaná metoda pro dlouhodobé uchovávání kostní dřeně a kmenových buněk pro účely transplantace po ablativní terapii při léčbě leukemií a jiných malignit. Dále se využívá k uchovávání reprodukční tkáň ohrožených druhů živočichů a rostlin k zachování biologické rozmanitosti. Hojně se využívá i k dlouhodobému uchovávání lidských spermií a embryí k in vitro fertilizaci (IVF) (6).

2.1 Kryoprotektiva

Zásadní problematikou, kterou kryokonzervace tkání řeší, je ochrana buněk před poškozením mrazem. Tento problém řeší přidání tzv. kryoprotektivních látek neboli kryoprotektiv. Použití kryoprotektivních látek však vyžaduje opatrný přístup a monitorování osmotického procesu ve tkáni, aby nedošlo k nevratnému poškození buněk (4, 27, 28). Úspěšný proces zmrazení a rozmrazení zaručuje zachování integrity buněčné struktury i jejích funkčních parametrů. Největším problémem je udržování optimálního osmotického tlaku a dále je důležité se vyhnout vzniku krystalků intracelulárního ledu, který způsobuje mechanické poškození buněčných struktur. Kryoprotektivní látky jsou podle svého mechanismu účinku rozděleny na intracelulární a extracelulární:

2.1.1 Intracelulární (penetrující) kryoprotektiva

Tyto látky díky své relativně jednoduché chemické struktuře pronikají buněčnou membránou a v nízké koncentraci nejsou pro buňky toxické. Mezi intracelulární kryoprotektiva patří zejména glycerol, dimethylsulfoxid (DMSO) a různé glykoly, jako je ethanol, propylenglykol, methanol, 1,2-propandiol, acetamid, formamid a další. Jejich molekulová hmotnost je poměrně nízká (MW je nižší než 100). Způsob působení kryoprotektiv je komplexní. Vážou vodu a tím redukuje toxické vlivy vysokých koncentrací dalších sloučenin. Kromě toho ochraňují buňky během pomalého ochlazování, kdy jsou buňky velmi dehydratované a jsou obklopeny koncentrovanými solemi. Ve vysokých koncentracích kryoprotektiva minimalizují poškození způsobené vznikem ledových krystalů, jelikož nutí vodu, aby mrzla nikoli ve formě krystalů, ale ve formě nekrystalické. Pro procesy pomalého ochlazování se používají koncentrace kryoprotektiv okolo 1,5 M. Kryoprotektiva vstupují do buňky osmózou. Jestliže buňky umístíme do roztoku kryoprotektiva, buňka se smrští, protože nejprve voda rychle unikající z buněk ředí koncentraci této látky v extracelulárním prostoru. Ale brzy dojde k ustavení rovnováhy a buňkám se vrátí jejich původní velikost (5, 29).

Glycerol: Kryoprotektivní účinek glycerolu, nízkomolekulárního neelektrolytu, byl popsán poprvé na spermích (6). Jeho kryoprotektivní efekt spočívá v průniku buněčnou membránou do buňky a vytvoření hyperosmolárního prostředí. Hojně se využíval ke kryokonzervaci buněk savců, embryí a neoplodněných myších a lidských

vajíček. Nyní se nejčastěji používá ke kryokonzervaci erytrocytů. Glycerol se používá nejčastěji v koncentraci 1,0 - 2,0 M, tedy 20 až 40 %.

Dymethylsulfoxid (DMSO): je stejně jako glycerol neelektrolyt s nízkou molekulární hmotností. Proto má podobný kryoprotektivní efekt jako glycerol. Vzniká u něj ale rychlejší nástup toxických účinků než u glycerolu a to už v koncentraci 1,0 M (29).

Propylenglykol (PROH): Kryoprotektivní účinek propylenglykolu jako první popsal Polge (6). Jeho kryoprotektivní účinky jsou dány zcela amorfním stavem ve vodném roztoku. Dále vyniká svou stabilitou v teplotách pod bodem mrazu. Tato vlastnost omezuje tvorbu ledových krystalků při zmrazování a rozmrazování. Propylenglykol se často používá v kombinaci s jinými látkami s cílem snížit toxické a osmotické poškození buněk.

2.1.2 Extracelulární (nepenetrující) kryoprotektiva

Tyto látky díky své relativně velké molekulové hmotnosti nemohou projít do intracelulárního prostoru buňky. Nejčastěji se používají pro rychlé a ultrarychlé mrazení. Mezi extracelulární kryoprotektiva patří zejména: monosacharidy (glukóza, hexóza), disacharidy (sacharóza, trehalóza), trisacharidy (rafinóza), polymery (polyvinylpyrrolidon, polyethylenglykol) a další makromolekulární látky, jako dextran, modifikovaná želatina, albumin a hydroxyethyl škrob (29).

Extracelulární kryoprotektiva se využívají převážně pro rychlé zmrazení, při kterém je zabráněno tvorbě ledových krystalů v buňce, tento proces se nazývá vitrifikace. Voda v buňce tuhne do tzv. sklovitého amorfního tvaru. Extracelulární hypertonicita na základě změny osmotických poměrů odstraňuje vodu z pomaleji mrznoucích intracelulárních prostorů a následné snížení osmotických rozdílů nepoškozuje buněčnou membránu (29).

3 Kryokonzervace erytrocytů

Erytrocyt je flexibilní bikonkávní disk, jehož průměr je 6,7 - 7,7 μm . Jeho hlavní funkcí je přenášet kyslík z plic do tkání a oxid uhličitý z tkání do plic pomocí hemoglobinu. Za dobu svého života, který je 120 dní, erytrocyt urazí vzdálenost asi 483 km. Jelikož je střední průměr kapilár zhruba 3 μm , je důležité, aby si erytrocyt udržel vysoký stupeň flexibility, pro kterou potřebuje energii ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Energie je generována anaerobní glykolytickou cestou (8, 30).

Životnost erytrocytů v moderním resuspenzním roztoku při optimálních skladovacích podmínkách, tedy 2 až 6 $^{\circ}\text{C}$, je maximálně 49 dní v závislosti na typu použitého resuspenzního roztoku. Existují případy, u kterých by bylo výhodné skladovat erytrocytové přípravky po delší dobu. Mezi ně patří zejména dlouhodobé uchovávání autologních odběrů pro pacienty se vzácnými protilátkami, skladování transfuzních přípravků pro případ hromadného neštěstí či přírodních katastrof a v neposlední řadě vybudování strategické zásoby erytrocytových přípravků pro vojenské účely (31).

Jakákoli nová metoda, snažící se o prodloužení expirace erytrocytových přípravků, musí být natolik šetrná, aby byly všechny funkce erytrocytů neporušené. Jedním ze způsobů, který je již po delší dobu ve středu pozornosti, je kryokonzervace erytrocytů.

Pokusy o vyvinutí metody pro kryokonzervaci erytrocytů sahají již do 40. let 20. století, kdy se hledaly vhodné kryoprotektivní látky, jak extracelulární tak intracelulární. U kryoprotektivních látek se posuzoval poměr erytrocytů a kryoprotektivní látky, rychlost zmrazování a rozmrazování transfuzního přípravku (6).

Velké množství kryoprotektivních látek bylo zavrhnuto jako neefektivní pro svou toxicitu. Jako nejefektivnější se z intracelulárních kryoprotektiv osvědčil glycerol, který se hojně využívá dodnes (27, 32, 33). V 60. letech 20. století se pozornost přesunula k extracelulárním kryoprotektivům, zejména k dextranům o různé molekulární hmotnosti a k polyvinylpyrrolidonu (PVP). V roce 1967 se Knorpp věnoval dalšímu z extracelulárních kryoprotektiv, hydroxyethyl škrobu (HES), který se ukázal jako vhodná protektivní látka. Takto kryokonzervované erytrocyty byly mrazeny v tekutém dusíku a následně uchovávány v dusíkových parách (7). Výhodou je bio-kompatibilita HES, která dovoluje podat erytrocyty bez složitého procesu vymývání kryoprotektiva. Nevýhodou této metody se ukázala obtížná manipulace s takto uchovanými erytrocyty. Jedním z hlavních problémů při kryokonzervaci za použití HES byly požadavky na

velmi rychlé zmrazení a rozmrazení, aby se zabránilo velkému poškození buněk (8). Se snižováním rychlosti zmrazování a rozmrazování stoupá i množství poškozených erytrocytů. Transfuzní přípravek pak měl nevyhovující parametry kvality a nemohl být použit pro transfuzní účely. Tyto problémy byly odstraněny v roce 1990, kdy byla vyvinuta vhodná metoda. Všechny transfuzní jednotky z běžného dárcovství kryokonzervované a následně rekonstituované touto metodou obsahovaly 99% neporušených buněk (7).

V současné době se používají tři hlavní metody kryokonzervace erytrocytů pomocí intracelulárního kryoprotektiva glycerolu. Hugginsova metoda používá intracelulární glycerol v neionogenní suspenzi, tj. v suspenzi molekul, které neobsahují náboj a ve vodném prostředí neionizují. Další metodou využívající glycerol jako kryoprotektivum je metoda, kterou v roce 1958 poprvé popsal Tullis (54). Tato metoda využívá tzv. vysoký glycerol (40%) v kombinaci s pomalým neřízeným mrazením při. Následně jsou erytrocyty skladovány při teplotě $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nižší. Tato metoda byla nejprve rozšířena zejména ve Spojených státech amerických (8), nyní je nejběžnější metodou v celosvětovém měřítku. Třetí metoda, kterou poprvé popsal Pert a spol. v roce 1963, využívá nízký glycerol a rychlé zmrazení v tekutém dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následné skladování v dusíkových parách při $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ (53). Výhodou je nižší koncentrace glycerolu a s tím spojené jeho snadnější vymývání. Tato metoda byla určitou dobu nejpoužívanější hlavně v Evropě (32, 36).

4 Metodika kryokonzervace erytrocytů v ČR – ÚVN Praha

Na základě zahraničních zkušeností a studie, která probíhala na Oddělení hematologie, biochemie a krevní transfuze (OHBKT) Ústřední vojenské nemocnice Praha v letech 2003 až 2005, byla vypracována metodika výroby kryokonzervovaných erytrocytů.

Metodika zahrnuje odběr erytrocytů a jejich přípravu před kryokonzervací, tj. jejich glycerolizaci, zmrazování, dlouhodobé uchovávání a následnou rekonstituci po rozmrazení (16).

Pro odběr erytrocytů se používají dvě metody. Odběr dvojitou erythrocytaferézou kdy se získají EAD (Erythrocyty z aferézy deleukotizované) a odběr plné krve s následnou deleukotizací - ERD (Erythrocyty resuspendované deleukotizované) (16).

Takto získané erythrocyty se následně převedou do speciálních vaků pro hluboké zmrazení. K erythrocytům se přidá 40% glycerol. Proces glycerolizace je prováděn na promývacím separátoru Haemonetics ACP215. Po glycerolizaci se vaky s erythrocyty okamžitě vkládají do hlubokomrazících boxů (Jouan VX-80) při teplotě -80 °C. V této teplotě musí být nejméně po dobu 24 hodin. Poté jsou dlouhodobě skladovány při teplotě -65 °C a nižší (16).

Následná rekonstituce pomocí roztoku AS-3 (Nutricel) je prováděna taktéž na separátoru Haemonetics ACP215. Promyté erythrocyty s Nutricelem se skladují při teplotě 2 až 6 °C maximálně po dobu 21 dní (9, 16).

Oba procesy, glycerolizace i deglycerolyzace, probíhají v uzavřeném systému bez kontaktu s vnějším prostředím. Pro napojování hadiček vaků se používají sterilní svářečky (Terumo TSD), to zaručuje, že je ve všech fázích výroby kryokonzervovaných erythrocytů zachována metodika uzavřené výroby.

4.1 Získávání erythrocytů ke kryokonzervaci

Studie prováděná na OHBKT potvrdila, že způsob odběru dárce, tj. zda jsou erythrocyty získány z odběru plné krve nebo metodou dvojitě erythrocytaferézy, nemá zásadní vliv na kvalitu kryokonzervovaných erythrocytů. Co však jejich kvalitu ovlivňuje, je jejich deleukotizace. Deleukotizované erythrocyty prokazují lepší vlastnosti a stabilitu (9, 16).

Před vlastním odběrem krve podstupuje dárce klasickou proceduru jako před standardním odběrem krve. To znamená, že po registraci na kartotéce musí vyplnit dotazník pro dárce krve a podepsat tzv. „souhlas s odběrem“, ve kterém svým podpisem stvrzuje, že byl o celém procesu poučen a že souhlasí se zařazením do národního registru dárců krve. Dále dárce potvrzuje, že nepatří mezi osoby s rizikovým chováním vzhledem k nákaze a přenosu infekčních onemocnění (38).

V dalším kroku se dárce podrobuje předodběrovému vyšetření. Je mu odebrána z prstu kapilární krev a stanoven krevní obraz, dále je mu změřena tělesná teplota a krevní tlak. Dále se do karty dárce doplní informace o výšce a hmotnosti. S výsledky dárce postupuje k lékaři, který zhodnotí výsledky laboratorního vyšetření, posoudí dotazník a pokud uzná dárce způsobilým, propustí lékař dárce k odběru (10, 38).

Pacienti přicházející k odběru autologní krve podstupují stejný předodběrový proces. Navíc musejí přinést žádanku k autolognímu odběru kryokonzervované krve od svého ošetřujícího lékaře.

4.1.1 Získávání erytrocytů ke kryokonzervaci z plné krve

Odběrem plné krve se získávají ke kryokonzervaci jak erytrocyty homologní tak autologní. Odběr plné krve a její následné zpracování na ERD pro účely kryokonzervace je častější než erythrocytaferéza. Odběr plné krve je snadnější, rychlejší a tolik nezatěžuje dárce či pacienta, respektive ne každý dárce či pacient je pro přístrojový odběr vhodný (16).

K odběru plné krve pro účely kryokonzervace se používá odběrová 4 - vaková souprava s integrálním in-line filtrem pro deleukotizaci separovaných erytrocytů (39). Tento set se skládá z primárního 450 ml vaku na plnou krev. Primární vak obsahuje 63 ml antikoagulačního roztoku CPD, který obsahuje:

- citronan sodný 3,95 g,
- monohydrát kyseliny citronové 0,327 g,
- dihydrogenfosforečnan sodný 0,251 g,
- dextrózu,
- injekční vodu na 100 ml

Dále odběrový set obsahuje:

- integrovaný deleukotizační filtr,

- sběrný vak pro de leukotizovanou plnou krev,
- prázdný vak pro plazmu a vak pro ERD, který obsahuje 100 ml resuspenzního roztoku SAG-Manitol (SAG-M), který se skládá z:
 - glukózy 0,9 g,
 - adeninu 0,169 g
 - chloridu sodného 8,77 g,
 - injekční vody na 100 ml,

Dále je součástí setu váček pro odběr vzorků pro laboratorní vyšetření (40). Z něj se uzavřeným systémem odeberou vzorky krve do zkumavek s podtlakovým systémem. Odebere se jedna zkumavka pro imunohematologické vyšetření (krev odebraná do K₃EDTA), jedna zkumavka pro stanovení infekčních markerů, které se vyšetřují z krevního séra a jedna zkumavka, z které se po centrifugaci odebere plazma do speciální zkumavky a přikládá se k finálnímu výrobku jako dlouhodobý vzorek (10).

Pro dokonalé promísení krve s antikoagulačním roztokem a tím zabránění vzniku krevních sraženin se váhy po celou dobu odběru kývou a mísí obsah vaku. Odběr krve by měl být do deseti minut ukončen. Pokud odběr trvá déle, vzrůstá riziko vzniku mikrosraženin a agregátů trombocytů v hadičkách vedoucích k vaku (10).

Plná krev je odebírána na automatických odběrových vahách Baxter OPTIMIX. Váhy jsou nastaveny na odběr 450 ml plné krve. Po dosažení cílové hmotnosti váhy automaticky uzavřou hadičku vedoucí k vaku a zastaví se. Signálem oznámí ukončení odběru (10).

4.1.2 Získávání erytrocytů ke kryokonzervaci dvojitou erythrocytaferézou

Druhým způsobem získávání erytrocytů ke kryokonzervaci je odběr dvojitou erythrocytaferézou. To znamená, že z jednoho odběru se připraví 2 TU (transfuzní jednotky) erytrocytů. Také aferetickými odběry získáváme erytrocyty homologní i autologní. Tento typ odběru není tak častý, protože klade větší nároky na dárce/pacienta. Odběr je časově náročnější. Dárce či pacient musí vážit alespoň 70 kg a hodnota hemoglobinu před odběrem musí být > 140 g/l (41).

Pro separaci erytrocytů se používá separátor Haemonetics MCS+ s odběrovým setem LN 948 F od firmy Haemonetics.

Odběrový set se skládá z:

- centrifugačního zvonu o objemu 210 ml, v kterém probíhá samotná separace krevních složek,
- vaku na separované erythrocyty o objemu 800 ml,
- dvou finálních vaků pro erythrocyty o objemu 600 ml,
- sběrného vaku na plazmu a buffy-coat o objemu 1000ml,
- deleukotizačního filtru (42).

Po instalaci setu a před zahájením odběru je nutné do separátoru vložit informace o proceduře a informace o dárci/pacientovi:

je nutné vložit informace o cílovém množství erythrocytů a množství kompenzačního roztoku, dále je nutné zadat hematokrit dárce (z něj se odhaduje hematokrit po odběru), pohlaví dárce/pacienta, tělesnou výšku a hmotnost (tyto tři parametry se používají pro výpočet celkového objemu krve) a odhad celkového objemu krve. Dále je nutné nastavit, aby separátor nedávkoval do vaku na separované erythrocyty resuspenzní roztok SAG-M (11).

Před zahájením odběru a po provedení venepunkce se naplní váček, z kterého se uzavřeným systémem odeberou vzorky krve do zkumavek s podtlakem pro imuno hematologické vyšetření (K₃EDTA), pro stanovení infekčních markerů a pro stanovení hladiny feritinu (srážlivá krev). Dále se odebere jedna zkumavka, z které se po centrifugaci odsaje plazma do speciální zkumavky, která se přikládá ke kryokonzervovaným erythrocytům jako dlouhodobý vzorek (11).

Samotný aferetický odběr probíhá ve dvou cyklech, kdy se dvakrát vystřídá fáze „odběrová“ a fáze „vracení“:

- **Fáze „odběrová“:** nafoukne se manžeta a spustí se pumpy a centrifugační zvon se roztočí. Když krev dosáhne zvonu, začne se počítat objem krve k separaci. Centrifugační zvon se plní krví s antikoagulačním roztokem (CPD-50), který obsahuje:
 - citronan sodný 3,98 g
 - kyselinu citronovou 0,44 g
 - glukózu (monohydrát) 5,00 g
 - dihydrogenfosforečnan sodný 0,376 g
 - injekční vodu na 100 ml (43)

Zvon se plní tak dlouho, dokud objem krve ve zvonu nedosáhne 198 ml. Po centrifugaci krve je vzduch z hadiček vytlačen do plazmového vaku a po něm začne do vaku vytékat plazma. Po plazmě je vytlačován buffy-coat. Po vytlačení buffy-coatu se zastaví příslušná pumpa a začne fáze promývání erytrocytů fyziologickým roztokem a centrifuga se zastaví (11).

- **Fáze „vracení“:** prvních 5 ml krvinek ze zvonu se vrací dárci/pacientovi, aby se zabránilo srážení krve v odběrové jehle. Potom se erytrocyty přemístí z centrifugy do sběrného vaku. Po odebrání nastaveného množství erytrocytů se obsah plazmového vaku vrací dárci/pacientovi a také se vrátí erytrocyty zbývající ve zvonu centrifugy. Tím je proces aferetického odběru ukončen (11).

4.2 Příprava krve před kryokonzervací

Po ukončení odběru krve a před vlastním procesem kryokonzervace je potřeba vaky s odebranou krví připravit. Postup přípravy se liší podle toho, zda se odebírala plná krev, nebo erytrocyty dvojitou erytrocytaferézou.

Plnou krev je třeba deleukotizovat a po centrifugaci oddělit plazmu od erytrocytů. U erytrocytů z aferézy je postup jednodušší, zde stačí erytrocyty jen deleukotizovat.

Třetí možností je příprava erytrocytů, které byly odebrány na jiném pracovišti a na oddělení OHBKT byly zaslány pro další zpracování a kryokonzervaci. Tento případ se týká především autologních erytrocytů.

4.2.1 Příprava erytrocytů resuspendovaných deleukotizovaných (ERD) z plné krve pro kryokonzervaci

Po ukončení odběru se vak s plnou krví nechá 30 minut při pokojové teplotě odstát a chladnout. Po této době se odběrová souprava zavěsí na stojan a plná krev se nechá protékat přes deleukotizační filtr do transferového vaku. Po dokončení filtrace se pomocí nesterilní svářečky oddělí prázdný vak na plnou krev s použitým deleukotizačním filtrem (13).

Dále se pomocí svářečky oddělí vak určený na ERD obsahující resuspenzní roztok SAG-M. Takto připravený set se vloží do centrifugační kyvety a provede se centrifugace trvající 20 minut o odstředivé síle 3998 g a teplotě 20 °C (13). Po

centrifugaci, kdy došlo k oddělení jednotlivých krevních složek, se opatrně pomocí sterilní svářečky připojí speciální vak určený ke kryokonzervaci erytrocytů. Odběrová souprava OptiPure WB není primárně určena pro kryokonzervaci a materiál, z kterého je vyrobena by nevydržel tak nízké teploty (-65 °C a méně).

V dalším kroku se provede separace krevních složek na automatickém lisu MacoPress Smart (44). Do horního vaku se pomocí lisu vytlačí plazma a do spodního erytrocyty.

Na konci procedury tedy máme ve finálním vaku jen erytrocyty s antikoagulačním roztokem (CPD). Jelikož vak již neobsahuje žádný resuspenzní roztok, je nutné erytrocyty do 2 hodin zamrazit, aby se zachovala co nejlepší životnost erytrocytů a snížila se úroveň volného hemoglobinu na minimum (13).

Z finálního vaku se pomocí nesterilní svářečky oddělí segment se vzorkem meziprojektu, z kterého se na analyzátoru krevního obrazu změří hodnota hematokritu. Hodnota hematokritu by měla být >0,80. Podle hodnoty hematokritu meziprojektu se dává množství glycerolu nutné pro hluboké zamrazení. Vak s erytrocyty se zváží a označí (15).

Příprava ERD ke kryokonzervaci je poměrně náročná procedura, kdy při neopatrném zacházení může dojít k znehodnocení meziprojektu (13).

4.2.2 Příprava erytrocytů ke kryokonzervaci získaných dvojitou erytrocytaferézou

Po dokončení aferetického odběru se odběrový set sejme ze separátoru a nesterilní svářečkou se oddělí. Tento set se skládá ze sběrného vaku s erytrocyty, deleukotizačního filtru a satelitního vaku na erytrocyty. Stejně jako u setu na výrobu ERD, i zde je nutné pomocí sterilní svářečky oddělit dva satelitní vaky na EAD (erytrocyty z aferézy deleukotizované) a místo nich napojit vaky určené ke kryokonzervaci. Po té se set zavěsí na stojan a krvinky se nechají ze sběrného vaku protékat přes deleukotizační filtr do dvou satelitních vaků. Po ukončení deleukotizace se vaky pomocí svářečky oddělí. Pomocí nesterilní svářečky se oddělí segment, z kterého se změří na analyzátoru krevního obrazu hodnota hematokritu. Označené vaky s meziprojektu se zváží a hmotnost se zaznamená. Tento meziprojekt neobsahuje resuspenzní roztok, proto je nutné erytrocyty do dvou hodin zamrazit (14).

Výhodou aferetického odběru je to, že se z jednoho odběru získají 2 TU (transfuzní jednotky) a příprava meziprojektu je mnohem snazší. Na druhou stranu je tento typ odběru časově náročnější pro dárce/pacienta a jsou zde přísnější kritéria pro propuštění dárce/pacienta k tomuto typu odběru než u plné krve (14, 19).

4.2.3 Příprava ERD ke kryokonzervaci z externího pracoviště

Hlavně u požadavků na autologní odběry u pacientů s imunohematologickými komplikacemi a vzácnými protilátkami je časté, že se plná autologní krev odebere na jiném pracovišti a na OHBKT je zaslán jen finální vak s ERD. U standardně vyrobeného ERD je ve finálním vaku spolu s erytrocyty a antikoagulačním roztokem také resuspenzní roztok SAG-M, aby nedošlo k hemolýze erytrocytů (45).

Před zamrazením je nutné tento resuspenzní roztok z vaku odstranit. K vaku s ERD se pomocí sterilní svářečky připojí vak pro kryokonzervaci, uvolní se svár a obsah vaku se přepustí. Vaky se vloží do centrifugační květy a provede se centrifugace ve velkoobjemové centrifuze trvající 4 minuty o odstředivé síle 861 g a teplotě 22 °C. Ve vaku se oddělí krvinky od supernatantu, který obsahuje SAG-M. Správná centrifugace je zde klíčová, protože je nutné co nejdokonaleji odstranit SAG-M z erytrocytů. Vak se opatrně vloží do ručního lisu a supernatant se z vaku určeného ke kryokonzervaci opatrně vytlačí do vaku od ERD. Supernatant obsahuje resuspenzní roztok SAG-M s malým množstvím erytrocytů (45).

I u tohoto meziprojektu se pomocí nesterilní svářečky oddělí segment se vzorkem erytrocytů a změří se na analyzátoru krevního obrazu hodnota hematokritu. Před dalším zpracováním je nutné vak zvážit a hmotnost zaznamenat (45).

4.3 Vlastní kryokonzervace

Po dokončení přípravy meziprojektu následuje vlastní proces kryokonzervace, tzn. promísení erytrocytů s roztokem glycerolu a zamrazení. Na oddělení OHBKT je zavedena metoda tzv. „vysokého“ glycerolu, kdy se řízeným procesem do vaku s erytrocyty napustí přesně definované množství 40% glycerolu (glycerol laktát 6,5 M), který slouží jako intracelulární kryoprotektivum (9, 16, 27, 32, 33).

Před procesem glycerolizace je nutné vytemperovat na teplotu 32 °C jak vak s erytrocyty, tak roztok glycerolu, k tomu slouží vodní lázeň s rotátorem. Díky

neustálému promíchávání se dokonale prohřeje i jádro vaku s erytrocyty. Ve vodní lázni se erytrocyty i glycerol ponechají 30 minut (15).

Samotná glycerolizace se řízeným procesem provádí na separátoru Haemonetics ACP215. Před zahájením procedury je nutné do separátoru vložit údaje o hmotnosti vaku a naměřený hematokrit. Z těchto údajů se vypočítá dávkování glycerolu (15, 18).

V dalším kroku se nainstaluje glycerolizační souprava Heamonetics LN 225 na separátor a provede se autotest systému. Pomocí sterilní svářečky se glycerolizační set napojí na vak s erytrocyty, který se během celého procesu glycerolizace promíchává (15, 18).

Celý proces napouštění glycerolu do vaku s erytrocyty trvá asi 20 minut, na jeho konci se vytiskne primární protokol o dokončené glycerolizaci. Po ukončení procedury se vak s erytrocyty pomocí nesterilní svářečky odpojí od setu, zvaží se a zkontroluje se označení vaku a spolu s dlouhodobým vzorkem se ve speciálním obalu uloží nejméně na 24 hodin do mrazicího boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde se nechá neřízeným procesem zmrazit. Po 24 hodinách se kryokonzervované erytrocyty přemístí do mrazicího boxu pro dlouhodobé skladování s teplotou $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde mohou být skladovány až po dobu 30let (15, 16).

Výsledkem celého tohoto procesu, od odběru krve až po její glycerolizaci a zamrazení, mohou být tyto typy transfuzních přípravků:

- erytrocyty z aferézy kryokonzervované deleukotizované zmrazené (EAKDZ)
- erytrocyty z aferézy kryokonzervované deleukotizované zmrazené pro autotransfuzi (AEAKDZ)
- erytrocyty kryokonzervované z plné krve deleukotizované zmrazené (EKDZ)
- erytrocyty kryokonzervované z plné krve deleukotizované zmrazené pro autotransfuzi (AEKDZ).



Obrázek 1: Plná krev připravená k deleukotizaci



Obrázek 2: Glycerolizace erytrocytů na promývacím separátoru Haemonetics ACP215



Obrázek 3: Erythrocyty připravené ke zmrazení

4.4 Rekonstituce

Celý proces rekonstituce je, stejně jako glycerolizace, řízený proces prováděný na separátoru Haemonetics ACP215. Účelem rekonstituce je rozmrazení přípravku, vymytí glycerolu z erythrocytů a jejich následná resuspenze v aditivním roztoku AS-3 Nutricel (9, 19, 16).

Po vyjmutí zmrazeného vaku z mrazicího boxu je nutné jeho šetrné rozmrazení. Vak s erythrocyty se na 30 minut umístí do rozmrazovače, kde je ještě po celou dobu míchán, aby došlo k rovnoměrnému rozmrazení. Lázeň v rozmrazovači je vytemperována na 37 °C. Spolu s erythrocyty se dá do vodní lázně temperovat vak s 12% NaCl (o objemu 150 ml) a vak s roztokem 0,9% NaCl a 0,2% dextrózy (o objemu 2000 ml) (19, 46).

Během rozmrazování vaku se na ACP215 nainstaluje deglycerolizační souprava Haemonetics LN 235 a provede se série testů ověřující správné zapojení setu a funkčnost celého systému (19).

V dalším kroku se na set napojí vaky s deglycerolizačními roztoky a vak s AS-3 Nutricel, který obsahuje tyto složky:

- kyselinu citronovou (monohydrát) 0,042 g
- fosforečnan sodný 0,276 g
- chlorid sodný 0,401 g
- adenin 0,030 g
- dextrózu 1,000 g
- citronan sodný 0,588 g
- injekční vodu na 100 ml

Pomocí sterilní svářečky se na set připojí vak s erytrocyty. Vak s erytrocyty je po celou dobu procesu deglycerolizace umístěn na třepačce (19, 47).

Po napojení vaků a překontrolování nastavení separátoru se zahájí proces deglycerolizace trvající 72 minut. Celý proces vymývání glycerolu je rozložen do osmi fází. První dvě fáze procesu jsou **fáze diluční**. V těchto fázích se do vaku s erytrocyty napustí hypertonický roztok 12% NaCl a dále se postupně ředí 0,9% roztokem dextrózy a v centrifugačním zvonu je při 8000 ot./min. odstraněn do odpadního vaku glycerol vytlačený z erytrocytů. Během procesu je monitorována úroveň volného hemoglobinu (18, 19).

Dalších pět fází jsou **fáze promývací**. V těchto fázích dochází k dalšímu opakovanému plnění centrifugačního zvonu 0,2% dextrózou, centrifugaci a vytlačení glycerolu nacházejícího se extraerytrocytárně do odpadního vaku. I během promývacích fází je monitorována úroveň volného hemoglobinu v odpadu (18, 19).

V poslední osmé fázi (**aditivní fázi**) je k erytrocytům ve zvonu přidáno 240 ml aditivního roztoku AS-3 Nutricel. Zbytek odpadu vyteče do odpadního vaku a promyté erytrocyty pomocí 0,9% dextrózy, obohacené o AS-3 jsou přepuštěny do produktového vaku (18).

Tím je proces deglycerolizace ukončen a promývací separátor automaticky vytiskne protokol o dokončené proceduře obsahující mimo jiné graf volného hemoglobinu („Hessova křivka“). Vak s erytrocyty se pomocí svářečky odpojí od setu, zváží se a pomocí sterilní svářečky se postupně napojí dva váčky pro odběr vzorků na kontrolu kvality (19).

Vak s erythrocyty se uloží do lednice při teplotě 2 až 6 °C s dobou expirace 21 dní od rekonstituce (9, 16, 19).



Obrázek 4: Kryokonzervované erythrocyty



Obrázek 5: Deglycerolizace rozmrazených erythrocytů



Obrázek 6: Kryobanka – hlubokomrazící boxy Jouan VX – 80 a separátory Haemonetics ACP215

5 Kontrola kvality

Kontrola kvality je nedílnou součástí výroby všech druhů transfuzních přípravků (TP), tedy i kryokonzervovaných erytrocytů. Kontrola kvality zahrnuje povinné i nepovinné parametry, které se sledují u všech, nebo u náhodně vybraných TP. Je to mechanismus, který ověřuje správnost postupů všech kroků výroby od odběru plné krve, nebo jejích složek, přes výrobu a skladování (12).

Proces výroby kryokonzervovaných erytrocytů a jejich následná rekonstituce je náročný a poměrně dlouhotrvající proces, při kterém jsou kladeny velké nároky na kvalitní a svědomitou práci. Je zde mnoho okamžiků, kdy může dojít k nenávratnému poškození TP, nebo ke snížení kvality finálního přípravku. Nezanedbatelný faktem je také finanční náročnost výroby kryokonzervovaných erytrocytů. Proto je zde pravidelná kontrola kvality TP velmi důležitá (16).

5.1 Parametry kontroly kvality

Výchozím doporučením pro parametry kontroly kvality je „Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components“ („Guide“), který pravidelně vydává Council of Europe Publishing. V této publikaci jsou uvedeny parametry kvality pro téměř všechny typy transfuzních přípravků. U kryokonzervovaných erytrocytů „Guide“ definuje parametry kvality jen pro kryokonzervované erytrocyty z plné krve. Pro erytrocyty získané dvojitou erytrocytaferézou jsou uvedeny jen kontrolní parametry u erytrocytů z aferézy bez dalšího uchování (12). Pro kryokonzervované erytrocyty z aferézy dosud žádná doporučení nevyšla. Proto byly v rámci studie prováděné na OHBKT ÚVN, některé parametry kvality doplněny a upraveny po té, co byla prokázána stále dobrá kvalita a terapeutická účinnost těchto TP (16).

5.1.1 Standardní parametry kvality

Standardní parametry kvality vycházejí z „Guide“, z české vyhlášky č. 143/2008 Sb. a dále z doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP. Tyto parametry se musí v rámci kontroly kvality pravidelně sledovat minimálně v četnosti doporučené „Guidem“ a vyhláškou č. 143/2008 Sb. (12, 38).

Mezi parametry bezpečnosti sledované u každého dárce krve a u autologních odběrů patří:

1. infekční markery:

- anti-HIV (1, 2) a HIV Ag p24
- HBsAg
- anti-HCV
- syfilis

2. imuno hematologické vyšetření:

- ABO, RhD
- protilátky proti erytrocytům
- antigeny CcEe, antigen Kell (jen u dárcovských odběrů)

Zde uvedené parametry bezpečnosti je nutné stanovit po odběru plné či aferetické krve, ještě před zahájením kryokonzervačního procesu (38).

Tabulka 1: Přehled parametrů bezpečnosti dle "Guide" a vyhlášky č. 143/2008 Sb.

Parametr	Požadavek na kvalitu	Četnost prováděných kontrol
anti-HIV (1, 2), antigen p24	negativní	u všech jednotek
HBsAg	negativní	u všech jednotek
anti-HCV	negativní	u všech jednotek
syfilis	negativní	u všech jednotek
ABO, RhD	stanovení	u všech jednotek
protilátky proti erytrocytům	negativní	u všech jednotek
antigeny CcEe, antigen Kell	stanovení	u všech jednotek

Dalšími biochemickými a hematologickými parametry kvality, které se pravidelně sledují, jsou tyto:

- objem transfuzního přípravku
- hemolýza na konci doby uchovávání
- hemoglobin v supernatantu
- hemoglobin v rekonstituovaných kryokonzervovaných erytrocytech
- hematokrit
- osmolarita
- leukocyty
- sterilita

Většina parametrů kvality se stanovuje ihned po rekonstituci (kromě hemolýzy a sterility). V tabulce č. 2 jsou uvedeny parametry kvality se svými limitními hodnotami tak, jak je požaduje „Guide“ (12).

Tabulka 2: Parametry kvality dle „Guide“ pro přípravky Erytrocyty kryokonzervované (EK) a Erytrocyty z aferézy (EA)

Parametr	Požadavek na kvalitu		Četnost prováděných kontrol
	EK	EA	
Objem	> 185 ml	nastaven výrobcem	u všech jednotek
Hemoglobin v supernatantu	< 0,2 g/TU	-	u všech jednotek
Hemoglobin	> 36 g/TU	> 40 g/TU	všechny jednotky (EK), 4 jednotky měsíčně (EA)
Hemolýza na konci doby uchovávání	-	< 0,8%	4 jednotky měsíčně
Hematokrit	0,65-0,75	0,65-0,75*	všechny jednotky (EK), 4 jednotky měsíčně (EA)
Osmolarita	< 340 mOsm/l	-	1 % všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně
Leukocyty	< 0,1 x 10 ⁹ buněk/TU	< 1 x 10 ⁶ / TU	1 % všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně
Sterilita	sterilní	-	1 % všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně

* Při použití aditivního roztoku: hematokrit 0,50 – 0,70

Během studie prováděné na OHBKT byla klinicky ověřena téměř stále stejná účinnost rekonstituovaných erytrocytů po dobu 0 - 21 dní po rekonstituci, to znamená že nedošlo ke kvalitativní změně v účinnosti transfuzního přípravku. Proto došlo k úpravě hodnot některých biochemických a hematologických parametrů. V klinickém hodnocení byly tyto hodnoty určeny za dostatečně spolehlivé pro zachování účinného a bezpečného transfuzního přípravku, vyráběného na OHBKT při ÚVN (16). Upravené limitní hodnoty parametrů kontroly kvality jsou uvedeny v tabulce číslo 3.

Tabulka 3: Přehled limitních hodnot doporučených parametrů kvality zavedených na OHBKT

Parametr	Požadavek na kvalitu EK	Četnost prováděných kontrol
Objem	> 200 ml	u všech jednotek
Hemoglobin v supernatantu	< 0,5 g/TU	u všech jednotek
Hemoglobin	> 30 g/TU	u všech jednotek
Hemolýza na konci doby uchovávání	< 1 %	4 jednotky měsíčně
Hematokrit	≥ 0,40	u všech jednotek
Osmolarita	< 340 mOsm/l	1 % všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně
Leukocyty	< 0,1 x 10 ⁹ buněk/TU	1 % všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně
Sterilita	sterilní	1 % všech jednotek minimálně 4 jednotky měsíčně

5.1.2 Parametry kvality používané při validačních studiích

Tyto parametry se běžně nestanovují, ale v rámci validačních studií jsou cenným zdrojem dalších informací o kvalitě validovaných přípravků, o terapeutické účinnosti, o délce přežívání erytrocytů a jejich metabolickém stavu po rekonstituci. Tyto parametry se stanovují ihned po rozmrazení a rekonstituci TP. Data získaná těmito měřeními jsou důležitá pro posouzení jejich vztahu s terapeutickou účinností. Při validační studii se navíc u rekonstituovaných kryokonzervovaných erytrocytů sledovaly tyto parametry kvality (16):

- hmotnost odpadu
- hemoglobin v odpadu
- draslík
- amoniak/ aminy
- ATP
- fosfor

- 2,3-difosfoglycerát
- pH

5.2 Metodika vzorkování

V této kapitole je popsán postup získávání vzorků a principy měření jednotlivých parametrů kvality u 50 transfuzních jednotek kryokonzervovaných erytrocytů, které byly rozmrazeny a následně rekonstituovány v roztoku AS-3 Nutricel. Jsou to erytrocyty získané buď odběrem plné krve a následně deleukotizované, nebo získané dvojitou erythrocytaferézou od dárců krve. Všechny měřené vzorky jsou krevní skupiny 0 RhD negativní. Výsledky naměřených hodnot jsou popsány v kapitole 6 Výsledky.

5.2.1 Získávání vzorků pro kontrolu kvality

Odběr vzorků TP pro stanovení parametrů kontroly kvality se provádí bezprostředně po dokončení rekonstituce. Vzorky se odebírají sterilně do transferového vaku o objemu 150 ml. Hadička od vaku s erytrocyty a hadička od vzorkovacího váčku se umístí do sterilní svářečky a provede se napojení obou hadiček. Vak s erytrocyty se řádně a šetrně promíchá, svár se uvolní a přepustí se několik mililitrů přípravku. Poté se mobilní svářečkou obě hadičky zataví a oddělí. Tento postup se zopakuje ještě jednou. Získají se tedy dva vzorkovací váčky. Jeden se označí a uloží do chladicího boxu pro pozdější kontrolu sterility. Vzorek z druhého váčku je určen k měření parametrů kvality. Ke každému kontrolovanému TP se vyplňuje protokol o kontrole kvality, do kterého se zaznamenávají naměřené veličiny (19).

5.2.2 Metody měření jednotlivých parametrů

Metody měření jednotlivých parametrů jsou uvedeny v následující tabulce. Téměř všechny parametry se stanovují ihned po rekonstituci. Hemolýza se stanovuje první den po expiraci, nebo nejbližší možný den po expiraci, stejně jako sterilita.

Tabulka 4: Metody stanovení jednotlivých parametrů

Parametr	Jednotka	Metoda
Objem	ml	Gravimetrie (Heamonetics ACP215)
Hemoglobin	g/TU	Fotometrie (Sysmex XT 2000i)
Hemoglobin v odpadu	g/TU	Fotometrie (Sysmex XT 2000i)
Hemoglobin v supernatantu	g/TU	Fotometrie (Konelab 60i, Kone)
Hematokrit	%	Fotometrie (Sysmex XT 2000i)
Leukocyty	$\times 10^9$ /TU	Mikroskopicky v Nageotteově komůrce
Osmolarita	mOsm/l	Kryometrie (Osmometer Advanced 2020)
Hemolýza	%	Fotometrie (Konelab 60i, Kone)
Infekční markery	S/CO	CMIA (Architect i2000, Abbott)
Sterilita	xxx	kolorimetrie (BacT/ALERT® 3D)

5.2.2.1 Sterilita

Základní pokyny pro kontrolu sterility vycházejí z Evropského lékopisu. „Guide“ udává četnost kontrol sterility u EK jako 1 % všech jednotek, minimálně 4 jednotky měsíčně. U EA požadavek na sterilitu nedefinuje (12).

Jelikož jsou kryokonzervované erytrocyty vzácný a drahý transfuzní přípravek, nelze na zkoušku sterility odeslat celé vaky, jako je to v případě běžně vyráběných erytrocytových přípravků. EK se rozmrazují pouze v případech, kdy víme, že budou podány. Proto se musí z vaku sterilně odebrat vzorek, který se zasílá na kontrolu sterility. Na kontrolu sterility se posílají erytrocytové přípravky v den jejich expirace, nebo nejbližší možný den po expiraci, tj. v případě EK 21. den po rekonstituci.

Transferový váček se vzorkem se řádně označí a uloží do chladicího boxu při teplotě 2 až 6 °C, než je s vyplněným protokolem odeslán do mikrobiologické laboratoře na kontrolu sterility (17).

V mikrobiologické laboratoři pracovník jehlou sterilně odebere dvakrát 10 ml vzorku a přemístí vzorek transfuzního přípravku do lahviček s tekutým kultivačním médiem. Testuje se přítomnost jak aerobní, tak anaerobní mikrobiální flóry na přístroji BacT/ALERT® 3D. Tento přístroj funguje na principu kolorimetrie. Při nárůstu bakteriálního kmene v kultivační půdě dochází k produkci oxidu uhličitého. Se

stoupající koncentrací se mění barva senzoru na dně kultivační lahvičky. Měří se intenzita světelného paprsku vyslaného fotodiodou a odraženého od senzoru. Při pozitivní kultivaci se nález vyočkuje a určí se bakteriální kmen (17).

5.2.2.2 Infekční markery

Pokyny, jak často a jaké infekční markery se musí vyšetřovat, vycházejí z vyhlášky MZ ČR č.143/2008 Sb.

Na OHBKT ÚVN se infekční markery stanovují ze séra systémem Abbott Architect i2000. Tato imunoanalytická metoda je založena na principu chemiluminiscence na mikročasticích (CMIA). CMIA je detekční metoda pro měření a kvantifikaci koncentrace analytu. Obsah analytu je zjišťován na základě měření chemiluminiscenční emise, které provádí optický systém CMIA (48).

Princip metody: Do reakční nádoby obsahující vzorek se nadávkuje mikročástice (obalené zachytovými molekulami - antigeny, protilátkami, nebo virovými částicemi, které odpovídají měřenému analytu). Pokud je analyt přítomen v séru, naváže se na mikročástice a vznikne imunokomplex. Po uplynutí inkubační doby přitáhne magnet paramagnetické mikročástice (navázané na specifický analyt) ke stěně reakční nádoby. Reakční směs se propláchne a odstraní se nenavázané látky. Detekování je dokončeno pomocí konjugátu značeného chemiluminiscenčním barvivem. Výsledky jsou vyjádřeny kvantitativní hodnotou (S/CO) a kvalitativní interpretací: nereaktivní, grey zone (šedá zóna), reaktivní (48).

Pokud vyjde naměřená hodnota v rozmezí šedé zóny, nebo iniciálně reaktivní, musí se vyšetření z téhož vzorku séra 2x zopakovat. Pokud je opakované měření nereaktivní, výsledek se uzavře jako nereaktivní. Pokud jeden nebo oba výsledky z opakovaného měření vyjdou v šedé zóně, nebo reaktivní, uzavře se výsledek jako opakovaně reaktivní a odesílá se do národní referenční laboratoře na konfirmační vyšetření. V případě dárcovského odběru je transfuzní přípravek likvidován, plazma se uschová pro potřeby referenční laboratoře a dárce je na 6 měsíců vyřazen z evidence (49).

5.2.2.3 Objem transfuzního přípravku

Po ukončení procesu deglycerolizace se každý vak s erytrocyty musí zvážit a jeho hmotnost se zaznamená do informačního systému. Z hmotnosti se přepočtem stanovuje objem transfuzního přípravku tak, že se hmotnost v gramech vydělí koeficientem 1,1 g/ml, a tím se získá objem TP v mililitrech. Objem je důležitý pro další výpočty v rámci kontroly kvality. „Guide“ udává některé požadavky na parametry kvality vztahované k objemu TP (12, 50).

5.2.2.4 Hemoglobin ve finálním transfuzním přípravku

Hodnota hemoglobinu se stanovuje z rekonstituovaného erytrocytového přípravku. Po odběru vzorku pomocí sterilního sváru do vzorkovacího váčku se jeho obsah přepustí do zkumavky s K₃EDTA a změří se množství hemoglobinu na analyzátoru krevního obrazu. Hodnota hemoglobinu se stanovuje z lyzovaného vzorku pomocí absorpční spektrofotometrie, kdy je hemoglobin převeden na barevný komplex. Naměřené absorpční maximum je přímo úměrné koncentraci hemoglobinu ve vzorku (51). Naměřená hodnota je udávána v g/l. Pro potřeby kontroly kvality je třeba tuto hodnotu vyjádřit v g/TU. Toho se docílí tak, že se hodnota v g/l vynásobí objemem (v litrech) transfuzního přípravku (50).

5.2.2.5 Hemoglobin v odpadu

Během rozmrazování a následného vymývání glycerolu z erytrocytů se nezabrání tomu, že určité procento erytrocytů hemolyzuje. Uvolněný hemoglobin se během procesu deglycerolizace vyplavuje společně s glycerolem a chloridem sodným do odpadního vaku. Hodnota hemoglobinu v odpadu nám podává informace o vitalitě erytrocytů (16).

Pro odběr vzorku se odpadní vak promíchá a pomocí nůžek a peánu se otevře hadička vedoucí k vaku. Obsah vaku se přepustí do označené zkumavky. Hadička vaku se zavaří a vak se zlikviduje. Stejně jako hemoglobin v TP se hemoglobin v odpadu stanovuje spektrofotometricky na analyzátoru Sysmex XT 2000i (50).

5.2.2.6 Hemoglobin v supernatantu

Hodnoty hemoglobinu v supernatantu reprezentují změny týkající se zejména erytrocytů, které zůstaly bezprostředně po rekonstituci vitální. Hodnoty hemoglobinu v supernatantu nekorespondují s účinností vitálních erytrocytů během doby jejich uchovávání po rekonstituci (16).

Hemoglobin v supernatantu byl stanovován fotometricky na analyzátoru Konelab 60i. Po odběru vzorku rekonstituovaného transfuzního přípravku pomocí sterilního sváru do vzorkovacího vaku se obsah vaku přepustí do zkumavky s K_3EDTA . Vzorek se zcentrifuguje a ze supernatantu se fotometricky stanoví množství hemoglobinu.

5.2.2.7 Hematokrit

Hodnota hematokritu se stanovuje také ihned po rekonstituci, tedy v den 0, ze vzorku odebraném pomocí sterilního sváru do vzorkovacího vaku. Následně byl tento váček otevřen a erytrocyty přepuštěny do zkumavky s K_3EDTA a změřeny na hematologickém analyzátoru Sysmex XT 2000i (51).

5.2.2.8 Reziduální leukocyty

U de leukotizovaných přípravků je po rekonstituci třeba spočítat množství reziduálních leukocytů, které nebyly zachyceny de leukotizačním filtrem při přípravě erytrocytů ke kryokonzervaci (16).

Počítání reziduálních leukocytů se provádí manuální metodou v Nageotteově komůrce. K 380 μl 3 % kyseliny octové se pipetuje 20 μl krve. Vzorek se tedy ředí v poměru 1:20. Obsah zkumavky se dobře promíchá a nechá se alespoň 10 minut stát při laboratorní teplotě, aby účinkem kyseliny dokonale zhemolyzovaly erytrocyty a zvýraznila se struktura leukocytů. Po té se zkumavka opět dobře promíchá a naplní se prostor počítací komůrky. Prohlíží se celá strana komůrky a počítají se v ní přítomné leukocyty. Obsah celé komůrky je 100 μl (23, 16).

Napočítané leukocyty se dělí 10. Výsledná hodnota je s koeficientem $\times 10^6/l$, tato hodnota se vynásobí objemem transfuzního přípravku v litrech a výsledná hodnota

je tedy $\times 10^6/\text{TU}$ (23). U kryokonzervovaných erytrocytů se tento výsledek ještě převede na hodnotu s koeficientem $\times 10^9/\text{TU}$ tak, jak ji uvádí „Guide“.

5.2.2.9 Hmotnost odpadu

Během procesu deglycerolizace se do odpadního vaku vymývá glycerol z erytrocytů pomocí 12% NaCl a roztokem 0,9% NaCl a 0,2% dextrózy. Hmotnost odpadu je dána množstvím glycerolu vymytého z EK a množstvím roztoků použitých v procesu deglycerolizace. Z hmotnosti vaku s EK, zadané do promývacího separátoru ACP215 před zahájením procesu deglycerolizace, se vypočítají objemy roztoků použité pro deglycerolizaci (16, 50).

5.2.2.10 Osmolarita

Hodnota osmolarity je parametr kvality indikující dostatečné vymytí glycerolu z erytrocytů. Tato hodnota je měřena ihned po rekonstituci ze vzorku odebraného pomocí sterilního sváru do vaku pro kontrolu kvality (12, 16).

Měření osmolarity je založeno na principu kryometrie, tzn. měří se bod tuhnutí látky. Bod tuhnutí závisí na počtu částic v roztoku.

5.2.2.11 Hemolýza na konci doby použitelnosti

Na konci doby použitelnosti se u erytrocytů měří procento hemolýzy. Hemolýza, stejně jako hemoglobin v supernatantu, nám podávají informace o množství vitálních erytrocytů na konci doby uchovávání. Stupeň hemolýzy se definuje jako procento rozpadlé erytrocytové masy z celkového množství erytrocytů daného transfuzního přípravku (50).

Hemolýza se měří 21. den nebo nejbližší možný den po expiraci TP. Vzorky ke stanovení hemolýzy se musí odebrat z finálního vaku s TP a tím se vak znehodnotí. Kryokonzervované erytrocyty se rozmrazují většinou jen v případech, kdy je známo, že

budou podány. Z tohoto důvodu je měření hemolýzy v běžné praxi znemožněno a využije se jen při studiích a validacích.

Stanovení hemolýzy se provádí tak, že se z vaku nesterilně odebere řádně promíchaný vzorek, který se změří na analyzátoru krevního obrazu. Vak se následně pomocí nesterilní svářečky uzavře a provede se centrifugace ve velkoobjemové centrifuze při odstředivé síle 4000 g a 5 °C po dobu 15 minut. Poté se vak opatrně vyjme z centrifugační kyvety a vloží se do ručního lisu a odebere se vzorek supernatantu. Vzorek supernatantu odebraný do zkumavky se následně zcentrifuguje při 2000 ot./min. po dobu 3 minut a fotometricky se stanoví hodnota absorpance při 540 nm. Z naměřených údajů se vypočítá hodnota hemolýzy v %. K výpočtu je potřeba znát hodnotu hematokritu, objem transfuzního přípravku v ml, střední hodnotu hemoglobinu v erythrocytech (MCHC) a absorpanci (50).

6 Výsledky

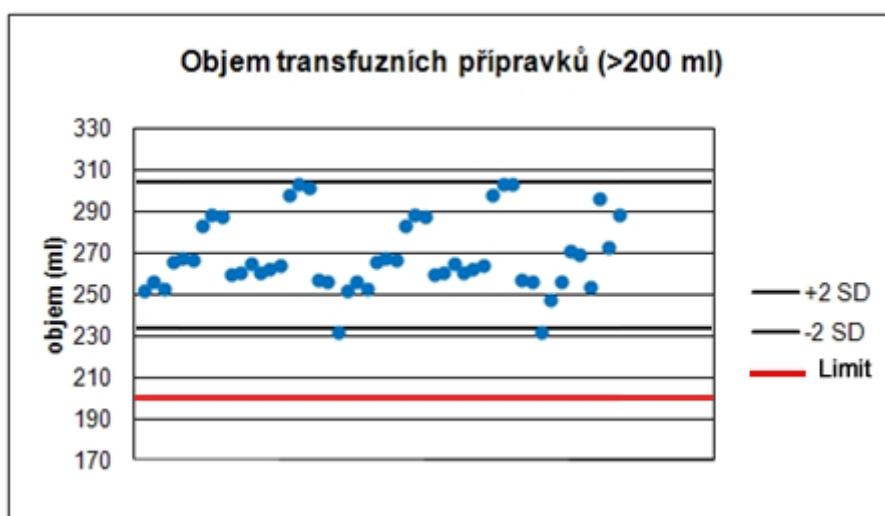
V této kapitole jsou prezentovány výsledky a závěry měření parametrů kvality u 50 transfuzních jednotek kryokonzervovaných erytrocytů po jejich rozmražení a rekonstituci v roztoku AS-3 Nutricel.

6.1 Objem transfuzního přípravku

„Guide“ specifikuje požadavek na objem EK a to tak, že objem by měl být > 185 ml na TU. Na OHBKT je nastavena dolní limitní hodnota pro objem kryokonzervovaných erytrocytů na >200 ml, a to pro erytrocyty získané z plné krve i z aferézy (16).

Výsledky 50 měření objemu TP zobrazuje následující graf a tabulky.

Graf 1: Naměřené objemy TP



Tabulka 5: Statistické údaje pro objem TP

průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
269	265	232	303	17,64	6,56

Tabulka 6: Procentuální vyjádření splnění parametru - objem

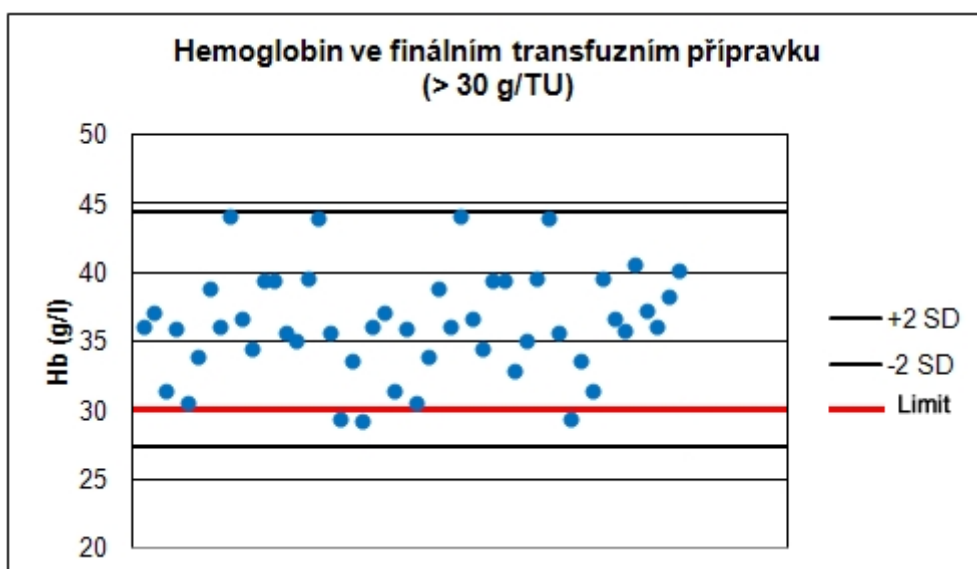
parametr splňuje		parametr nesplňuje	
počet	%	počet	%
50	100	0	0

6.2 Hemoglobin ve finálním transfuzním přípravku

Požadavek kladený na množství hemoglobinu je dle „Guide“ > 36 g/TU (12). Naměřené nižší hodnoty hemoglobinu reflektují metodiku přípravy. Během zavádění výroby EK byla pozměněna limitní hodnota pro hemoglobin z důvodu objemového limitu vaku pro kryokonzervaci. Muselo být zvoleno nižší množství odebírané krve, aby byl ve vaku dostatečný prostor pro glycerol (16). Upravená limitní hodnota pro hemoglobin je na OHBKT > 30 g/TU (16).

Následující graf reprezentuje hodnoty hemoglobinu měřené na analyzátoru Sysmex XT 2000i.

Graf 2: Naměřené hodnoty hemoglobinu



Tabulka 7: Statistické údaje pro hemoglobin

průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
36,24	36,08	29,23	44,06	3,73	10,31

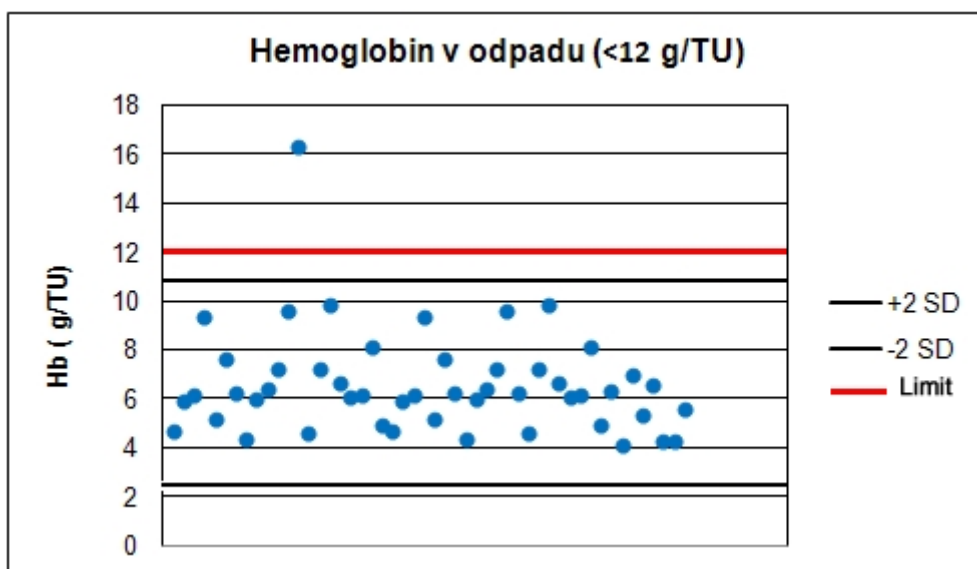
Tabulka 8: Procentuální vyjádření splnění parametru - hemoglobin

parametr splňuje		parametr nesplňuje	
počet	%	počet	%
47	94	3	6

6.3 Hemoglobin v odpadu

Pro hodnotu hemoglobinu v odpadu nejsou nastaveny "Guidem" žádné limitní hodnoty (12), ale pro kvalitu transfuzního přípravku je důležité, aby byly co možná nejnižší. Během validace procesu výroby EK na OHBKT byla limitní hodnota pro hemoglobin v odpadu stanovena na < 12 g/TU (16). Výsledky měření hemoglobinu v odpadu znázorňuje graf č.3:

Graf 3: Naměřené hodnoty hemoglobinu v odpadu



Z grafu je patrné, že hodnoty hemoglobinu v odpadu se pohybovaly mezi 4 až 10 g/l. V případě jednoho vzorku byla tato hodnota mnohem vyšší (nad 16 g/l) což ukazuje na nižší množství vitálních erytrocytů v TP.

Tabulky č. 9 a 10 uvádějí statistické údaje pro naměřené hodnoty hemoglobinu v odpadu.

Tabulka 9: Statistické údaje pro hemoglobin v odpadu

průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
6,64	6,18	4,13	16,27	2,09	31,43

Tabulka 10: Procentuální vyjádření splnění parametru - hemoglobin v odpadu

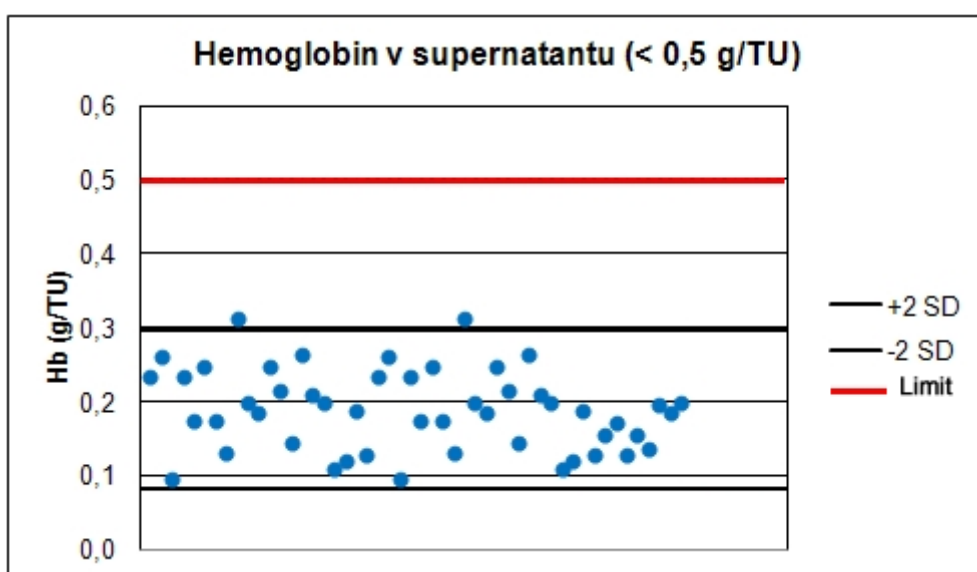
parametr splňuje		parametr nespĺňuje	
počet	%	počet	%
49	98	1	2

6.4 Hemoglobin v supernatantu

Hodnota hemoglobinu v supernatantu, kterou uvádí „Guide“, je 0,2 g/TU. Tato hodnota se vztahuje ke dni 0, tedy je měřená ihned po rekonstituci (12). Parametr kvality 0,5 g/TU nastavený na OHBKT je konstruován na 21. den po rekonstituci a jeho hodnoty se shodují i s literárními údaji (16, 20, 21, 22).

Následující graf reprezentuje výsledky měření hemoglobinu v supernatantu u 50 transfuzních přípravků EK.

Graf 4: Naměřené hodnoty hemoglobinu v supernatantu



Tabulky č. 11 a 12 uvádí statistické údaje pro naměřené hodnoty hemoglobinu v supernatantu.

Tabulka 11: Statistické údaje pro hemoglobin v supernatantu

průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
0,189	0,187	0,096	0,312	0,05	28,63

Tabulka 12: Procentuální vyjádření splnění parametru - hemoglobin v supernatantu

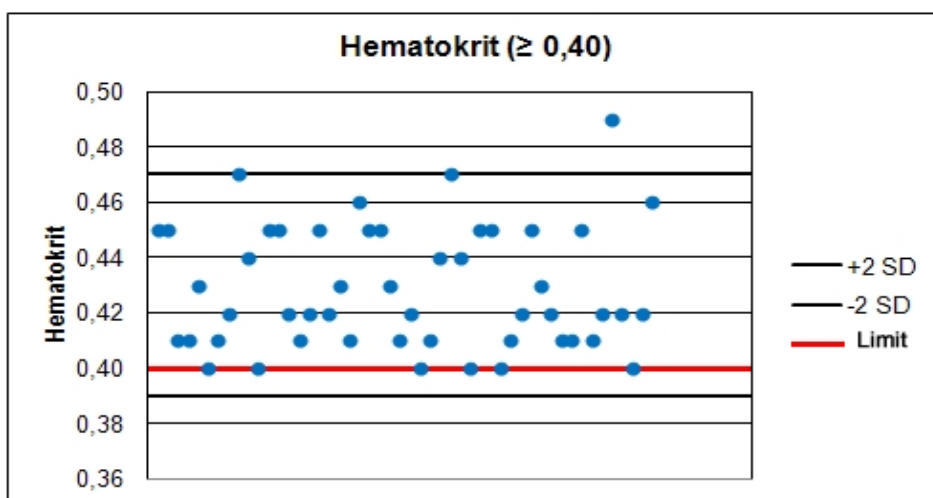
parametr splňuje		parametr nesplňuje	
počet	%	počet	%
50	100	0	0

6.5 Hematokrit

Hodnoty hematokritu pro EK jsou dle „Guide“ 0,65 - 0,75. Vzhledem k úpravě množství odebíraných erytrocytů a jejich následnému technologickému zpracování došlo na OHBKT k úpravě limitu na $\geq 0,40$. Klinická studie ověřila terapeutickou účinnost takto vyrobených EK (12, 16).

Následující graf zobrazuje naměřené hodnoty hematokritu na analyzátoru Sysmex XT 2000i.

Graf 5: Naměřené hodnoty hematokritu



Tabulka 13: Statistické údaje pro hematokrit

průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
0,43	0,42	0,40	0,49	0,02	5,06

Tabulka 14: Procentuální vyjádření splnění parametru - hematokrit

parametr splňuje		parametr nespĺňuje	
počet	%	počet	%
50	100	0	0

6.6 Reziduální leukocyty

V grafu č. 6 jsou znázorněny výsledky počítání leukocytů u 50 vzorků EK. Limitní hodnota pro leukocyty je uvedena v „Guide“ $< 0,1 \times 10^9/\text{TU}$.

Graf 6: Spočítané hodnoty reziduálních leukocytů



Tabulka 15: Statistické údaje pro reziduální leukocyty

průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

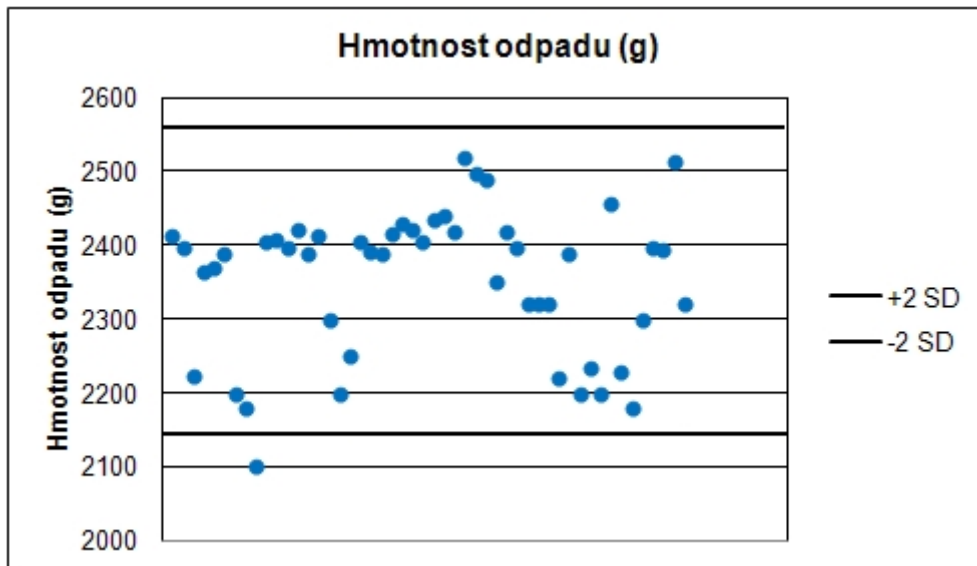
Tabulka 16: Procentuální vyjádření splnění parametru- reziduální leukocyty

parametr splňuje		parametr nespĺňuje	
počet	%	počet	%
50	100	0	0

6.7 Hmotnost odpadu

Pro hmotnost odpadu nejsou stanoveny žádné limitní hodnoty (12, 16, 50). Naměřené hmotnosti se pohybují od 2100 g do 2518 g, jak ukazuje následující graf.

Graf 7: Hmotnosti odpadu



Tabulka 17: Statistické údaje pro hmotnost odpadu

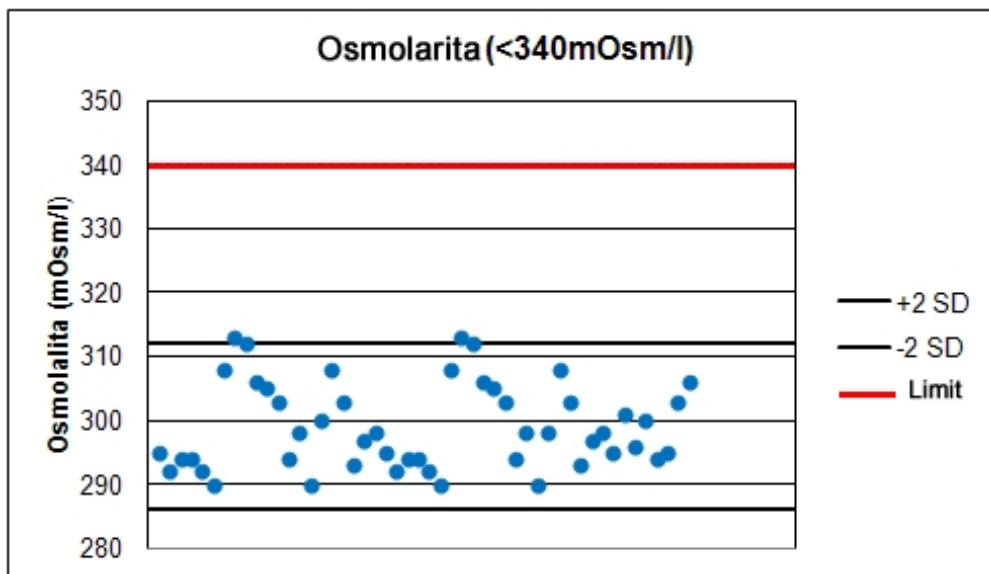
průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
2353	2391	2100	2518	98,13	4,17

6.8 Osmolarita

Dle „Guide“ by u kryokonzervovaných erytrocytů měla být hodnota osmolarity < 340 mOsm/l.

Naměřené hodnoty osmolarity ukazuje následující graf.

Graf 8: Naměřené hodnoty osmolarity



Tabulka 18: Statistické údaje pro osmolaritu

průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
299	298	290	313	6,64	2,22

Tabulka 19: Procentuální vyjádření splnění parametru - osmolarita

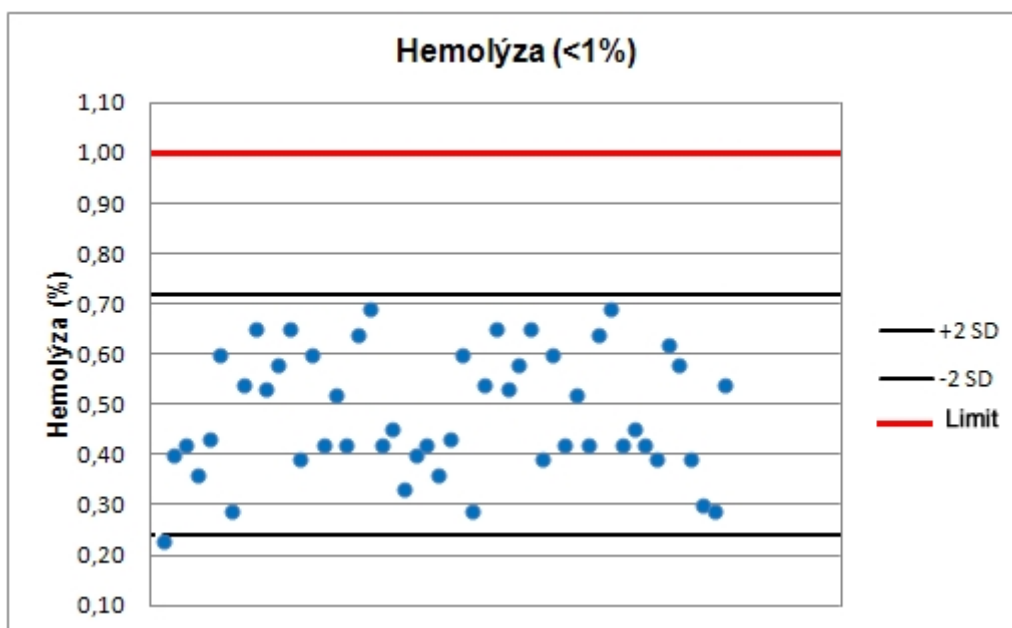
parametr splňuje		parametr nesplňuje	
počet	%	počet	%
50	100	0	0

6.9 Hemolýza na konci doby použitelnosti

Nová verze „Guide“ již limitní hodnoty pro hemolýzu nestanovuje. V době, kdy na OHBKT probíhala validace výroby EK, byla limitní hodnota hemolýzy stanovena na < 1 % (16).

Naměřené hodnoty hemolýzy znázorňuje graf č. 9.

Graf 9: Naměřené hodnoty hemolýzy



Tabulka 20: Statistické údaje pro hemolýzu

průměr	medián	minimum	maximum	SD	CV %
0,48	0,44	0,23	0,69	0,12	25,16

Tabulka 21: Procentuální vyjádření splnění parametru - hemolýza

parametr splňuje		parametr nesplňuje	
počet	%	počet	%
50	100	0	0

6.10 Zhodnocení výsledků

U všech 50 testovaných EK byly výsledky kultivace negativní. To odpovídá našemu očekávání, protože celý proces výroby probíhal v uzavřeném systému.

Objem rekonstituovaných erytrocytů se pohyboval mezi 230 až 300 ml. Na OHBKT je nastavená limitní hodnota >200 ml (16). Tato hodnota byla u všech měřených přípravků splněna. Poměrně úzké rozmezí, v kterém se objemy TP pohybují, je dáno standardizovaným procesem odběru a zpracování krve.

U 50 měřených přípravků se hodnota hemoglobinu pohybovala mezi 29 až 44 g/TU. Tři přípravky velmi okrajově nespĺnily limit > 30 g/TU. Ke snížení limitu pro hemoglobin na OHBKT došlo z důvodu úpravy postupu kryokonzervace. Tato limitní hodnota musela být snížena kvůli menšímu objemu používaných kryokonzervačních vaků (16). Hodnotu hemoglobinu mohou ovlivnit všechny kroky kryokonzervace. Celý proces musí být co nejšetrnější, aby bylo poškození vitálních erytrocytů co nejmenší.

Limitní hodnotu pro hemoglobin v odpadu „Guide“ neudává (12). Během studie prováděné na OHBKT byla limitní hodnota nastavena na <12 g/TU (16). Tento parametr byl splněn u 49 přípravků z 50. Hodnota hemoglobinu v odpadu poskytuje informace o vitálnosti erytrocytů po rekonstituci.

Limitní hodnota hemoglobinu v supernatantu (< 0,5 g/TU) je na OHBKT vztažena k 21. dni uchovávání (16). Tento parametr splnilo všech 50 přípravků. Hemoglobin v supernatantu, podobně jako hemolýza, informuje o vitalitě erytrocytů během celé doby skladování transfuzního přípravku při 2 až 6 °C.

Na OHBKT je limitní hodnota pro hematokrit nastavena na $\geq 0,40$. Naměřené hodnoty se pohybovaly mezi 0,40 až 0,49. I tento parametr je splněn na 100 %.

Počty reziduálních leukocytů byly $0,00 \times 10^9$ buněk/TU. Nulové hodnoty byly dány deleukotizací erytrocytů před procesem kryokonzervace. Všechny měřené vzorky splňovaly limit daný „Guidem“ < $0,1 \times 10^9$ buněk/TU (12).

Hmotnosti odpadu se pohybovaly mezi 2100 g až 2518 g. Velká hmotnost je dána především použitím 2 l roztoku dextrózy použité k vymývání glycerolu z erytrocytů (19). Pro hmotnost odpadu nejsou stanoveny žádné limitní hodnoty.

Stanovenou hodnotu osmolarity (< 340 mOsm/l) splnilo všech 50 přípravků, což ukazuje na dobře zvládnutý proces deglycerolizace. Zbytkový glycerol negativně ovlivňuje hodnotu osmolarity v TP (16, 19).

I parametr hemolýzy byl splněn u všech 50 přípravků, což ukazuje na dobré přežívání erytrocytů v AS-3 Nutricel po celých 21 dní. Hodnota hemolýzy na konci doby uchovávání by měla být nižší než 1 % (16).

Cílem prezentace výsledků naměřených hodnot kvalitativních parametrů bylo dokázat, že kryokonzervované erytrocyty vyrobené na OHBKT při ÚVN splňují parametry kvality a jsou terapeuticky účinné. Naměřené hodnoty ukazují, že zavedená metodika mrazení, skladování, rozmrazení a rekonstituce je dobře zvládnuta. Výsledkem je přípravek erytrocytů, který po rozmrazení a rekonstituci má 3 týdenní dobu použitelnosti, což je významným takticko-technologickým parametrem zvyšujícím jeho užitnou hodnotu a použitelnost v armádě. Výroba kryokonzervovaných erytrocytů na OHBKT je v praxi již několik let a osvědčuje se při řešení složitých imunohematologických kazuistik i při řešení vojenské problematiky jako je zásobování polní nemocnice Armády České republiky při působení v zahraničních misích.

7 Závěr

OHBKT při ÚVN je prvním pracovištěm v České republice, kde byla kryokonzervace erytrocytů zavedena do klinické praxe a rutinního použití. Byl zaveden postup s použitím 40% glycerolu jako kryoprotektiva s následným pomalým mrazením při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dlouhodobým uchováváním při $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazicích boxech. Proces glycerolizace i deglycerolizace je řízený proces prováděný na systému Haemonetics ACP215. Jako resuspenzní roztok se používá AS-3 (Nutricel), který umožňuje skladování rozmražených erytrocytů při $2\text{ až }6\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu až 21 dní.

Metoda kryokonzervace erytrocytů se dá s úspěchem použít k zajištění strategických zásob krve, především 0 RhD negativních, ale také k vybudování banky autologních krví pro pacienty s aloprotilátkami, kvůli kterým není možné použít běžné transfuzní přípravky, nebo pro potřeby nemocných, jejichž erytrocyty nenesou antigeny s vysokou frekvencí výskytu a u nichž je vysoké riziko tvorby aloprotilátek.

Práce shrnuje problematiku kryokonzervace erytrocytů a přibližuje celý postup výroby kryokonzervovaných erytrocytů, který začíná odběrem plné krve nebo odběrem na separátoru metodou dvojitě erytrocytaferézy, přes její přípravu, glycerolizaci, mrazení a dlouhodobé uchovávání. Dále je popsán postup rozmrazení, deglycerolizace a skladování při $2\text{ až }6\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V druhé části práce je popsána problematika kontroly kvality. Dosud nejsou nikde definována jasná kritéria pro parametry kvality u takto speciálního transfuzního přípravku. Práce přibližuje proces kontroly kvality zavedený na OHBKT, který vychází jednak z Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, ale také z výsledků studie, která probíhala na tomto pracovišti v letech 2003 až 2005. Díky in vivo a in vitro měřením byla prokázána bezpečnost, kvalita a terapeutická účinnost těchto erytrocytů (16).

8 Seznam zkratek

<u>Zkratka</u>	<u>Vysvětlivka</u>
AB0	krevní skupiny: A, B, 0, AB
AEAKDZ	erytrocyty z aferézy kryokonzervované deleukotizované zmrazené pro autotransfuzi
AEKDZ	erytrocyty kryokonzervované z plné krve deleukotizované zmrazené pro autotransfuzi
anti- HCV	protilátky proti virové hepatitidě typu C
anti-HIV	protilátky proti HIV
AS-3 Nutricel	resuspenzní roztok
ATP	adenosintrifosfát
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
CPD	antikoagulační roztok
CV	variační koeficient
DMSO	dymethylsulfoxid
EA	erytrocyty z aferézy
EAD	erytrocyty z aferézy deleukotizované
EAKDZ	erytrocyty z aferézy kryokonzervované deleukotizované zmrazené
EK	erytrocyty kryokonzervované
EKDZ	erytrocyty kryokonzervované z plné krve deleukotizované zmrazené
ERD	erytrocyty resuspendované deleukotizované
g/TU	gramy/transfuzní jednotku
HBsAg	antigen virové hepatitidy typu B
HES	hydroxyethyl škrob
HIV Ag p24	HIV antigen p24
K ₃ EDTA	draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
M	molární hmotnost
mOsm/l	miliOsmol/ litr

OHBKT	oddělení hematologie, biochemie a krevní transfuze
PROH	propylenglykol
PVP	polyvinylpyrrolidon
RhD	erytrocytární antigen D
SAG-M	resuspenzní roztok
SD	směrodatná odchylka
TP	transfuzní přípravek
TU	transfuzní jednotka

9 Seznam vyobrazení

9.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Plná krev připravená k deleukotizaci	23
Obrázek 2: Glycerolizace erytrocytů na promývacím separátoru Haemonetics ACP215	23
Obrázek 3: Erytrocyty připravené ke zmrazení	24
Obrázek 4: Kryokonzervované erytrocyty.....	26
Obrázek 5: Deglycerolizace rozmrazených erytrocytů	26
Obrázek 6: Kryobanka – hlubokomrazicí boxy Jouan VX – 80 a separátory Haemonetics ACP215	27

9.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled parametrů bezpečnosti dle "Guide" a vyhlášky č. 143/2008 Sb.....	29
Tabulka 2: Parametry kvality dle „Guide“ pro přípravky Erytrocyty kryokonzervované (EK) a Erytrocyty z aferézy (EA).....	30
Tabulka 3: Přehled limitních hodnot doporučených parametrů kvality zavedených na OHBKT.....	31
Tabulka 4: Metody stanovení jednotlivých parametrů	33
Tabulka 5: Statistické údaje pro objem TP	39
Tabulka 6: Procentuální vyjádření splnění parametru - objem	39
Tabulka 7: Statistické údaje pro hemoglobin	40
Tabulka 8: Procentuální vyjádření splnění parametru - hemoglobin	40
Tabulka 9: Statistické údaje pro hemoglobin v odpadu.....	41
Tabulka 10: Procentuální vyjádření splnění parametru - hemoglobin v odpadu.....	41
Tabulka 11: Statistické údaje pro hemoglobin v supernatantu	42
Tabulka 12: Procentuální vyjádření splnění parametru - hemoglobin v supernatantu ..	42
Tabulka 13: Statistické údaje pro hematokrit	43

Tabulka 14: Procentuální vyjádření splnění parametru - hematokrit	43
Tabulka 15: Statistické údaje pro reziduální leukocyty.....	44
Tabulka 16: Procentuální vyjádření splnění parametru- reziduální leukocyty.....	44
Tabulka 17: Statistické údaje pro hmotnost odpadu	45
Tabulka 18: Statistické údaje pro osmolaritu	46
Tabulka 19: Procentuální vyjádření splnění parametru - osmolarita	46
Tabulka 20: Statistické údaje pro hemolýzu	47
Tabulka 21: Procentuální vyjádření splnění parametru - hemolýza	47

9.3 Seznam grafů

Graf 1: Naměřené objemy TP.....	39
Graf 2: Naměřené hodnoty hemoglobinu.....	40
Graf 3: Naměřené hodnoty hemoglobinu v odpadu	41
Graf 4: Naměřené hodnoty hemoglobinu v supernatantu	42
Graf 5: Naměřené hodnoty hematokritu.....	43
Graf 6: Spočítané hodnoty reziduálních leukocytů.....	44
Graf 7: Hmotnosti odpadu	45
Graf 8: Naměřené hodnoty osmolarity	46
Graf 9: Naměřené hodnoty hemolýzy	47

10 Seznam použité literatury

1. Hirsh, A. Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. *Cryobiology* 24: 214-228,
2. Storey, K.B., and Storey, J.M. Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 619-637, 1992
3. Lee, R.E., Jr., Costanzo, J.P., Davidson, E.C., and Layne, J.R., Jr. Dynamics of body water during freezing and thawing in a freeze-tolerant frog (*Rana sylvatica*). *J. therm. Biol.* 17: 263-266, 1992
4. Levin u. Miller 1981, *Cryobiology* 18, 32-48; Rail u. Fahy 1985b, *Nature* 313, 573-575
5. URL: <<http://www.eastport.cz/dodavatele-zmrazeni-a-rozmrazeni-1693.html>>[cit. 28. prosinec 2011]
6. Polge G., Smith A.U. and Parkers, A.J., (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666-669
7. Michael J.G. Thomas and Susan H. Bell, *Cryopreservation of human red blood cells*, *Methods in molecular biology*, 1995, Volume 38, *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, pages 235-250
8. Sputtek A., *Cryopreservation of red blood cells and platelets*, *Methods in molecular biology*, 2007, volume 368, 283-301, DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_20
9. Bohoněk M., Petráš M., Turek I., Urbanová J., Hrádek T., Staropražská V., Košťířová J., Horčíčková D., Duchková S., Vliv typu odběru krve na kvalitu kryokonzervovaných erytrocytů, *Transfuze Hematol. dnes*, 13, 2007, No. 4, p. 200-208
10. Standartní operační postup/DK/004/v11- Odběry plné krve, OHBKT, ÚVN Praha
11. Standartní operační postup/DK/01/v07- Provedení erythrocytaferézy na separátoru Haemonetics MCS+, OHBKT, ÚVN Praha
12. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France, 2008, ISBN: 978-92-871-6330-1
13. Standartní operační postup/zprac/014- Příprava ERD z PK pro kryokonzervaci, OHBKT, ÚVN Praha
14. Standartní operační postup/zprac/013- Příprava EAD z aferézy pro kryokonzervaci, OHBKT, ÚVN Praha
15. Standartní operační postup/zprac/010- Výroba kryokonzervovaných erytrocytů- postup kryokonzervace, OHBKT, ÚVN Praha

16. Bohoněk M., Kryokonzervace erytrocytů: vývoj a zavedení nových postupů, disertační práce, Universita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, 2007
17. Standardní operační postup/zprac/005- Výběr a předání transfuzních přípravků ke zkoušce na sterilitu OHBKT, ÚVN Praha
18. Haemonetics ACP 215, Systém automatické glycerolizace, deglycerolizace a promývání krve, Návod k obsluze, verze C
19. Standardní operační postup/zprac/011- Rozmražení a rekonstituce kryokonzervovaných erytrocytů, OHBKT, ÚVN Praha
20. Hess JR, Kagen LR, van der Meer PF, Simon T., Cardigan R., a col. Interlaboratory comparison of red cell ATP, 2,3-diphosphoglycerate and hemolysis measurements, Vox Sang., 2005 Jul, 89(1):44-8
21. 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
22. Valeri CR., Pivacek LE., Cassidy GP., Ragno G., In vitro and in vitro measurements of gamma-radiated, frozen, glycerolized RBCs, Transfusion, 2001 Apr, 41(4):545-9
23. Standardní operační postup/Hem/005/v04- Počítání krevních elementů v Nageotteově komůrce
24. Hess JR, Hill HR, Oliver CK, Lippert LE, Greenwalt TJ, The effect of two additive solutions on the postthaw storage of RBCs, Transfusion, 2011 Jul; 41(7):923 – 7
25. Hess JR, Thomas MJ, Blood use in war and disaster: lessons from the past century, Transfusion, 2003 Nov. ; 41(11): 1622- 33
26. Valeri CR, Pivace LE, Cassidy GP, Rango G., The survival, function, and hemolysis of human RBCs stored at 4 °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 °C in sodium chloride and glucose solution for 24 hours, Transfusion, 2000, Nov.; 40(11): 1341 – 5
27. Huggins CE, Frozen blood, Eurp. surg. Res., 1969; 1:3 – 12
28. Lionetti, F.J. and Hunt, S.M., „Cryopreservation of human red cells in liquid nitrogen with hydroxyethyl starch“, Cryobiology, 1975; 12:110 – 118
29. Wowk B., How cryoprotectants work, Cryonics, special edition, 3 quarter 2007, volume 28:3
30. Pecka M., Laboratorní hematologie v přehledu, Buňka a krev tvořba, Finidr s.r.o., český Těšín, 2002

31. The appropriate tole of frozen – stored red blood cells in transfusion practice, World, J. Surg, 1987; 11:68 – 68
32. Cash JD, Frozen red cells, Clinics in Haematology, 1976 (5); 1 (Blood Transfusion and Blood Products): 53 – 58
33. Meryman HT, Hornblower M, A method for freeting and washing red blood cells using a high glycerol concentration, Transfusion, 1972; 12 (3): 145- 156
34. Pert JH, Schork PK, Moore R, A new method of low temperature blood preservation using liquid nitrogen and glycerol sucrose additive, Clinical Research, 1963; 11: 197
35. Pert JH, Schork PK, Moore R, Low- Temperature Preservation of Human Erythrocytes, Proc. 10th Congr. int. Soc. Blood Transf., Stockholm 1964; 674 – 682
36. Mitchell P, Muir W, Storage, retrieval, and inventory control of donor red cells in liquid nitrogen, J. clin. Path., 1972; 25:487- 490
37. Tullis JL, Ketchei MM, Pyle HM, Penneli GB, Gibson JG, Tinch RJ, Studies on the in vivo survival of glycerolised and frozen human red blood cells, J. of the Am. Med. Association, 1958; 168: 399- 404
38. Vyhláška č. 143/2008 Sb. - o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (vyhláška o lidské krvi)
39. Specifikace materiálu – Odběrová souprava čtyřvak OptiPure WB Fenwal, SP/MA/004/v 01
40. Specifikace materiálu – SAG – M Red Cell Preservative Solution Saline Adenine Glukose, Haemonetics – SP/Ma/008/v 02
41. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2007_03 ze dne 12. 4. 2007 verze 6 (2012_04)
42. Specifikace materiálu - Souprava na dvojitou erythrocytaferézu s filtrem Filtered Single Red Cell, LN 948, Haemonetics – SP/Ma/006/v03
43. Specifikace materiálu – Antikoagulační roztok CPD – 50 – SP/Ma/005/v 02
44. Standardní operační postup /Zprac/019/v 02 – Extrakce krevních složek na zařízení MacoPress Smart
45. Standardní operační postup /Zprac/020/v 01 – Příprava EBR a ERD aditivované pro kryokonzervaci
46. Specifikace materiálu – 0,2 % Dextrose and 0,9 % Sodium Chloride Processing Solution – SP/Ma/31/v 01
47. Specifikace materiálu – Aditive Solution Formula 3 /AS – 3/ Nutricel – SP/Ma/29/v 01
48. Návod k obsluze analyzátoru Abbott Architect i2000

49. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2009_05 ze dne 15. 5. 2009 verze 2 (2012_01)
50. Standardní operační postup /DK/012/v 04 – Vzorkování pro potřeby validace a kontroly kvality erytrocytů kryokonzervovaných
51. Návod k obsluze analyzátoru Sysmex XT 2000i
52. Fahy GM, Cryobiology: The Study of Life and Death at Low Temperatures
53. Tullis JL, Haynes L, Pyle H, Wallach S, Pennell R, Sproul M, Khoubesserian A, Clinical use of frozen blood, Arch.Surg., 1960, 81:169
54. Tullis JL, Ketcher MM, Pyle HM, Pennell GB, Gibson JG, Tinch RJ, Studies on the in vivo survival of glycerolized and frozen human red blood cells, J.of the Am.Med.Association, 1958; 168:399-404
55. Commission Directive 2004/33/EC of March 2004, Annex IV.