

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
FAKULTNÍ NEMOCNICE HRADEC KRÁLOVÉ

**AUTOMATIZOVANÉ MULTIKOMPONENTNÍ
ODBĚRY SLOŽEK KRVE**

MUDR. RENATA PROCHÁZKOVÁ



DOKTORSKÝ STUDIJNÍ PROGRAM: VNITŘNÍ NEMOCI

HRADEC KRÁLOVÉ, 2008

Práce byla zčásti podporována grantem IGA MZ ČR NR/8015-3.

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Vnitřní nemoci na Oddělení klinické hematologie při II. interní klinice Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

UCHAZEČ : MUDR. RENATA PROCHÁZKOVÁ

Transfuzní oddělení

Krajská nemocnice Liberec

ŠKOLITEL : PROF. MUDR. MILAN BLÁHA, CSC.

II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Fakultní nemocnice Hradec Králové

ŠKOLITEL – KONZULTANT : PROF. MUDR. STANISLAV FILIP, PHD.

Klinika onkologie a radioterapie

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Fakultní nemocnice Hradec Králové

Poděkování

V úvodu této práce bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli nápomocni při jejím vypracování.

Děkuji zejména svému školiteli prof. MUDr. Milanu Bláhovi, CSc., jehož odborné vedení a cenné rady a připomínky mi byly velkým přínosem po celou dobu vytváření této dizertační práce. Dále moje poděkování patří RNDr. Lence Hubáčkové z transfuzního oddělení KN Liberec za statistické zpracování dat. Další poděkování patří RNDr. Lence Řehořové, Jaroslavě Jiroušové a Ivaně Veselé z transfuzního oddělení KN Liberec za spolupráci při přípravě a realizaci projektu.

Obsah

1. Úvod	5
1.1. Principy krevního dárce	5
1.2. Multikomponentní odběry – popis	6
1.3. Výběrová kritéria pro dárce krve.....	9
1.4. Vliv aferéz na dárce krve.....	11
1.5. Jakost transfuzních přípravků.....	14
2. Cíle práce.....	20
3. Metodika.....	20
3.1. Krevní separátory a odběrové protokoly.....	21
3.2. Soubor dárců.....	23
3.3. Hodnocené parametry.....	25
3.4. Laboratorní analýza.....	26
3.5. Kontrolní soubor	28
3.6. Statistické metody.....	29
4. Výsledky.....	29
4.1. Aferetické parametry.....	29
4.2. Vliv aferéz na dárce krve.....	32
4.3. Jakost transfuzních přípravků.....	41
4.4. Vstupní kritéria pro dárce krve.....	51
5. Rozprava.....	53
5.1. Vliv metodiky na zdravotní stav dárce.....	53
5.2. Jakost transfuzních přípravků.....	54
5.3. Výběrová kritéria pro dárce krve.....	61
5.4. Indikační kritéria pro transfuzní přípravky.....	63
5.5. Ekonomické hledisko	63
5.6. Výhled do budoucna.....	63
6. Splnění cílů práce.....	64
7. Závěr.....	66
8. Souhrn.....	67
9. Literatura.....	69
10. Seznam zkratk.....	82
11. Seznam ilustrací.....	84

1. Úvod

Léčba krví má dlouhou a zajímavou historii, která se vyvíjela od původních primitivních a mystických představ až po vědecky zdůvodněné metody dnešní hemoterapie. Krev byla vždy považována za zázračnou tekutinu, již Empedokles 400 let p.n.l. napsal, že krev je život. Nicméně až objev krevního oběhu W. Harveyem r. 1616 položil základ vědeckého poznání v této oblasti medicíny. První historicky doložený krevní převod provedl R. Lower v Oxfordu. Konec 17. století byl ve znamení pokusů o aplikaci zvířecí krve, poprvé v roce 1677 podal J. Denis člověku jehněčí krev. První převod lidské krve uskutečnil v roce 1816 J. Blundel. Až ve 20. století došlo k řadě objevů, které zásadním způsobem ovlivnily rozvoj transfuzního lékařství. Zásadní přelom znamenal objev krevních skupin K. Landsteinerem v roce 1901 (přehled viz v: 54). Mezi další patří použití citronanu sodného jako antikoagulační látky v roce 1915 a objev roztoku ACD, který umožnil skladovat odebranou krev 21 dnů, vývoj plastických hmot pro výrobu krevních vaků a vývoj kompletních uzavřených souprav pro odběr a kompletní zpracování odebrané krve (33).

Principy krevního dárčovství

Transfuzní přípravky pro zajištění hemoterapie je možné získávat klasickými odběry plné krve a jejím následným zpracováním, anebo aferetickými technikami. Cílem obou způsobů je získání transfuzního přípravku požadované jakosti a minimalizace vlivu odběru na zdravotní stav dárce krve.

Při běžném odběru se odebírá 400 – 500 ml plné krve. Krev se odebírá a dále zpracovává v systémech uzavřených vaků. K oddělení jednotlivých složek krve se používají vysoce účinné centrifugy, vlastní separace jednotlivých komponent se provádí pomocí poloautomatické techniky. Z plné krve se obvykle připravují erytrocytové koncentráty, plasma a koncentráty krevních destiček. Výběr komponent ani jejich dávku nelze již během zpracování ovlivnit (33). K výběru dárců jsou používána doporučená kritéria, obvykle stanovená národními předpisy (Věstník MZ ČR 140), které byly po roce 1989 doplněny o požadavky Rady Evropy (38).

Jiným způsobem darování krve je „in-line“ odběr krevních komponent pomocí separátorů krevních elementů. K separaci krve na jednotlivé složky dochází obvykle pomocí centrifugačního principu, méně často se používá filtrační technika. Dárci se odebírá krev ze žíly, extrakorporálně se antikoaguluje a vede do přístroje, v němž se v gravitačním poli centrifugy rozdělí podle specifické hustoty jednotlivých složek. Odebírané komponenty se

poté sbírají do sběrného vaku, složky krve, které nejsou předmětem sběru se vrací zpět dárci. Předem lze navolit, jaké složky krve se budou separovat. Separální technikou lze také navolit i jejich dávku (33).

1.2. Multikomponentní odběry – popis

Nový trend představují multikomponentní odběry krve (MKO), které přinesl vývoj moderních krevních separátorů v 90. letech 20. století (74,75,136). Umožňují odběr více transfuzních jednotek (TU) krevních složek od jednoho dárce při jednom odběru v různých kombinacích (72,84). Metoda byla poprvé představena na kongresu European Society for Hemapheresis v roce 1993 v Aberdeenu, americkou FDA byl nejprve povolen odběr 1 TU erytrocytů a 2 TU plásmy (1995), po té odběr 2 TU autologních erytrocytů v roce 1996 a roku 1997 odběr 2 TU alogenních erytrocytů (72). Vývoj tohoto typu odběrů probíhal současně se zvyšujícími se požadavky na množství a jakost transfuzních přípravků, které přinesly nové léčebné postupy, zejména v hematologii (1,9). Metoda umožňuje přípravu standardizovaných transfuzních přípravků vysoké jakosti (72,74), přináší výhody pro pacienty i transfuzní pracoviště, představuje v současné době moderní alternativu k dárcovství plné krve (11, 127,128,141).

U pacientů aplikace více transfuzních přípravků od jednoho dárce snižuje počet dárců, jimž je pacient exponován, a tím snižuje riziko přenosu infekce (65,126), snižuje možnost imunizace hemoterapií zejména u polytransfundovaných pacientů, umožňuje bezpečnější pokračování v léčbě již imunizovaných nemocných výběrem fenotypově shodných dárců krve či usnadňuje vyhledávání CMV negativních dárců v indikovaných případech (65,110,111). Většinou jsou aplikovány přípravky s nízkým obsah leukocytů a jimi uvolňovaných cytokinů. Tím se snižuje výskyt nehemolytických febrilních potransfuzních reakcí (103,107,131). Předpokládá se i snížení možných septických komplikací, zejména po aplikaci trombocytů (79) a zvláště u imunokompromitovaných pacientů (56,57). Koncentráty erytrocytů standardní jakosti obsahují vyšší terapeutickou dávku hemoglobinu, tím se prodlužuje interval mezi následnými transfuzemi u polytransfundovaných pacientů (50,60). Výhodná může být i při autotransfuzích (32,46). Pro transfuzní pracoviště metoda přináší zvýšení flexibility, umožňuje lepší organizaci odběrů podle aktuálních požadavků (9) a racionální využití dárcovské základny (72). Metoda MKO umožňuje odběr více jednotek na základě klinických indikací, jako jsou požadavky na fenotypově shodné erytrocyty (59), CMV-negativní produkty (65,111), HLA shodné trombocyty či transfuzní přípravky (TP) s nízkým obsahem IgA (31). Přínosem je také možnost přípravy dvou transfuzních jednotek trombocytů nebo

erytrocytů, zejména při chronickém nedostatku dárců a stoupajícím nárokům na jejich výběr (36). Výsledkem MKO je transfuzní přípravek ve finální formě, s konsistentním objemem a obsahem hemoglobinu (Hb). Není již potřeba další nákladná technika a pracovní síla na následné zpracování, jako tomu je u plné krve (28,76). Metoda je jen relativně nákladná, její ekonomická výhodnost (kostefektivita) odpovídá použitému protokolu a přispívá k ekonomizaci provozu aferetické jednotky (72).

Popis metody: Metoda představuje několik desítek minut (35 – 110 min.) trvající odběr na krevním separátoru (65,106), kterým projde cca 1/2 celkového krevního objemu dárce. Tento objem je mimo tělo dárce odváděn speciálním setem intermitentně v cyklech po cca 250 ml krve anebo průběžně kontinuální aferézou. Během tohoto procesu je krev dárce vystavena kontaktu s odběrovým materiálem a centrifugaci cca 3000 - 7000 otáček (110). Do krevního oběhu dárce se vrací složky krve, které nejsou předmětem sběru. Při dvojité erythrocytaferéze a odběrech převyšujících 650 ml (počítáno bez antikoagulačního roztoku) je nutná objemová náhrada (38). Možné kombinace odběrů uvádí **tab. č. 1**. Autoři se nejvíce soustředí na současný odběr krevních buněk - 2 TU erytrocytů (RBC) nebo 2 TU trombocytů (TA), resp. kombinaci odběru erytrocytů a trombocytů (9,72), ojedinele práce popisují odběr až 600 ml erytrocytů (128) s cílem získat co nejvyšší terapeutickou dávku od jednoho dárce. Současný odběr plasmy (PA) není prioritou, obvykle je získávána pro svou kvalitu a ekonomický efekt (101,142).

Tab. č. 1 Možné kombinace multikomponentních odběrů

	Trombocyty		Plasma		Erytrocyty	
1	TA		PA			
2	TA	TA				
3	TA	TA	PA			
4	TA	TA			RBC	
5	TA	TA	PA		RBC	
6	TA	TA	TA			
7	TA				RBC	
8	TA		PA		RBC	
9			PA	PA		
10			PA		RBC	
11			PA		RBC	RBC
12					RBC	RBC

Legenda: TA: trombocyty, PA: plasma, RBC: erytrocyty, TU: transfuzní jednotka
 Upraveno dle: Matthes G. A. Options and cost effectiveness of multicomponent blood collection.
 Transfus Apher Sci 2002; 27: 115 a Blanco L. Tailored collection of multicomponent by apheresis.
 Transfus Apher Sci 2002; 27: 123-127.

V současné době lze MKO provádět na několika typech krevních separátorů (113,116) (tab. č. 2), možný je odběr ze dvou žil nebo jen z jedné. U přístrojů je mimo jiné možné volit odběrovou i návratovou rychlost krve a tím i modifikovat předpokládaný čas aferézy. K antikoagulaci jsou používány roztoky ACD-A a AB - 16 pro přípravu trombocytů, resp. erytrocytů, CPD-50 a SAGM pro přípravu erytrocytů (tab. č. 3). Přednostně jsou získávány deleukotizované přípravky, dle typu přístroje lze připravit trombocyty deleukotizované přímo procedurou (leukoredukční Cobe Trima, Amicus Baxter) nebo následně filtrované (Haemonetics MCS+), erytrocyty jsou následně in-line deleukotizovány u všech typů separátorů.

Tab. č. 2 Separátory pro multikomponentní odběry

Přístroj		Odběrové protokoly
MCS +	Haemonetics	RBC, RBC+PA, RBC+ TA, TA+ PA
Excel ^{pro}	Dideco	RBC, RBC+PA, RBC+ TA, TA+ PA
Trima Accel	Gambro	RBC, RBC+ TA, TA+ PA
Amicus Crescendo	Baxter	RBC+PA+ TA, RBC+ PA
Alyx	Baxter	RBC

Legenda: RBC: erytrocyty, TA: trombocyty, PA: plasma

Upraveno dle: Matthes G. A. Options and cost effectiveness of multicomponent blood collection. *Transfus Apher Sci* 2002; 27: 115 -121.

Tab. č. 3 Antikoagulační a skladovací roztoky

CPD- 50 Antikoagulant Solution		g	SAG-M Red Cell Preservative Solut		g
Natrii citras dihydricus		39,5	Sodium Chlorid		8,77
Acidum citricum		4,48	Adeninum		0,169
Glucosum monohydricum		50,0	Glucosum monohydricum		9,0
Natrii dihydrogenophosphas		3,76	Mannitol		5,25
Aqua pro injectione	do	1000 ml	Aqua pro injectione	do	1000 ml
Odběr erytrocytů na separátoru Haemonetics MCS+			Skladovací roztok pro erytrocyty, 100 ml na jednotku		
Poměr 1:16					
AB-16		g	ACD-A		g
Natrii citras dihydricus		35,6	Natrii citras dihydricus		22,0
Acidum citricum monohydricum		12,6	Acidum citricum monohydricum		8,0
Glucosum monohydricum		51,0	Glucosum monohydricum		24,5
Aqua pro injectione	do	1000 ml	Aqua pro injectione	do	1000 ml
Odběr trombocytů na separátoru Haemonetics MCS+			Odběr trombocytů a erytrocytů na separátoru Trima Accel		
Poměr 1:15			Poměr 1:10		

Důležité je věnovat pozornost dávatce odebíraných komponent v jednotce odebíraných produktů, se kterou autor pracuje. Řada autorů uvádí transfuzní jednotku (TU) o počtu trombocytů $> 350 \times 10^9$ (9), jiní pracují s velikostí TU $> 200 \times 10^9$ dle Doporučení Rady Evropy (75). Z uvedeného je patrný podstatný rozdíl ve velikosti 2 jednotek trombocytů ($400 - 700 \times 10^9$). V práci nadále používáme jako 1 TU koncentrát, kde je počet trombocytů větší než 200×10^9 PLT. Plasma je obvykle odebírána v množství 230 ml na 1 TU, 460 ml při odběru 2 TU, objem odebraných erytrocytů kolísá mezi 180 – 230 ml v 1 TU.

1.3. Výběrová kritéria pro dárce krve

Výběrová kritéria pro dárce krve pro multikomponentní odběry nejsou dosud sjednocena. Někteří autoři postupují dle Doporučení Rady Evropy (38), jiní dle kritérií FDA, která jsou volnější (47) nebo dle jejich kombinací s národními kritérii pro aferézy (9, 128).

Při výběru dárců je třeba respektovat základní pravidla pro aferetické odběry dle Doporučení Rady Evropy (38): anamnéza bez krvácivých epizod, retence tekutin a bez nežádoucích účinků předchozích odběrů. Předodběrový počet trombocytů u trombocytferézy má být vyšší než $150 \times 10^9/L$, je doporučeno vyšetření bílkovinného spektra 1x ročně, celkové množství plasmy odebrané za 1 rok nesmí převýšit 15 litrů. Při jedné aferéze nelze odebrat více než 13 % celkového objemu krve (TBV) a 650 ml bez objemové náhrady. Mimo tato kritéria je třeba dodržet i další parametry: pro odběr 1 TU erytrocytů samostatně nebo se současným odběrem trombocytů a/nebo plasmy je doporučeno vyšetření Hb nebo Ht dárce před odběrem. Stanoveny jsou i intervaly mezi jednotlivými typy odběrů. Mezi dvojitou erytrocytaferézou je doporučen interval 6 měsíců, odběr trombocytů nebo plasmy může následovat po odběru 1 nebo 2 TU erytrocytů za 30 dnů, po odběru trombocytů nebo plasmy za 14 dnů. Odběr 1 nebo 2 TU erytrocytů po odběru plasmy či trombocytů je možný již za dva dny. Pro odběr 2 TU erytrocytů jsou stanovena podrobná výběrová kritéria, porovnání kritérií Rady Evropy a FDA pro dvojitou erytrocytaferézu uvádí **tab. č. 4**. Cílem takto stanovených kritérií pro dvojitou erytrocytaferézu je prevence symptomatické anemie po odběru (110). Někteří němečtí autoři vybírají pro všechny typy MKO dárce s TBV $> 4\ 350$ ml, maximální extrakorporální objem může činit 15 % TBV, dvojitou erytrocytaferézou nesmí být odebráno více než 22,5 % celkové erytrocytární masy. Mají vypracována dárcovská kritéria pro různé odběrové protokoly (72). Zde překvapí vysoká frekvence odběrů TU erytrocytů za rok, minimální interval mezi odběry 1 TU RBC je 63 dnů.

Tab. č. 4 Výběrová kritéria pro odběr 2 jednotek erytrocytů

Parametry		FDA "	Rada Evropy	
TBV	(ml)	-	> 5000	
Váha	(kg)	muži > 59	> 70	
		ženy > 68		
Výška	(cm)	muži > 155	-	
		ženy > 168		
Hematokrit		> 0,40	> 0,42	> 0,30 *
Hemoglobin	(g/L)	> 133	> 140	> 110 *
Interval mezi odběry		16 týdnů	6 měsíců	

Legenda: * limit hodnot po odběru

Upraveno dle: * Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 10th ed. Strasburg: Council of Europe Publishing, 2004 a **Hogler W., Mayer W., Messmer Ch. et. al. Prolonged iron depletion after allogeneic 2-unit apheresis. Transfusion 2001; 41: 602 – 605.

Poněkud odlišně jsou pojata dárcovská vstupní kritéria v Centro De Transfusion v Madridu. Pro odběry 2 TU RBC jsou respektována Doporučení Rady Evropy, pro ostatní MKO je dárce vybírán dle vztahu TBV a počtu trombocytů dárce. Pro odběry trombocytů a plasmy jsou preferováni dárce krevních skupin B a AB, pro odběry erytrocytů dárce krevních skupin 0 a A (9), podobně postupuje italská transfúzní služba (16). Pro kombinovaný odběr erytrocytů a trombocytů na separátoru Excel-Pro (Dideco) Valbonesi stanovil tato dárcovská kritéria: váha > 75 kg, počet trombocytů > 280 x 10⁹/L, Hb > 145 g/L u mužů, > 140 g/L u žen (128).

Vyšetření hladiny feritinu je doporučeno jako marker výběru a sledování dárce pro odběry 2 TU RBC (16,47), obecná doporučená hodnota zatím stanovena nebyla, italští autoři doporučují hladinu feritinu pro dvojitou erytrocytaferézu > 50 µg/L a pro kombinovaný odběr 1 TU RBC s plasmou > 20 µg/L (16). Diskutována je preventivní substituce železa, při které dochází k rekonstituci zásob Fe dříve než u dárců, kteří tuto substituci nedostávají, proto je některými autory doporučována zejména při 16-ti týdenním intervalu mezi odběry (47,110). Jiní autoři upozorňují na nutnost pečlivého sledování dárců, aby nedošlo k přehlédnutí závažné choroby (77).

Lze tedy konstatovat, že jednotná vstupní kritéria pro dárce krve pro MKO zatím nejsou stanovena. Jako nutné se ukazuje hodnotit více vstupních ukazatelů zdravotního stavu dárce krve, např. TBV, feritin u dvojitych erythrocytaferéz (65,75), předodběrový počet trombocytů dárce ve vztahu k TBV a hodnotu celkové bílkoviny (9,72). Dalším limitujícím faktorem se ukazuje být délka procedury, zejména u dobrovolných bezplatných dárců krve. Je nasnadě, že někteří autoři předpokládají revizi, resp. doplnění guidelines pro tento typ odběrů (72).

1.4. Vliv aferéz na dárce krve

Dle současných znalostí a zkušeností je metoda považována pro dárce krve za bezpečnou (28,72), jsou aplikovány poznatky z klasických aferéz a zkušenosti získané s novou metodou (66, 141). Nový způsob odběru je dárci kladně přijímán (83). Nicméně je nutno očekávat vedlejší efekty procedury, a to krátkodobé i dlouhodobé.

1.4.1. Přímé účinky aferéz na dárce

Mezi krátkodobé efekty aferéz na dárce patří například bolest při vpichu, hematomy, oběhové reakce, vliv citrátového antikoagulans, pocity chladu a další (10). U MKO je spektrum jejich výskytu podobné, výskyt oběhových reakcí bývá i nižší než u dárců plné krve, protože při aferéze nedochází k náhlé ztrátě objemu (31). Komplexní porovnání výskytu nežádoucích účinků s odběry plné krve je obtížné. Literární zdroje směru nepodávají dostatečné informace o výskytu komplikací odběrů při odběrech plné krve (80). Dvojitá erythrocytaferéza je dobře snášena, vzhledem k odběru cca 350 – 400 ml erythrocytů je incidence přímých vedlejších účinků u erythrocytaferézy podobná jako u odběrů plné krve (51,75). U zdravých dárců se po odběru 2 TU RBC nedostavují symptomy anemie či změny krevního tlaku (110).

Vedlejší efekt citrátového antikoagulans může vyskytovat až u 15 % aferéz. Projevuje se v několika stupních, od cirkumorální parestezie, brnění, svalových záškubů, nausey až po synkopy a tetanické křeče (37). Projevit se může i prodloužením QT intervalu na ekg (64,73). Příčinou může být zvýšená plasmatická hladina citrátu, způsobená zvýšeným poměrem antikoagulans ke krvi a také kolísáním hladiny antikoagulans v plasmě (37). Zvýšená koncentrace citrátu s sebou následně přináší významné snížení hladiny ionizovaného kalcia a magnézia, v rozmezí 33-39 % pod fyziologické hodnoty. Hladina parathormonu se zvyšuje po

30-ti minutách trvání aferézy. Současně je zvýšena exkrece citrátu, kalcia, magnézia, koncentrace sodíku a draslíku v moči během celé aferézy (12). Příčinou citrátové reakce může být i vysoká rychlost návratu plasmy s obsahem citrátu dárce (69). Prevencí je v běžné praxi podávání kalcia v perorální i intravenosní formě, avšak možnost reakcí zcela eliminována není (15,13,14,30). Vzhledem k délce odběru a množství použitého antikoagulans u některých typů MKO by bylo možno předpokládat vyšší výskyt vedlejších reakcí, avšak literatura je zatím neuvádí.

Incidence vasovagálních reakcí je vyšší u žen, aferetických dárcyň nad 45 let a zvyšuje se s opakujícími cykly aferéz. Příčinou může být nižší TBV u žen či vyšší senzitivita baroreceptorů (123).

U odběrů plné krve upozorňuje na možnou prokoagulační aktivaci buněk stykem krve s odběrovým materiálem zvýšená hladina annexinu V a P-selektinu (34). Při aferetických odběrech dochází k dlouhotrvajícímu kontaktu s odběrovým materiálem, analogicky tedy lze podobnou aktivaci buněk předpokládat. U běžné trombocytaferézy byly sledovány vlastnosti neutrofilů navracených dárce a hladina aktivovaného komplementu C3a a C5a, která změněna nebyla. Lehké zvýšení hodnot CD11 po aferéze bylo zaznamenáno u tří typů separátorů, stejně jako tendence ke zvýšení fagocytární aktivity (138). U multikomponentních odběrů jsme informace o možném vlivu dlouhodobého kontaktu krve s odběrovým materiálem na krevní buňky při aferéze v dostupné literatuře nenalezli.

1.4.2. Dlouhodobé účinky aferézy na dárce

Vývoj parametrů krevního obrazu a metabolismu železa

Z dlouhodobých účinků MKO byla sledována zejména „hematologická recovery“ a parametry metabolismu železa u dvojité erythrocytaferéz: hodnoty hemoglobinu, retikulocytů, trombocytů, plasmatická hladina železa, transferinu, feritinu, saturace transferinu a hladina endogenního erythropoetinu. Snížení hodnoty Hb (z $158,9 \pm 8,2$ na $140,8 \pm 9,7$ g/L) bylo nejvýznamnější 7 dnů po odběru a přetrvávalo ještě 30. den po odběru. Vrchol vzestupu retikulocytů a erythropoetinu se projevil 1. až 7. den po odběru, stejně jako snížení plasmatické hladiny železa, které v tyto dny bylo nejvýznamnější (z $18,48 \pm 4,66$ na $14,36 \pm 4,45$ $\mu\text{mol/L}$). K úplné úpravě hematologických parametrů na předodběrové hodnoty dochází do 70 dnů, k regeneraci zásob železa nikoli (tab č. 5) (47), snížení hladiny feritinu na 12 $\mu\text{g/L}$ bylo zaznamenáno ještě za 16 týdnů po dvojité erythrocytaferéze (110).

Tab. č. 5 Parametry krevního obrazu a zásob železa po dvojitě erythrocytaferéze

Parametr	Den po odběru					
	1	7	30	60	90	120
Hb	↓	↓↓	↓	N		
Retikulocyty	↑	↑↑	↑	N		
Erythropoetin	↑↑↑	↑↑	↑	↑	↑	↑
Fe v séru		↓↓	↓	N		
Feritin		↓	↓↓	↓	↓	↓
Transferin		↑	↑	↑↑	↑	↑
Trombocyty	↑	↑↑	↑	↑	↑	↑

Upraveno dle Hogler W., Mayer W., Messmer Ch. et al. Prolonged iron depletion after allogenic 2-unit apheresis. *Transfusion* 2001; 41: 602-605.

Ztráta železa při dvojitém odběru erytrocytů je cca 320 - 420 mg (110). Tato ztráta je podobná i u běžného dárcovství, kde při jednom odběru plné krve dochází k ztrátě cca 200 mg železa (Fe), roční ztráta Fe u shodné frekvence odběrů by tedy měla být stejná (91). Řada autorů považuje za známku sideropenie u dárců krve hladinu feritinu pod 12 µg/L (5,16). Vyšetření hladiny feritinu je proto některými autory doporučeno i jako marker monitorování dárce dvojitých erythrocytaferéz (16,47). Ve 12. vydání Doporučení Rady Evropy je monitorování zásob železa u dárců krve nově doporučeno, avšak pouze v obecné rovině (39).

Diskutována je preventivní substituce železa, při které dochází k rekonstituci zásob Fe dříve než u dárců, kteří tuto substituci nedostávají (47), proto je některými autory doporučována, zejména při 16 - ti týdenním intervalu mezi odběry (110). Dvojitá erythrocytaferéza je považována řadou autorů za bezpečnou při suplementaci preparáty železa jako prevence možné sideropenie (30,110). Tato doporučení nejsou jednotná, protože ztráta železa je podobná jako u častých dárců plné krve, kde preventivní substituce v řadě případů není doporučována vůbec, anebo na podkladě jasných pravidel (informovaný souhlas, informace praktického lékaře o medikaci preparáty Fe, nad 40 let preparáty Fe preventivně nepodávat vzhledem k riziku přehlédnutí nádorů) (112). Lze najít doporučení suplementace Fe v dávce cca 15 mg denně dietetickými či vitamínovými přípravky (17) anebo podávání minidávek preparátů Fe (29). Tyto minidávky mohou kompenzovat ztráty železa při frekventním dárcovství plné krve (91).

Je třeba zdůraznit nutnost pečlivého hodnocení zdravotního stavu dárců zejména dvojitých erythrocytaferéz, s důrazem na stanovení příčiny deficitu železa, aby nebyla přehlédnuta závažná choroba (72,119,121). Je třeba zvažovat i vedlejší efekt medikace. Důležité je identifikovat dárcce krve s latentní sideropenií (29). Citlivým parametrem latentního nedostatku železa je stanovení solubilního transferinového receptoru v séru (sTfR) (23,24,55,85), které je také některými autory doporučováno u dárcovství plné krve (29) či u pacientů podstupujících předoperační odběr autotransfuze (26). Z uvedeného vyplývá, že otázka monitorování zásob železa a jeho preventivní substituce je široce diskutována, ale názory nejsou jednotné.

Pro vysokou frekvenci aferetických odběrů s odběrem plasmy je limitujícím faktorem ztráta bílkovin a její úprava (124). Limity na roční množství odebrané plasmy jsou dle různých doporučení odlišné. Dle Doporučení Rady Evropy je to 15 L plasmy ročně (38), dle německých kritérií 25 L plasmy ročně (124), intenzivní režimy dovolují odebrat až 45 L plasmy ročně. Předmětem zájmu v současné době je zejména vliv dlouhodobých intenzivních plasmaferetických programů na hladiny plasmatických bílkovin. Některé studie konstatují, že ani při dlouhodobých intenzivních aferetických programech nedochází k depleci plasmatických bílkovin, imunoglobulinů či koagulačních faktorů a není ovlivněn stav buněčné ani humorální imunity (5,124). Dle jiných autorů je však možný vývoj deplece lymfocytů, jejíž zdravotní význam není zatím znám (31). V běžné praxi je pro dárcce plasmy doporučeno monitorování hladiny celkové bílkoviny, albuminu a/nebo imunoglobulinu G 1x ročně (38).

Komplexní dlouhodobé sledování zdravotního stavu dárců MKO zatím nebylo publikováno, studie byly zaměřeny zejména na úpravu hematologických parametrů po dvojitých erythrocytaferézách a obnovu zásob železa.

1.5. Jakost transfuzních přípravků

Nedílnou součástí výroby transfuzních přípravků je docílení jejich predikované jakosti.

1.5.1. Základní parametry jakosti

Standardně jsou sledovány **základní parametry jakosti**. Hodnocen je obsah účinné látky: u koncentrátů erythrocytů obsah hemoglobinu a hematokrit, u koncentrátů trombocytů jejich počet v transfuzní jednotce, dále buněčná kontaminace přípravků, zejména obsah leukocytů (38). Tyto parametry slouží pro standardní kontrolu výroby na transfuzních odděleních, pro jejich hodnocení je důležitá standardizace odběru vzorků (108). Mezi

základní parametry jakosti TP patří i povinné vyšetření na předepsané virové markery a imunohematologické vyšetření (38, 144).

1.5.2. Speciální parametry jakosti

Krevní buňky podléhají během odběru, zpracování a skladování významným morfologickým a biochemickým změnám. Struktura a funkce krevních buněk jsou ovlivněny řadou faktorů, počínaje technikou odběru, složením antikoagulačního roztoku, kontaktem s povrchem odběrového vaku či setu, metodou zpracování a obsahem leukocytů v produktu, či způsobem leukofiltrace (34,40,102,104,114,118). Metabolické a morfologické alterace u erytrocytů i trombocytů v koncentrátech limitují jejich skladovatelnost a dle některých autorů mohou asociovat se snížením potransfuzní recovery in vivo (7,22,86). Některé z těchto změn jsou reversibilní a jiné ne (114). Všechny mechanismy vedoucí k poškození krevních buněk během odběru a skladování nejsou dosud plně objasněny (86). Pro hodnocení těchto složitých změn neexistují jednoduché a spolehlivé testy.

V běžné praxi se používají jednoduché testy in vitro, jako je stanovení stupně hemolýzy u koncentrátů erytrocytů, pH a swirling fenomén u koncentrátů trombocytů (38,115). Pro procesní validaci nových postupů je přínosné použití testů reflektujících změny v buněčné morfologii, biochemickém stavu buněk, kvantifikaci buněčných mikropartikulí, expresi markerů aktivace či externalizace fosfatidyserinu na buněčné membráně (114).

Krevní buňky, přestože jsou bezjaderné, podléhají během skladování apoptóze (27), procesu programované řízené buněčné smrti (6), ke které dochází přirozeně stárnutím krevních buněk během skladování (63), a tento proces může být ovlivněn řadou faktorů během odběru a zpracování krve (65). U trombocytů v koncentrátech má na uvedený proces navíc vliv i jejich vysoká senzitivita na stimuly během procesu přípravy, erytrocyty mohou být ovlivněny osmotickým šokem při kontaktu odebírané krve s hyperosmolárním antikoagulačním roztokem („red cell collection injury“) (35). Proces je doprovázen řadou morfologických a metabolických změn. Morfologické změny u trombocytů se projevují změnou diskoidního tvaru ve sférický (68,104). Erytrocyty následkem zejména deplece adenosintrifosfátu (ATP) mění diskoidní tvar v echinocyt (139). Metabolické alterace krevních buněk se odráží ve změnách pH, zvýšení LDH v supernatantu, v konzumpci glukózy a produkci laktátu (43,56,71,78). Dochází k uvolnění TGF- β , externalizaci fosfatidylserinu na povrch buněčné membrány (22,86,114), u trombocytů navíc k expresi markerů aktivace. Fosfatidylserin je fyziologicky lokalizován na cytoplasmatické straně

plasmatické membrány. V buňkách, které podléhají apoptóze, se fosfatidylserin translokuje na extracelulární stranu trombocytu při skladovací teplotě 22° C (u erytrocytu při 4° C) a do plasmy (114). Zde může být v solubilní formě detekován technikou ELISA. Membránová exprese může být prokázána po vazbě monoklonálních protilátek průtokovou cytometrií (42). Přestože proces apoptózy doprovází řada změn, externalizace fosfatidylserinu na povrch buněčné membrány je považována za její časný znak (114).

Za moderní marker jakosti transfuzních přípravků je považován **annexin V**, globální marker apoptózy (57,59,105,125). Jde o intracelulární glykoprotein, který je v buňkách fyziologicky obsažen v cytosolu a organelách. Jeho zvýšená plasmatická hladina je v přímé relaci se stupněm buněčného poškození a jeho stanovení je dnes používáno jako vysoce senzitivní parametr monitorování kvality trombocytárních koncentrátů (42,56,57,125). Při současném stanovení K⁺ a volného hemoglobinu je vhodným markerem buněčného poškození i koncentrátů erytrocytů (105), kde byl studován při hodnocení vlivu deleukotizace plné krve (7,53). Dále se annexin V ukazuje být velmi efektivním inhibítoem koagulace díky své vysoké afinitě k fosfolipidovým membránám (34,56). Proto také přítomnost annexinu V v supernatantu trombocytárního koncentrátu dle některých autorů může mít i klinický význam vzhledem k možnému antikoagulačnímu působení a kompetici s vazebnými místy pro faktor VIII a V (56).

Stav krevních buněk významně ovlivňuje **obsah leukocytů** v přípravku. Snížení obsahu leukocytů časnou leukodeplecí indukuje generaci TGF-β, snižuje uvolnění většiny na leukocyty vázaných cytokinů a intracelulárních enzymů, které mohou indukovat poškození erytrocytů, resp. trombocytů během skladování (66). Uvádí se, že odstranění leukocytů z přípravků před skladováním by mohlo snížit imunosupresi způsobenou transfuzí, názory ale nejsou jednotné (114).

Cytokiny, zejména IL-1β, IL-6, IL-8, či RANTES, byly stanovovány v erytrocytárních i trombocytárních přípravcích. Byla prokázána souvislost s hladinou cytokinů v přípravcích a následnými nehemolytickými febrilními potransfuzními reakcemi (66). Zejména obsah IL-8 závisí na stupni kontaminace přípravku leukocyty a trombocyty (132,133). Obsah cytokinů v přípravcích může být ovlivněn i způsobem odběru krve, technologií jejího zpracování a dodatečnými procesy, jako filtrace produktu, které mohou mít vliv na aktivaci trombocytů a způsobit generaci cytokinů z trombocytů (103,109,134). Stanovení cytokinů ve vhodných kombinacích tak může být vhodným indikátorem jakosti transfuzních přípravků (107, 135, 137).

Transfuzní přípravky mohou být ovlivněny i vlastnostmi vaků, ve kterých jsou skladovány. Erytrocytární koncentráty jsou skladovány ve vacích z polyvinylchloridu (PVC) se změkčovadly, jejichž vylučování má stabilizující efekt na membránu erytrocytu. Vaky z tzv. non PVC plastů (nevylučují změkčovadla) mají vysokou propustnost pro plyny, jsou optimální pro skladování trombocytárních koncentrátů, ale způsobují zvýšení hemolýzy erytrocytů během skladování (114).

Specifické změny při skladování erytrocytů („red cell storage lesions“) byly popsány již v roce 1956 Gibsonem (35). Tyto změny progredují během skladování a jsou ovlivněny antikoagulačními a skladovacími roztoky (114). Minimální požadavek pro erytrocyty je hemolýza pod 0,8 % erytrocytární masy na konci skladování a 75 % RBC má být v cirkulaci 24 hodin po transfuzi (38). Během skladování významně klesá obsah 2,3-difosfoglycerátu (2,3-DPG). Po týdnu skladování se jeho hladina snižuje na 10 %, což může vést k redukci schopnosti uvolnit O₂ do mikrocirkulace (67,114). Klesá i hodnota adenosintrifosfátu (ATP), tento pokles ale nemá vliv na poškození erytrocytů během skladování ani na potransfuzní recovery (7, 114). Obsah 2,3-DPG a ATP v erytrocytech se může po transfuzi obnovit (50-70 % za 1 den, plně za týden) (114). Na enzymy regulující koncentraci 2,3-DPG má vliv i hodnota pH, která významně ovlivňuje jeho hladinu a tím i vazbu O₂ na Hb (65,67). Hodnota pH může být ovlivněna koncentrací citrátů v antikoagulačním roztoku (50). Nepřímý efekt zvýšení hladiny dalších mediátorů, jako je intracelulární Ca²⁺, vede k buněčné dehydrataci, vzniku mikovesikulací a ztrátě intracelulárního K⁺ (7). K normalizaci intracelulárního K⁺ dojde během několika hodin po transfuzi. Dále dochází k membránovým změnám včetně externalizace fosfatidylserinu na povrch buňky (114).

Relativně novým markerem jakosti erytrocytů je stanovení **CD47**. Jde o integrin-asociovaný protein, který je přítomen na většině tělesných buněk. V případě erytrocytů se jedná o tzv. „self-recognition marker“. Jeho přítomnost na povrchu erytrocytu představuje ochranu cirkulujících RBC před fagocytózou (2) a je důležitá pro přežití transfundovaných RBC (117). Hladina CD47 v supernatantu přípravku odpovídá úrovni lýzy erytrocytů (2).

Specifické změny při skladování trombocytů: Specifickou změnou pro trombocyt je **aktivace**. Jde o odezvu klidové destičky na specifické stimuly zprostředkovanou receptory různých typů (68). K aktivaci destičky dochází také během procesu přípravy trombocytárního koncentrátu a je spojena se snížením metabolické aktivity trombocytu během skladování. Podobně jako proces apoptózy je aktivace trombocytu spojena s morfologickým a funkčními změnami, zejména s degranulací vnitřních granulárních struktur trombocytu, které vedou

k povrchové expresi makromolekul lokalizovaných původně intracelulárně v granulích destiček (70). Jednou z nich je **P-selektin** (CD62P), integrální membránový glykoprotein alfa-granulí, který se na povrchu klidové destičky nenalézá a jeho povrchová detekce je průkazem degradace alfa-granulí (58). Exprese P-selektinu na povrchu destičky umožňuje prostřednictvím specifické membránové molekuly PSGL-1 (CD162) její adhezi na granulocyty a monocyty a následné odstranění z cirkulace tkáňovými makrofágy (87). Stanovení exprese CD62P na povrchu trombocytů nebo jeho solubilní formy v supernatantu přípravku je používáno k posouzení aktivace trombocytů v přípravku (22,86). Při aktivaci trombocytu dochází k uvolnění cytokinů (např. IL-6, IL-8, PF-4, RANTES), které jsou častou příčinou nehemolytických potransfuzních reakcí (103,134). Některými autory byly u trombocytárních koncentrátů sledovány i markery aktivace koagulačního systému, jako trombin-antitrombin komplex, fragment protrombinu 1+2 nebo kalikrein (59).

Pro účely validací nových procesů je doporučováno hodnocení markerů metabolického stavu krevních buněk (stanovení hladiny glukosy, laktátu a LDH) (22, 38), markerů apoptózy a aktivace buněk, zejména annexinu V a exprese P-selektinu, resp. stanovení jeho solubilní formy (58,104). Ne všechny mechanismy, které vedou k poškození krevních buněk, jsou plně objasněny a pochopeny. Jsou v současné době předmětem intenzivního studia (86).

1. 5. 3. Jakost transfuzních přípravků z multikomponentních odběrů

U multikomponentních odběrů byla provedena řada studií, hodnotících jakost získaných přípravků. Řadou autorů byly hodnoceny základní parametry jakosti transfuzních přípravků dle Doporučení Rady Evropy (58), dále markery vitality buněk. Annexin V jako marker apoptózy (81,106) byl hodnocen zejména u trombocytárních koncentrátů (58). Z markerů aktivace buněk byl sledován solubilní P-selektin u koncentrátů trombocytů (65,87,106). Uvedené, ale i další parametry jakosti TP získaných technikou MKO v různých kombinacích byly sledovány na začátku, v průběhu skladování, resp. na konci expirace produktu a byly srovnatelné s TP z plné krve (74, 141), dle některých autorů i vyšší jakosti (72).

Pro erytrocyty z aferézy je charakteristická vysoce standardizovaná transfuzní jednotka s nízkou variabilitou ve srovnání s erytrocyty z plné krve (72). Objem TU erytrocytů chudých na leukocyty, resuspendovaných v roztoku SAGM, kolísal v rozmezí 10 ml oproti cca 60 ml u TU erytrocytů z plné krve (28,50), obsah Hb v TU se pohyboval v rozmezí cca 5 g oproti 69 g u erytrocytů z plné krve (75). Buněčná kontaminace přípravků splňovala doporučení Rady Evropy (38). Stupeň hemolýzy erytrocytů na konci skladování byl u koncentrátů z MKO srovnatelný nebo nižší než u koncentrátů z plné krve: u separátoru Haemonetics MCS+

0,61 % (131), 0,3 % (26), $0,1\% \pm 0,03$ (65), u přístroje Trima $0,5 \pm 0,2$ % (28), u separátoru Amicus byl stupeň hemolýzy menší než 0,8 % (74) S obsahem volného hemoglobinu korespondující hladina kalina byla u obou typů erytrocytárních koncentrátů srovnatelná do 28. dne skladování, ale u přípravků z aferézy od 28. dne stoupala pomaleji a na konci expirace byla nižší (65). Předpokládá se, že postupné a kontrolované přidávání antikoagulans snižuje poškození membrány erytrocytu (65) a má pozitivní vliv na kvalitu produktu (72). Obsah 2,3-DPG a hodnota pH byly vyšší (50), konzumce ATP, glukosy a akumulace laktátu byla stejná jako v erytrocytech z plné krve v den skladování 0 i 42 (72). Studii týkající se annexinu V u erytrocytů z aferézy jsme nenalezli. Při porovnávání přežívání erytrocytů z MKO a plné krve in vivo nebyl prokázán signifikantní rozdíl (99).

Trombocytární koncentráty získané metodou MKO splňovaly dle uvedených prací stanovená kritéria výtěžnosti. Porovnání tzv. „destičkových lezí“ popisuje rozdíly nejen mezi aferetickými přípravky a přípravky z plné krve, ale i mezi produkty z různých typů separátorů a z plné krve navzájem. Plasmatické hladiny annexinu V a solubilního P-selektinu v den odběru byly stejné u deplektovaných trombocytárních koncentrátů z tří typů separátorů i z plné krve. Pátý den skladování byly hodnoty solubilního P-selektinu progresivně zvýšeny u trombocytárních koncentrátů z plné krve, u přípravků z aferézy bylo zvýšení nejvyšší u separátoru Amicus, následně Cobe Spectra a nejméně u přístroje Haemonetics MCS+ (58). Přípravky z MKO vykazovaly na začátku skladování nižší expresi solubilního P-selektinu a tedy nižší stupeň aktivace než trombocytární koncentráty z jednoduché aferézy. V průběhu skladování se však hodnoty P-selektinu obrátily a u přípravků z MKO byly vyšší, což může být v souvislosti s delší centrifugací a jejím vlivem na trombocyty u tohoto typu odběru (65). Různé hladiny solubilního P-selektinu u různých odběrových separátorových souprav a protokolů souvisí s vlivem technologie na stav buněk při aferéze (65,118), podobný je vliv použitého typu deplektizačního filtru u trombocytárních koncentrátů z plné krve (59) nejen na aktivaci buněk, ale i na obsah cytokinů v TP. Při porovnání hladin cytokinů u přípravků ze separátorů Cobe Spectra a Haemonetics MCS+ byla počáteční hladina IL-6 u MCS nižší než u přístroje Spectra, v průběhu skladování se však zvyšovala, zatímco u přístroje Spectra byla standardní, hladina IL-8 byla u MCS nižší v průběhu celého skladování. Hladiny tzv. „platelet derived“ cytokinů (RANTES, PF-4, β -TG a TGF- β) stoupaly během skladování u obou typů produktů (134).

Z uvedeného vyplývá složitost a náročnost vzájemného posouzení parametrů poškození krevních buněk v jednotlivých typech produktů, v řadě prací je také naznačena nutnost dalších studií.

2. Cíle práce

Cílem práce bylo blíže prozkoumat a zhodnotit vybrané, dosud ne zcela jasné otázky:

- 2.1. Zhodnotit přímý vliv MKO na zdravotní stav dárce krve – vedlejší účinky aferéz, bezprostřední vliv procedury na parametry krevního obrazu, zhodnotit vliv procedury na markery aktivity krevních buněk navracených dárci (hsCRP, annexin V, P-selektin), toto posoudit u jednotlivých odběrových protokolů.
- 2.2. Posoudit dlouhodobý vliv MKO na dárce s cílem vybrat vhodné parametry pro dlouhodobé monitorování zdravotního stavu dárce. Zaměřit se na krevní obraz, parametry metabolismu železa (ferritin, transferinový receptor), celkovou bílkovinu, albumin a imunoglobuliny. Posoudit současné schema sledování zdravotního stavu dárce pro aferetické odběry a posoudit nutnost jeho doplnění.
- 2.3. Zhodnotit předepsané (základní) a speciální parametry jakosti, markery poškození a aktivace přípravků získaných metodou MKO a jejich event. přínos vůči přípravkům získaným z plné krve.
- 2.4. Na základě výše získaných poznatků upřesnit vstupní kritéria pro dárce MKO a posoudit možnost konverze dárců na tento typ odběrů v našich podmínkách.
- 2.5. Upřesnit místo a indikaci přípravků získaných metodou MKO v hemoterapii.
- 2.6. Posoudit ekonomický aspekt metody.

3. Metodika

Prospektivní studie byla provedena v letech 2003 – 2006. Projekt byl schválen Etickými komisemi KN Liberec, FN a LF UK v Hradci Králové. Součástí studie byl přijatý a obhájený výzkumný projekt IGA MZ ČR č. NR/8015 – 3.

Studie sledovala určené parametry dárců krve pro tento typ odběrů, parametry vlastní procedury a transfuzních přípravků a porovnávala je s vybranými parametry alikvotního počtu dárců plné krve a přípravků z plné krve.

3.1. Krevní separátory a odběrové protokoly

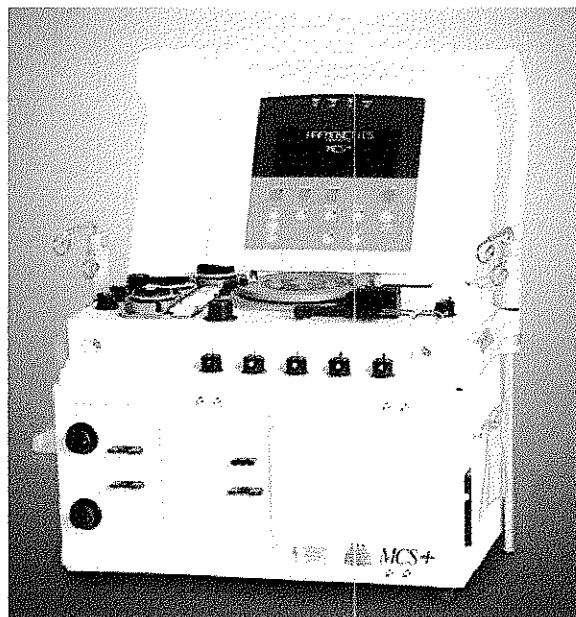
Odběry byly prováděny na již zavedeném separátoru Haemonetics MCS+ (Haemonetics Corp., Braintree, USA) (dále MCS), metoda MKO na separátoru Trima Accel (Gambro BCT, inc. Lakewood, USA) (dále Trima) byla nově zavedena. Separátor MCS (obr. č. 1) umožňuje provádět odběry intermitentním způsobem, tj. v cyklech. Deleukotizace trombocytů probíhá kontinuální filtrací, je možno připravit i trombocyty z aferézy (TA) nedeleukotizované. Pro jednotlivé kombinace odběrů jsou definovány softwarově řízené protokoly, pro které jsou třeba speciální sety (tab.č 2, str. 8). Aferéza na separátoru Trima (obr. č. 2) probíhá kontinuálně, koncentráty trombocytů jsou připravovány leukoredukčním systémem (protokol LRS) (127), pro odběry trombocytů s plasmou a/nebo erytrocyty slouží universální set. U obou separátorů mohou být koncentráty erytrocytů následně deleukotizovány.

Na separátoru Haemonetics MCS+ byly provedeny odběry 2 jednotek trombocytů (TA: 1 TU > 200 x 10⁹ PLT) a odběry trombocytů s plasmou (TA > 200 x 10⁹ PLT, TA300 MCS: 1,5 TU > 300 x 10⁹ PLT, objem plasmy 240 ml/TU). Použili jsme roztok AB-16 a set LN 994 CF-E (Haemonetics Corp., Braintree, USA). Odběry byly provedeny bez objemové náhrady. Dále jsme provedli odběry 2 jednotek erytrocytů (antikoagulační roztok CPD-50), které byly kompenzovány kontinuální infúzí 400 ml fyziologického roztoku (50). Erytrocyty z aferézy resuspendované (EAR MCS) byly po odběru (set LN 942, Haemonetics Corp., Braintree, USA) resuspendovány ve 100 ml roztoku SAGM na jednotku. Erytrocyty z aferézy deleukotizované (EAD MCS) byly po odběru (set LN 948 F, Haemonetics Corp., Braintree, USA) rovněž resuspendovány ve 100 ml roztoku SAGM a následně deleukotizovány integrovanými filtry RC 2H PALL za 2 hodiny po odběru bez předchlazení.

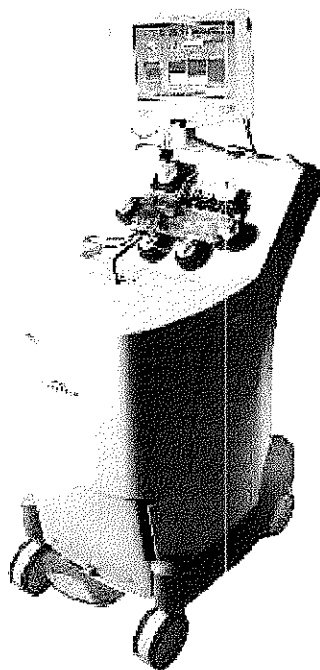
Na přístroji Trima Accel jsme provedli kombinované odběry trombocytů s plasmou (TA300 Trima: 1,5 TU > 300 x 10⁹ PLT, objem plasmy 230 ml/TU, set Trima Accel LRS Platelet, Plasma, RBC, Gambro BCT, USA; antikoagulans ACD). Dále byly provedeny kombinované odběry erytrocytů (EAD Trima) a trombocytů (TA300 Trima: 1,5 TU > 300 x 10⁹ PLT, protokol LRS, set Trima Accel LRS Platelet/Plasma/RBC set, Gambro BCT, USA; antikoagulans ACD-A). Erytrocyty byly resuspendovány ve 100 ml SAGM a deleukotizovány do 2 hodin po odběru integrovaným filtrem. Odběry na separátoru Trima proběhly bez objemové náhrady.

Byly použity tyto odběrové a návratové rychlosti: MCS 80 ml/min., Trima: hodnota závisí na TBV dárce, v našem nastavení (max. rychlost: pomalu, řízení odběru: 2) je průměrná rychlost cca 85 ml/min.

Obr. č. 1 Separátor Haemonetics MCS +



Obr. č. 2 Separátor Trima Accel



Kombinace provedených odběrů byly voleny dle klinických požadavků oddělení Krajské nemocnice Liberec. Výběr protokolů jsme prováděli i s ohledem na jejich ekonomickou návratnost. Z tohoto důvodu jsme nezavedli kombinovaný odběr jedné jednotky erytrocytů s plasmou a dvojité erythrocytaferézy na separátoru Trima. Na separátoru MCS nebyly provedeny odběry TA300 + RBC vzhledem k relativně dlouhému trvání aferézy (65). Spektrum provedených odběrů uvádí **tab. č. 6**.

Tab. č. 6 Spektrum provedených odběrů

typ odběru	Dle skupin dárců			Dle přístrojů	
	Celkem	Skupina A	Skupina B	MCS	Trima
2 TU RBC	98	98	0	98	0
2 TU TA	11	5	6	5	6
TA + PA	5	1	4	5	0
TA300 + PA	83	21	62	47	36
TA300 + RBC	28	0	28	0	28
Celkem	225	125	100	155	70

Legenda: RBC: erytrocyty, PA: plasma, TA: trombocyty z aferézy ($> 200 \times 10^9$ PLT), TA300: trombocyty z aferézy ($> 300 \times 10^9$ PLT), TU: transfúzní jednotka. Skupina A: odběry 2 TU koncentrátů erytrocytů, trombocytárních koncentrátů. Skupina B: odběry trombocytárních koncentrátů.

3.2. Soubor dárců

Do studie byli zařazeni dobrovolní bezplatní dárci plasmy na základě informovaného souhlasu, pro které byla vypracována pracovní vstupní kritéria (uvedena dále). Sledovaný soubor tvořilo 52 dárců (48 mužů a 4 ženy). Vzhledem k předepsaným 6-ti měsíčním intervalům a potřebě sledování metabolismu železa po dvojité erythrocytaferéze jsme soubor rozdělili na dvě skupiny. Do souboru A byli zařazeni dárci, u kterých byly provedeny dvojité erythrocytaferézy. V případě vyhovujícího předodběrového počtu trombocytů byly u těchto dárců prováděny i odběry trombocytů s plasmou (TA + PA, TA300 + PA) nebo dvě TU trombocytů. Postupně bylo zařazeno 30 mužů, u kterých bylo provedeno 125 odběrů, žádná žena nevyhověla vstupním kritériím. 1 rok studie absolvovalo 28 dárců (1 dárci byl vyřazen pro zvýšení ALT, 1 pro nespolupráci), dvouleté sledování ukončilo 20 dárců (8 bylo vyřazeno pro zdravotní a pracovní důvody či nespolupráci). U skupiny B bylo provedeno 100 odběrů (22 dárců, 18 mužů a 4 ženy). Zde byly prováděny odběry trombocytů

s plasmou (TA + PA, TA300 + PA) nebo 2 TU trombocytů, po zavedení metody i odběry erytrocytů s trombocyty (TA300 + RBC). Během 1. roku studie byla vyřazena 1 dárkyně (tachykardie), dvouleté sledování absolvovalo 17 dárců. Základní charakteristiku obou souborů uvádí **tab. č. 7**. Kombinované odběry trombocytů s plasmou byly u dárců obou skupin prováděny dle výběrových kritérií na obou přístrojích. Před každým odběrem byl dárci vyšetřen lékařem a zhodnocena vstupní kritéria.

Tab. č. 7 Základní charakteristika sledovaného souboru

		soubor A	soubor B
Celkový počet		30	22
Muži		30	18
Ženy		0	4
Věk	(roky)	30 ± 5	36 ± 6
Výška	(cm)	182 ± 6	174 ± 8
Váha	(kg)	85 ± 11	84 ± 12
Hemoglobin	(g/L)	152 ± 5	145 ± 12
Trombocyty	(x10 ⁹ /L)	252 ± 4	304 ± 58

Vstupní kritéria pro dárci krve (tab. č. 8) jsme stanovili na základě Doporučení Rady Evropy (38), českých pravidel pro výběr dárců krve (143), literárních zdrojů a výzkumné sondy - zhodnocení parametrů cca 170 MKO provedených před zahájením studie (92,93). Pro odběr dvou jednotek erytrocytů a intervaly mezi odběry jsme respektovali Doporučení Rady Evropy (38), pro trombocytferézy na separátoru Trima byla akceptována předodběrová hodnota trombocytů min. 220 x10⁹/L doporučená výrobcem přístroje.

Pro posouzení vstupních kritérií dárců trombocytferéz nebyl soubor dle našeho názoru a po konzultaci se statistikem dostatečně početný. Proto jsme pro tyto účely zhodnotili aferetické parametry a základní jakost u dalších soubežně provedených MKO u 80 dárců (37 odběrů 2 TA, 86 odběrů TA + PA a 12 odběrů TA300 + RBC, 68 mužů, 12 žen).

Tab. č. 8 Pracovní vstupní kritéria pro dárce multikomponentních aferéz

Parametry	2 TA, TA+PA	TA + RBC	2 RBC	
TBV (ml)	> 4300	> 4300	> 5000	
Váha (kg)	nebo > 65	>50	> 70	
Hematokrit	Muži > 0,40 Ženy > 0,38	> 0,30*	> 0,42	> 0,30 *
Hemoglobin (g/L)	Muži > 135 Ženy > 125	> 110 *	> 140	> 110 *
Trombocyty x 10 ⁹ /L	1TU > 200 MCS > 260 Trima > 220	- Trima > 220	-	
Časový limit (min)	< 75		-	

Legenda: RBC: erytrocyty z aferézy, TA: trombocyty z aferézy, PA: plasma, TU: transfuzní jednotka (TA: > 200 x 10⁹ PLT), * limit hodnot po odběru.

3.3. Hodnocené parametry

3.3.1. Ukazatele přímého vlivu MKO na zdravotní stav sledovaného souboru

a) Klinické projevy aferéz: U jednotlivých protokolů jsme sledovali jsme bezprostřední nežádoucí projevy výkonů.

b) Laboratorně jsme sledovali změnu hodnot krevního obrazu po odběru u jednotlivých protokolů, změnu plasmatické hladiny magnézia po aferéze (průkaz možného vlivu citrátového antikoagulans), stanovení ionizovaného Ca se z technických důvodů nepodařilo zajistit. U odběrů 2 TU RBC, TA300 MCS a TA300 Trima byly sledovány markery poškození a aktivity krevních buněk navracených dárce – změny hladin hsCRP, solubilního P- selektinu a annexinu V po aferéze.

3.3.2. Ukazatele dlouhodobého vlivu MKO na zdravotní stav sledovaného souboru

a) Markery metabolismu železa - hladina plasmatického Fe, transferin, feritin a solubilní transferinový receptor (sTfR) byly sledovány u obou souborů po 180 dnech, u souboru A navíc v den 30, 90 po první a druhé dvojité erythrocytaferéze. Po 4. erythrocytaferéze byl sledován již jen feritin (ekonomické důvody). Preparáty železa jsme preventivně nepodávali.

b) V půlročních intervalech byla sledována hodnota celkové bílkoviny (CB), albuminu a hladina imunoglobulinů.

3.3.3. Parametry aferéz

U všech kombinací odběrů jsme sledovali celkový objem krve dárce (TBV) uváděný separátorem (zhodnocena hmotnost, výška, hematokrit a pohlaví dárce), zpracovaný objem krve (TPV), procentuální podíl zpracovaného TBV, trvání aferézy, spotřebu antikoagulans, odebrané množství krevních složek v mililitrech a v procentech TBV.

3.3.4. Parametry jakosti transfuzních přípravků

U přípravků, získaných čtyřmi kombinacemi odběrů na dvou separátorech, byly hodnoceny základní a vybrané speciální parametry jakosti. Výsledky byly porovnány navzájem, dále s parametry odpovídajících přípravků z plné krve a korelovány ke vstupním parametrům dárce krve.

a) Erytrocytární koncentráty: U obou přístrojů jsme hodnotili erytrocyty z aferézy deleukotizované (EAD MCS, EAD Trima), u separátoru MCS navíc i erytrocyty resuspendované (EAR MCS) s cílem posoudit vliv kontaminace leukocyty na jakost získaných produktů. Hodnotili jsme objem, docílení predikované jakosti dle Doporučení Rady Evropy (38). V den skladování 0 a 40 jsme stanovili hodnotu pH, hladinu volného Hb, LDH, kalium, glukosy, laktátu a annexinu V. V případě annexinu V jsme navíc porovnávali jeho hladinu v přípravku vůči klidové hodnotě u dárce krve. U dvojitých erythrocytaferéz jsme zhodnotili korelaci parametrů jakosti EAD se vstupními parametry dárce a výsledky porovnali se souborem deleukotizovaných erytrocytů z plné krve (ERD).

b) Trombocytární koncentráty: objem, obsah trombocytů v TU a kontaminaci leukocyty jsme hodnotili u všech získaných jednotek. U TA300 Trima, TA300 MCS a kontrolního souboru trombocytů z plné krve (TB) jsme v den skladování 0 a 5 stanovili hodnotu pH, glukosy, laktátu, LDH, annexinu V a solubilního P-selektinu. V případě annexinu V a solubilního P-selektinu jsme navíc porovnávali jejich hladinu v přípravku vůči klidové hodnotě u dárce krve.

3.4. Laboratorní analýza

Laboratorní analýza byla provedena validovaným způsobem v certifikovaných laboratořích. Krevní obraz dárce a buněčné parametry jakosti erytrocytů byly stanovovány na OKH KN Liberec na přístroji Coulter T 890 a Coulter STKS (Beckman Coulter, Florida, USA). Počet trombocytů v přípravcích byl stanoven na přístroji Coulter STKS. Přítomnost leukocytů v deleukotizovaných přípravcích byla stanovena na TO KN Liberec v Nageottově komůrce (lyzační roztok Turck firmy Merck). Biochemická vyšetření byla provedena na

Oddělení klinické biochemie KN Liberec. Hodnota **LDH** byla vyšetřena metodou LDH-L optimized (kat.č. 1876961, Roche Diagnostics, SRN), **laktát** reakcí s LOX (kat.č.1822837, Roche Diagnostics, SRN), **pH** přímou potenciometrií na radiometru ABL 625 GL, stanovení **glukózy** bylo provedeno glukosooxidázovou reakcí (GOP-POD, Lachema, Česká Republika). **Celková bílkovina** byla vyšetřena metodou biuretové reakce (kit Total Protein, kat. č. 2000903, Roche Diagnostics, SRN), albumin reakcí s BCG (kat. č. 1970909, Roche Diagnostics), **elektroforéza bílkovin** metodou Sebia, elfo na agaroze. **Imunoglobuliny** byly stanoveny imunoturbidimetricky kity Roche Diagnostics, Německo (IgG-2, kat. č. 3507408, IgM-2, kat.č. 3507149, IgA-2, kat. č. 3507297). **Plasmatická hladina železa** byla vyšetřena kitem FerroZin (kat. č. 1876996, Roche Diagnostics), **feritin** soupravou Elecsys Feritin (kat. č. 03737551, Roche Diagnostics, SRN), **transferin** imunoturbidimetricky (Transferin ver. 2, kat.č. 3015084, Roche Diagnostics, SRN), **solubilní transferinový receptor** latexem usnadněnou turbidimetrií (sTfR, kat.č. 2148315, Roche Diagnostics, SRN), **hladina kaliumu** nepřímou potenciometrií (ISE indirect Na,K, Cl, kat.č. 825441, Roche Diagnostics, SRN) a **hladina magnézia** reakcí s xylidilovou modří (Mg, kat.č. 1551353, Roche Diagnostics, SRN). Imunologická vyšetření byla provedena na Ústavu klinické imunologie a alergologie FN v Hradci Králové. K stanovení hladiny annexinu V byl použit kit IMUCLONE Annexin ELISA Kit, kat. č. 650 (American Diagnostica Inc., Stamford, USA). Solubilní P-selektin byl stanoven pomocí kitu Human Soluble P-Selectin Immunoassay, kat. č. BBE 6 (R& D Systems Inc., Minneapolis, USA).

Odběry vzorků pro laboratorní vyšetření přípravků byly prováděny validovaným sterilním způsobem na TO KN Liberec.

Pro vyšetření koncentrátů trombocytů byly vzorky odebírány vzorky v den 0 a den 5 resp. 6. V den 0 bylo odebráno bezprostředně po přípravě 10 ml přípravku, centrifugováno 5 min. při 5000 ot. na laboratorní centrifuze Jouan C 3.12 (Jouan S.A., Francie). Supernatant byl rozplněn do alikvotů po 0,75 ml. Vyšetření pH, laktátu, glukosy a LDH proběhlo týž den do 4 hodin po odběru vzorků. Materiál pro vyšetření annexinu V a solubilního P- selektinu byl zamražen a skladován při - 30° C. Pro vyšetření markerů na konci expirace bylo 10 ml koncentrátu sterilně přemístěno do skladovacího vaku (Grifols transfer vak 150 ml, kat. č. 720430, Laboratorios Grifols, S.A., Španělsko), který byl skladován při teplotě 20 ± 2° C. Následné zpracování bylo identické jako u vzorků v den 0. Pro vyšetření hladiny annexinu V a sP-selektinu u dárců krve bylo před aferézou i odběrem plné krve odebráno 7 ml krve

do zkumavek s K₃EDTA (kat.č. 367655, Becton-Dickinson Vacutainer Systems, Francie) a zpracováno výše popsáním způsobem.

Pro vyšetření koncentrátů erytrocytů byly vzorky odebírány v den 0 a den 40, resp. 41. V den 0 bylo odebráno bezprostředně po přípravě 23 ml přípravku, centrifugováno 5 min. při 3400 ot. na laboratorní centrifuze Jouan C 3.12 (Jouan S.A., Francie). Supernatant byl rozplněn do alikvotů po 0,5 ml. Vyšetření pH, laktátu, glukosy a LDH proběhlo týž den do 4 hodin po odběru vzorků. Materiál pro vyšetření annexinu V byl zamražen a skladován při - 30° C. Pro vyšetření markerů na konci expirace bylo 23 ml koncentrátu sterilně přemístěno do skladovacího vaku (JMS Transfer bag, 150 ml, kat.č. 814-0132, Japan Medical Supply, Pte Ltd, Singapore), který byl skladován při teplotě $4 \pm 2^\circ$ C. Následné zpracování bylo identické jako u vzorků v den 0.

3.5. Kontrolní soubor

Kontrolní soubor dárců plné krve k porovnání stanovených parametrů zdravotního stavu u aferetických dárců tvořilo 26 mužů, odběry byly prováděny 4x ročně. Pro hodnocení parametrů jakosti u transfuzních přípravků byly odběry plné krve provedeny i u 16 žen (**tab. č. 9**). Odebírali jsme 450 ± 10 ml plné krve do vaků Leukotrap WB s integrovanými filtry WBF3 PALL (Pall Medical, Velká Británie) s antikoagulačním roztokem CPD v poměru 1:7. Plná krev byla následně zpracována na erytrocyty resuspendované deleukotizované (ERD) časnou deleukotizací, centrifugací na centrifuze JOUAN KR.22 (Jouan S.A., Francie) (čas 15 min při 5010 G, teplota 15° C, akcelerace 7, brzda 2) a následným oddělením plasmy resuspenzí 100 ml SAGM. Monitorování odpovídajících parametrů zdravotního stavu dárců krve a parametrů jakosti transfuzních přípravků bylo prováděno paralelně se zkoumaným souborem.

K porovnání aferetických parametrů u zkoumaného souboru jsme použili historický soubor 34 jednoduchých trombocytferéz provedených na separátoru Haemonetics MCS+ (**tab. č. 10**).

Tab. č. 9 Charakteristika kontrolního souboru

		Muži	Ženy
Počet		26	16
Věk	(roky)	40 ± 10	47 ± 11
Výška	(cm)	181 ± 7	168 ± 7
Váha	(kg)	85 ± 12	72 ± 12
Hemoglobin	(g/L)	155 ± 9	136 ± 9
Trombocyty	(x10 ⁹ /L)	192 ± 36	256 ± 56

3.6. Statistické metody

Cílem statistického hodnocení bylo hodnocení určených parametrů u zkoumaných souborů dárců i transfuzních přípravků v časové ose a hodnocení parametrů mezi hodnoceným a kontrolním souborem navzájem. Pro prezentaci dat byly použity základní grafické nástroje (spojnicové a sloupcové grafy) a přehledové tabulky (průměru, medián, směrodatná odchylka, range). Výběr statistických metod byl konzultován s katedrou biofyziky LF UK v Hradci Králové. K statistickému hodnocení byl použit statistický software Excel 4.0. K hodnocení normality rozložení dat v souborech jsme použili D'Agostiniův test. Pro normálně rozložená data byl použit Studentův t-test, F-test, párový test a Pearsonův korelační koeficient. Pro soubory s nenormálně rozloženými daty byly použity Mannův – Whitneyův test, Wilcoxonův párový test a Spearmanův korelační koeficient. Statistická významnost byla posouzena na hladině $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Aferetické parametry

Sledované parametry (TBV, trvání odběru, spotřebu antikogulačního roztoku, zpracovaný objem krve (TPV), množství odebrané krevní složky a výtěžnost trombocytárních koncentrátů) uvádí tab č. 10.

Dvojité erythrocytaferézy trvaly 36 - 47 (med. 40) min., tedy srovnatelně s běžnou plasmaferézou, která trvá průměrně 40 min. Odebíraný objem u dvojitých erythrocytaferéz (374 - 397 (med. 384) ml, 5,7 - 8,2 (med. 7,0) % TBV) byl v souladu s publikovanými údaji (50,107), v porovnání s objemem odebírané jednotky plné krve je odebírán objem menší o 66 ml ($p < 0,001$).

Na separátoru MCS u odběrů TA + PA odebraný objem činil 391 - 546 (med. 475) ml, 6,1 - 12,5 (med. 8,9) % TBV, u odběrů TA 300 + PA 440 - 643 (med. 512) ml, 7,7 - 12,0 (med. 9,3) % TBV. Zpracovaný podíl TBV závisel na použitém protokolu, největší hodnotu jsme zaznamenali u dvojitych trombocytaferéz (32-66, med. 50%), současně zde byl odebírán nejmenší objem TBV (6,1 - 9,4, med. 7,5 %). Na separátoru Trima při odběrech TA300 + PA odebraný objem činil 440 - 511 (med. 511) ml, 7,4 - 11,4 (med. 9,0) % TBV a zpracovaný podíl TBV činil 31-55 (med. 42) % TBV. Při odběru TA300 + RBC odebraný objem činil 471 - 501 (med. 485) ml, 6,8 - 11,3 (med. 8,9) % TBV, zpracovaný podíl TBV činil 38 - 67 (med. 50) % TBV. Limit 13 % odebraného TBV nebyl překročen u žádného odběru.

Tab. č. 10 Parametry aferetických protokolů

Typ odběru	TBV dárce (ml)	TPV (ml)	TPV/TBV %	PLT ¹ (x10 ⁹ /L)	Čas ² (min)	Antikoagulans ³ (ml)	Odebraný ⁴ objem (ml)	Odebrané % TBV	PLT ⁵ (x10 ⁹)
2 RBC									
(n=64)	5555 ± 394	1121 ± 49	20 ± 1	-	40 ± 3	74 ± 3	385 ± 8	7 ± 0,5	-
2 TA									
(n = 48)	5189 ± 587	2581 ± 295	50 ± 7	341 ± 35	70 ± 8	213 ± 19	386 ± 13	7,5 ± 0,8	241 ± 33
TA+PA									
(n=81)	5443 ± 565	1945 ± 304	36 ± 7	267 ± 45	50 ± 8	170 ± 20	478 ± 29	8,7 ± 1,1	277 ± 41
TA300+PA									
MCS (n=57)	5537 ± 516	2416 ± 281	39 ± 1	293 ± 33	62 ± 8	200 ± 19	512 ± 30	9,3 ± 1,0	366 ± 44
TA300+PA									
Trima (n=36)	5517 ± 540	2347 ± 286	43 ± 6	263 ± 40	54 ± 2	286 ± 32	503 ± 12	9,2 ± 1,0	351 ± 37
TA300+RBC									
(n=40)	5437 ± 661	2633 ± 284	49 ± 7	276 ± 41	51 ± 5	332 ± 32	485 ± 8	9,0 ± 1,1	330 ± 31
TA⁶									
(n=34)	5136 ± 627	2101 ± 233	42 ± 7	244 ± 33	58 ± 8	193 ± 23	243 ± 22	4,8 ± 0,7	256 ± 39

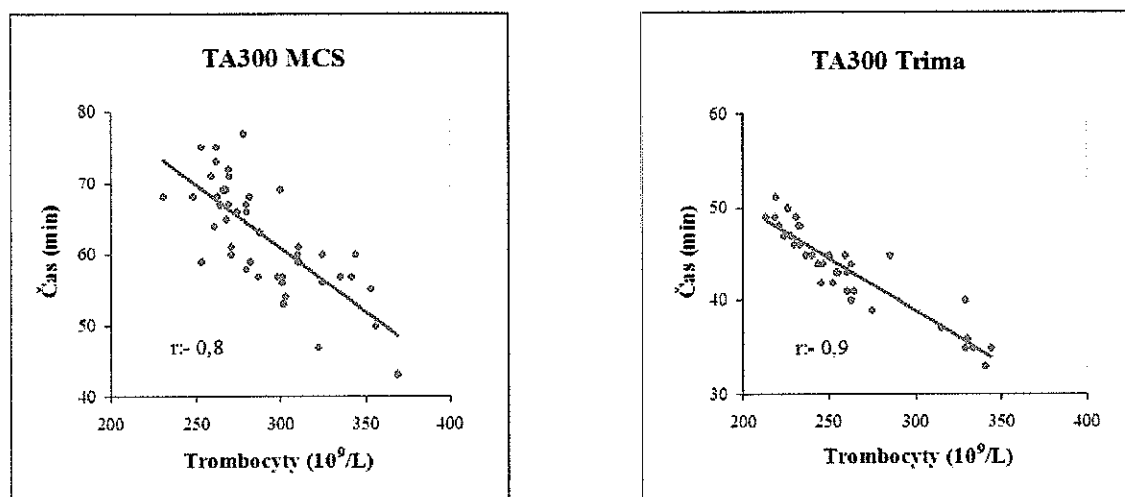
Legenda: ¹ počet trombocytů dárce před odběrem, ² trvání aferézy, ³ celková spotřeba antikoagulačního roztoku, ⁴ odebraný objem včetně antikoagulans, ⁵ obsah trombocytů v 1 TU, ⁶ kontrolní soubor. RBC: erytrocyty, PA: plasma, TA: trombocyty z aferézy (>200 x 10⁹ PLT), TA300: trombocyty z aferézy (> 300 x 10⁹ PLT), hodnoty udány v AV± SD (průměr a směrodatná odchylka).

Časový limit 75 minut nebyl dodržen 13 x (76 – 81 min.) na separátoru MCS, z toho 12 x u odběrů dvou TU TA, 1 x u odběru TA + PA. Na separátoru Trima časový limit překročen nebyl. Ve srovnání s jednoduchými trombocytaferézami (tab. č. 10) **současný odběr plasmy u odběru TA + PA** statisticky významně zkrátil trvání aferézy průměrně o 8 min. (p < 0,001), snížil spotřebu antikoagulans o 23 ml (p < 0,001) a snížil TPV o 156 ml (p < 0,001). **Odběr druhé jednotky trombocytů** znamenal prodloužení aferézy o 12 min. (p < 0,001), zvýšil TPV o 480 ml (p < 0,001) a spotřebu antikoagulans o 20 ml (p < 0,001). U všech odběrů byla docílena predikovaná výtěžnost > 200 x 10⁹ PLT. U odběrů TA300 +

PA na separátoru Trima jsme zaznamenali statisticky významně kratší čas aferézy (54 ± 2 min., $p < 0,001$) a nižší předodběrový počet trombocytů ($263 \pm 40 \times 10^9/L$, $p < 0,001$) u dárce krve v porovnání s odběrem na separátoru MCS. Docílený obsah trombocytů v koncentrátech byl u obou přístrojů srovnatelný (Trima: 351 ± 37 , MCS: 366 ± 44 , $p = 0,08$). Trvání aferéz u obou přístrojů silně záviselo na předodběrovém počtu trombocytů dárce (Trima: $r = -0,9$, MCS: $r = -0,8$) (**graf č. 1**), závislost na TBV nebyla zjištěna (Trima: $r = 0,2$, MCS: $r = 0,1$) (**graf č. 2**).

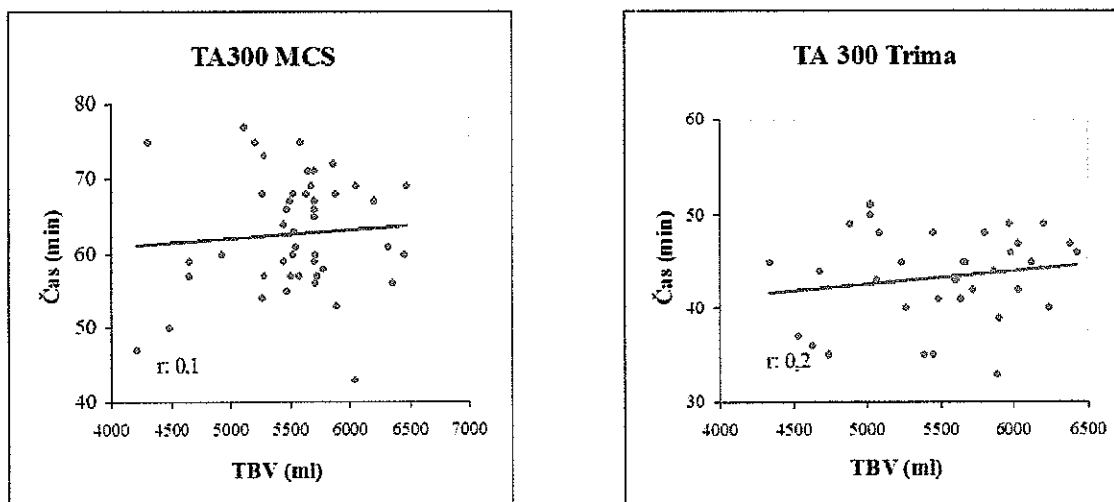
U kombinovaného odběru **TA300 + RBC** na separátoru Trima byla průměrná spotřeba antikoagulans významně vyšší než u ostatních kombinací odběrů (o 146-172 ml, $p < 0,001$). Trvání aferézy silně záviselo, obdobně jako u odběrů TA300 + PA, na předodběrovém počtu trombocytů dárce ($r = -0,74$), nikoli na TBV ($r = 0,26$), předodběrové hodnotě Hb ($r = 0,24$) a Ht dárce ($r = 0,22$).

graf č. 1 Závislost trvání aferézy na počtu trombocytů dárce



Legenda: TA300 Trima: trombocyty ze separátoru Trima ($> 300 \times 10^9$ PLT), TA300 MCS: trombocyty ze separátoru MCS ($> 300 \times 10^9$ PLT).

graf č. 2 Závislost trvání aferézy na TBV dárce



Legenda: TA300 Trima: trombocyty ze separátoru Trima ($> 300 \times 10^9$ PLT), TA300 MCS: trombocyty ze separátoru MCS ($> 300 \times 10^9$ PLT).

4.2. Vliv aferéz na dárce krve

4.2.1. Bezprostřední vliv MKO na zdravotní stav dárce krve

Při hodnocení přímého vlivu procedury jsme nezaznamenali žádné závažné klinické vedlejší účinky. Na separátoru MCS jsme u dvojitých erythrocytaferéz jedenkrát zaznamenali rupturu žíly u dárce krve, u odběrů trombocytů s plasmou jsme 1x zaznamenali lehkou nevolnost a 5 x komplikace technického charakteru (1x ruptura žíly, 1x příměs erythrocytů v plasmě, 1x porucha spojky mezi jehlou a setem, 1x detekován vzduch v setu, 1x výpadek proudu). Na separátoru Trima jsme u odběrů trombocytů s plasmou zaznamenali 2 x lehký citrátový efekt, který se upravil zpomalením návratové rychlosti, u odběrů erythrocytů s trombocyty se komplikace nevyskytly. Podběrové hodnoty Hb, Ht a PLT (tab. č. 11) u níže uvedených kombinací odběrů ve všech případech vyhovovaly doporučeným limitům (pro odběry 2 TU RBC: Hb > 110 g/L, Ht $> 0,30$, pro odběry TA300: PLT $> 100 \times 10^9$ /L) a odpovídaly hodnotám predikovaným software separátorů. U odběrů 2 TU RBC Hb poklesl průměrně o 18 ± 5 g/L a Ht o $0,06 \pm 0,02$ (obojí $p < 0,001$), ke změně počtu trombocytů nedošlo ($p = 0,85$). Pokles PLT po odběru TA300 + PA na separátoru MCS činil $49 \pm 22 \times 10^9$ /L ($p < 0,001$), nejnižší hodnota po odběru činila 206×10^9 /L. Na separátoru Trima činil pokles PLT po odběru TA300 + PA $50 \pm 18 \times 10^9$ /L ($p < 0,001$), nejnižší hodnota po odběru byla 175×10^9 /L. U odběrů TA300 + RBC počet PLT klesl o $43 \pm 14 \times 10^9$ /L ($p = 0,02$),

změny Hb a Ht nebyly statisticky významné (Hb: 2 ± 3 g/L, $p = 0,43$, Ht: $0,00 \pm 0,01$, $p = 0,45$).

Tab. č. 11 Změny parametrů krevního obrazu po MKO

	Separátor MCS				Separátor Trima			
	2 TU RBC n=33		TA 300 + PA n=22		TA 300 + PA n=29		TA 300 + RBC n=17	
	Před	Po	Před	Po	Před	Po	Před	Po
	Hemoglobin (g/L)							
range	139 - 164	124 - 148	125 - 162	134 - 178	129 - 165	139 - 177	136 - 163	131 - 162
AV/SD	153 ± 6	135 ± 6	145 ± 8	157 ± 10	147 ± 10	155 ± 10	150 ± 8	148 ± 9
medián	151	135	147	158	146	156	151	150
	Hematokrit							
range	0,38 - 0,46	0,34 - 0,49	0,36 - 0,41	0,37 - 0,51	0,35 - 0,48	0,39 - 0,52	0,40 - 0,47	0,39 - 0,47
AV/SD	$0,43 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,03$	$0,44 \pm 0,03$	$0,44 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$
medián	0,43	0,38	0,42	0,45	0,41	0,44	0,44	0,44
	Trombocyty ($\times 10^9/L$)							
range	165 - 323	155 - 327	253 - 376	206 - 324	217 - 410	175 - 354	223 - 377	182 - 358
AV/SD	239 ± 42	238 ± 47	310 ± 37	261 ± 32	289 ± 47	239 ± 42	292 ± 50	250 ± 52
medián	234	235	313	260	284	225	273	247

Legenda: RBC: erytrocyty z aferézy, PA: plasma, TA 300: trombocyty z aferézy ($> 300 \times 10^9$ PLT).

Po odběrech nedošlo k poklesu hladiny Ca a Mg pod fyziologické meze, stanovení ionizovaného Ca se nepodařilo z technických důvodů zajistit.

Markery poškození krevních buněk navracených dárce: U tří hodnocených protokolů jsme nezaznamenali statisticky významnou změnu hodnot hsCRP a annexinu V po aferéze. Po odběru 2 TU RBC byla hladina annexinu V po odběru dokonce nižší. Solubilní P-selektin byl stanoven pouze u odběrů TA300 + PA (ekonomické důvody). Ani zde jsme nezjistili statisticky významné zvýšení hodnot po aferéze (**tab. č. 12**). To svědčí pro to, že krevní buňky nebyly aferetickými procedurami poškozeny a aktivita buněk navracených dárce krve jimi nebyla ovlivněna.

Avšak při porovnání středních hodnot annexinu V a sP- selektinu před odběrem u sledovaného souboru aferetických dárců a kontrolního souboru dárců z plné krve jsme zjistili, že klidové hodnoty annexinu V u dárců plné krve jsou nižší nežli u dárců z aferéz, hodnoty sP-selektinu jsou identické (**tab. č. 13**). Annexin V byl hodnocen u 36 dárců plné krve a 44 dárců MKO, sP-selektin byl hodnocen u 21 dárců plné krve a 31 dárců MKO. Tyto výsledky nebyly zatím publikovány a budou předmětem dalšího zkoumání.

Tab. č. 12 Změny annexinu a sP-selektinu po aferéze u sledovaného souboru

		Annexin V (ug/L)			sP-selektin (ug/L)		
		Před	Po	p	Před	Po	p
2 TU RBC n = 21	AV/SD	10,7 ± 8,8	10,2 ± 8,5	< 0,01	nevyšetřeno		
	range	1,0 - 28,3	0,8 - 27,5				
	medián	8,0	8,1				
TA 300+PA MCS n = 22	AV/SD	9,8 ± 6,9	9,1 ± 5,8	0,22	84,3 ± 60,4	80,8 ± 47,8	0,47
	range	1,6 - 23,3	2,1 - 19,5		16,9 - 268,1	18,5 - 189,5	
	medián	8,9	7,4		84,3	80,8	
TA 300 +PA Trima n = 26	AV/SD	9,9 ± 5,9	9,3 ± 6,0	0,24	70,2 ± 35,2	68,9 ± 33,7	0,65
	range	2,0 - 25,1	1,1 - 19,9		31,1 - 146,9	25,3 - 159,6	
	medián	8,5	8,1		70,2	68,9	

Legenda: RBC: erythrocyty z aferézy, PA: plasma, TA300: trombocyty z aferézy (> 300 x 10⁹ PLT).

Tab. č. 13 Porovnání annexinu V a sP-selektinu před odběrem u dárců MKO a kontrolního souboru

	Annexin V (ug/L)		p	sP-selektin (ug/L)		p
	PK n = 42	MKO n = 69		PK n = 21	MKO n = 48	
AV/SD	6,0 ± 5,1	10,1 ± 7,1	p = 0,006	79,6 ± 54,1	76,9 ± 48,4	p = 0,82
range	1,4 - 19,1	1,0 - 28,3		10,5 - 205,0	56,3 - 268,1	
medián	3,5	8,5		62,4	56,3	

Legenda: PK: dárci plné krve, MKO: dárci multikomponentních aferéz, n = počet měření.

4.2.2. Dlouhodobý vliv MKO na dárce krve

Vývoj hemoglobinu a parametrů metabolismu Fe po dvojité erythrocytaferéze

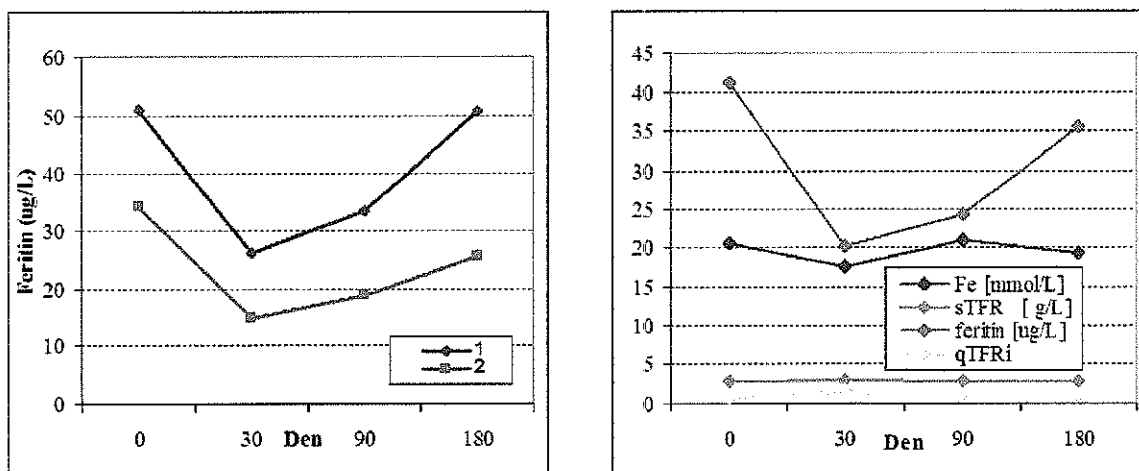
Vývoj uvedených parametrů během 180 dnů po dvojité erythrocytaferéze (soubor A) uvádí **tab. č. 14 a graf. č. 3**. Za 30 dnů po odběru jsme zaznamenali statisticky významné změny všech sledovaných parametrů, tzn. snížení hodnot Hb, Ht, Fe, saturace transferinu, feritinu a vzestup hodnot transferinu, solubilního transferinového receptoru (sTfR) a indexu qTfRi (qTfRi = sTfR/ln feritin).

U většiny dárců tohoto typu odběru došlo ke spontánní úpravě Hb, Ht a některých parametrů metabolismu železa na předodběrové hodnoty. U hodnot Hb, Ht, plasmatického železa a saturace transferinu tomu tak bylo již za 90 dnů po odběru u 25 dárců ze 30, u 2 dárců za 180 dnů a u 3 dárců za 270 dnů. Úprava hladiny feritinu na hodnoty před odběrem

trvala 180 dnů u 22 dárců, u 3 dárců 270 dnů a u 2 dárců 360 dnů po odběru. U 3 dárců jsme pro pokles hodnoty feritinu pod 12 $\mu\text{g/L}$ indikovali preparát železa (Sorbifer durules), u jednoho z nich bylo zjištěno okultní krvácení ve stolici, u dvou nesprávná životospráva. K úpravě hodnot transferinu, sTfR a qTfRi za 180 dnů nedošlo, vývoj hodnot měl však tendenci k úpravě.

Dárci, u kterých došlo k doplnění zásob železa za 180 dnů, měli průměrnou vstupní hodnotu feritinu vyšší ($50,8 \pm 21,3 \mu\text{g/L}$) ($p = 0,004$) nežli dárci, u kterých k doplnění zásob na hodnotu před odběrem nedošlo ($34,2 \pm 8,3 \mu\text{g/L}$) (graf č. 3). U 22 dárců byla provedena 2. erythrocytaferéza (med. 210 dnů po 1. odběru), zde k úpravě Hb, Ht, Fe, transferinu, jeho saturace a feritinu došlo u 19 dárců za 180 dnů, u 3 dárců úprava transferinu, jeho saturace a feritinu trvala 270 dnů. 3. erythrocytaferézu bylo možno provést u 21 dárců (med. 420 dnů po 1. odběru). Po 3. erythrocytaferéze bylo hodnoceno 19 dárců. U 16 dárců trvala úprava transferinu, jeho saturace a feritinu 180 dnů, opět 3 dárci potřebovali k spontánní obnově zásob železa interval 270 dnů. Při hodnocení vývoje hodnot sTfR a indexu qTfRi jsme zjistili statisticky významné rozdíly oproti dnu 0 i po 1., 2. i 3. erythrocytaferéze ($p < 0,001$).

Graf č. 3 Vývoj parametrů metabolismu Fe po dvojité erythrocytaferéze



Legenda: hodnota feritinu: 1: $50,8 \pm 21,3 \mu\text{g/L}$ (dárci, kteří za 180 dnů nedoplňili zásoby železa na hodnoty před odběrem), 2: $34,2 \pm 8,3 \mu\text{g/L}$ (dárci, kteří za 180 dnů doplnili zásoby železa na hodnoty před odběrem).

Tab. č. 14 Vývoj hemoglobinu a parametrů Fe po dvojité erythrocytaferéze (soubor A)

Den		0	30		90		180		
Počet dárců		30	30	p	28	p	30	p	
Hb	g/L	AV/SD	152 ± 7	147 ± 7	< 0,001	151 ± 7	0,28	149 ± 7	0,02
		range	141-164	136-161		136-164		136-161	
		medián	151	147		153		150	
Ht		AV/SD	0,43 ± 0,02	0,41 ± 0,02	< 0,001	0,43 ± 0,02	0,7	0,43 ± 0,02	0,99
		range	0,39 - 0,46	0,38 - 0,46		0,38 - 0,47		0,38 - 0,48	
		medián	0,43	0,41		0,43		0,42	
Fe	umol/L	AV/SD	22,0 ± 7,1	18,6 ± 10,1	0,04	21,3 ± 7,8	0,9	20,4 ± 7,5	0,31
		range	8,9 - 36,1	5,5 - 53,3		6,7 - 39,2		8,3 - 43,8	
		medián	2,7	17,6		21		19,4	
Transferin	g/L	AV/SD	2,74 ± 0,32	3,01 ± 0,32	< 0,001	2,93 ± 0,33	< 0,001	2,88 ± 0,36	< 0,001
		range	2,09 - 3,49	2,37 - 3,62		2,25 - 3,72		2,27 - 3,84	
		medián	2,73	3,05		2,84		2,8	
Saturace	%	AV/SD	33 ± 11	25 ± 15	0,003	31 ± 13	0,7	29 ± 11	0,11
		range	14 - 67	6- 64		14 - 65		11- 58	
		medián	30	23		28		27	
Feritin	ug/L	AV/SD	47,3 ± 20,4	22,1 ± 10,5	< 0,001	27,8 ± 11,2	< 0,001	41,4 ± 24,6	0,14
		range	22,3 - 123,1	7,5 - 46,3		7,3 - 78,0		6,0 - 134,1	
		medián	41,3	20,2		24,3		35,6	
sTfR	mg/L	AV/SD	2,92 ± 0,73	4,88 ± 1,03	< 0,001	3,71 ± 0,98	< 0,001	3,37 ± 0,94	< 0,001
		range	1,62 - 4,46	3,11- 7,71		1,05 - 7,36		2,17 - 6,75	
		medián	2,79	4,80		3,66		3,32	
qTfRi		AV/SD	0,78 ± 0,20	1,73 ± 0,57	< 0,001	1,27 ± 0,56	< 0,001	1,02 ± 0,58	< 0,001
		range	0,46 - 1,17	0,89 - 3,73		0,69 - 3,70		0,54 - 3,77	
		medián	0,19	0,57		0,59		0,58	

Legenda: saturace: saturace transferinu, sTfR: solubilní transferinový receptor, qTfRi: index sTfR (= sTfR/ln feritin), p: statistická významnost ke dni 0.

Tab. č. 15 Vývoj parametrů metabolismu železa po 2. a 3. dvojité erythrocytaferéze

Den			0	180 po 2. odběru		180 po 3. odběru	
			19	19	p	19	p
Hb	g/L	AV/SD	152 ± 7	156 ± 7	0,03	158 ± 8	0,002
		range	141 - 166	141 - 170		142 - 168	
		medián	151	156		160	
Ht		AV/SD	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,02	< 0,001	0,47 ± 0,02	< 0,001
		range	0,39 - 0,49	0,42 - 0,49		0,43 - 0,50	
		medián	0,43	0,46		0,48	
Fe	umol/L	AV/SD	21,9 ± 7,4	24,1 ± 9,6	0,99	21,0 ± 8,5	0,63
		range	8,9 - 35,0	10,9 - 43,7		6,2 - 40,7	
		medián	19,5	21,0		21,7	
Transferin	g/L	AV/SD	2,64 ± 0,32	2,70 ± 0,34	0,89	2,85 ± 0,38	0,05
		range	1,11 - 3,18	2,01 - 3,42		2,14 - 3,86	
		medián	2,67	2,67		2,72	
Saturace	%	AV/SD	33 ± 11	35 ± 16	0,73	30 ± 14	0,28
		range	14 - 67	15 - 67		8 - 61	
		medián	30	26		28	
Feritin	ug/L	AV/SD	51,8 ± 15,0	45,18 ± 18,5	0,19	53,5 ± 18,8	0,69
		range	31,2 - 123,3	21,3 - 101,2		34,5 - 87,4	
		medián	44,6	44,7		46,6	
sTfR	mg/L	AV/SD	2,92 ± 0,73	3,61 ± 0,68	< 0,001	3,53 ± 0,80	0,001
		range	1,96 - 4,46	2,46 - 4,83		2,20 - 5,12	
		medián	2,84	3,45		3,47	
qTfRi		AV/SD	0,78 ± 0,20	0,97 ± 0,20	< 0,001	0,90 ± 0,22	0,001
		range	0,45 - 1,17	0,65 - 1,29		0,58 - 1,44	
		medián	0,71	0,99		0,92	

Legenda: saturace: saturace transferinu, sTfR: solubilní transferinový receptor, qTfRi: index sTfR (= sTfR/ln feritin), p: statistická významnost ke dni 0.

Tab. č. 16 Vývoj hemoglobinu a parametrů Fe u dárců trombocytů a plasmy (soubor B)

Den		0		180		360	
Počet dárců		20	19	p	20	p	
Hb	g/L	AV/SD	146 ± 12	146 ± 10	0,88	150 ± 8	0,04
		range	125 - 165	128 - 162		135 - 163	
		medián	144	146		150	
Ht		AV/SD	0,42 ± 0,03	0,42 ± 0,04	0,32	0,44 ± 0,02	< 0,001
		range	0,36 - 0,48	0,36 - 0,49		0,40 - 0,48	
		medián	0,42	0,42		0,45	
Fe	umol/L	AV/SD	20,3 ± 8,0	22,2 ± 6,8	0,16	22,4 ± 7,9	0,31
		range	7,1 - 35,6	13,2 - 33,0		12,9 - 38,8	
		medián	20,6	20,4		20,2	
Transferin	g/L	AV/SD	2,73 ± 0,34	2,64 ± 0,32	0,05	2,76 ± 0,36	0,66
		range	2,25 - 3,56	2,07 - 3,29		2,16 - 3,41	
		medián	2,64	2,69		2,68	
Saturace	%	AV/SD	30 ± 13	33 ± 9	0,07	33 ± 11	0,42
		range	11 - 57	22 - 46		19 - 58	
		medián	31	31		31	
Feritin	ug/L	AV/SD	49,8 ± 24,4	59,8 ± 33,9	0,03	58,5 ± 34,3	0,21
		range	7,8 - 117,7	23,9 - 145,2		16,3 - 143,8	
		medián	48,6	55,6		51,1	
sTfR	mg/L	AV/SD	2,86 ± 0,88	3,11 ± 0,65	0,43	2,94 ± 0,68	0,76
		range	1,69 - 4,95	2,29 - 4,71		1,04 - 4,16	
		medián	2,78	2,99		2,90	
qTfRi		AV/SD	0,81 ± 0,44	0,80 ± 0,16	0,76	0,77 ± 0,23	0,66
		range	0,44 - 2,41	0,57 - 1,16		0,26 - 1,18	
		medián	0,70	0,75		0,72	

Legenda: saturace: saturace transferinu, sTfR: solubilní transferinový receptor, qTfRi: index sTfR (= sTfR/ln feritin), p: statistická významnost ke dni 0.

Při hodnocení souboru B (tj. dárců trombocytů a plasmy) v den 180 a 360 nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hodnotách Hb, Ht, Fe, transferinu, saturace transferinu, feritinu, sTfR ani qTfRi v porovnání se dnem 0. Hodnota Ht v den 360 byla dokonce vyšší než v den 0 (tab. č. 16).

Výsledky sledování Hb, Ht a parametrů metabolismu Fe u kontrolního souboru dárců plné krve uvádí tab. č. 17. U hodnot Hb, Ht, hladiny železa a saturace transferinu nedocházelo ke statisticky významnému snížení. V den 360 byly hodnoty Hb a Ht v porovnání s hodnotami v den 0 dokonce vyšší. Zvýšení hladiny transferinu bylo v den 180 na hladině statistické významnosti a v den 360 po čtyřech odběrech plné krve bylo statisticky významné. Hladina feritinu v den 90 a 180 statisticky významně snížena v porovnání s hodnotou v den 0, v den 360 nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Hodnoty sTfR a qTfRi byly statisticky významně zvýšeny po celou dobu sledování. Přípravek železa jsme museli podat u tří dárců, z toho u dvou dárců jsme zjistili pozitivní okultní krvácení.

Tab. č. 17 Vývoj hemoglobinu a parametrů Fe u kontrolního souboru dárců plné krve

Den			0	90		180		360	
Počet dárců			23	23	p	22	p	23	p
Hb	g/L	AV/SD	151 ± 9	153 ± 8	0,04	147 ± 6	0,07	155 ± 9	0,004
		range	137 - 167	142 - 167		135 - 160		140 - 174	
		medián	150	151		148		154	
Ht		AV/SD	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,40	0,43 ± 0,03	0,18	0,46 ± 0,03	< 0,001
		range	0,39 - 0,46	0,38 - 0,47		0,39 - 0,51		0,42 - 0,51	
		medián	0,42	0,43		0,43		0,46	
Fe	umol/L	AV/SD	20,3 ± 8,1	18,8 ± 5,5	0,40	22,7 ± 11,7	0,45	21,7 ± 7,8	0,90
		range	9,8 - 45,9	9,9 - 30,1		7,2 - 60,4		7,9 - 35,1	
		medián	18,7	16,3		19,4		20,3	
Transferin	g/L	AV/SD	2,64 ± 0,35	2,67 ± 0,29	0,31	2,73 ± 0,28	0,046	2,91 ± 0,41	0,003
		range	2,02 - 3,53	2,28 - 3,34		2,30 - 3,23		2,39 - 3,87	
		medián	2,62	2,71		2,71		2,82	
Saturace	%	AV/SD	33 ± 16	28 ± 10	0,39	32 ± 17	0,90	30 ± 10	0,40
		range	16 - 90	13 - 46		12 - 83		12 - 50	
		medián	30	27		30		30	
Feritin	ug/L	AV/SD	57,2 ± 31,3	43,0 ± 27,5	0,001	37,8 ± 24,4	0,001	45,3 ± 27,0	0,09
		range	10,1 - 141,0	11,1 - 110,0		9,9 - 111,0		11,6 - 124,8	
		medián	45,1	32,1		32,8		39,6	
sTfR	mg/L	AV/SD	2,71 ± 0,61	3,33 ± 0,96	< 0,001	3,25 ± 0,85	< 0,001	3,43 ± 0,80	< 0,001
		range	1,54 - 4,53	0,93 - 6,00		0,60 - 4,39		1,97 - 5,01	
		medián	2,72	3,25		3,29		3,19	
qTfRi		AV/SD	0,74 ± 0,24	1,03 ± 0,38	< 0,001	1,01 ± 0,31	< 0,001	0,98 ± 0,34	0,003
		range	0,41 - 1,35	0,54 - 2,28		0,55 - 1,81		0,51 - 1,99	
		medián	0,72	0,94		0,93		0,93	

Legenda: saturace: saturace transferinu, sTfR: solubilní transferinový receptor, qTfRi: index sTfR (= sTfR/ln feritin), p: statistická významnost ke dni 0.

Plasmatické bílkoviny a imunoglobuliny

Při sledování hladin celkové bílkoviny, albuminu a imunoglobulinů jsme nezjistili v dvouletém sledování jejich statisticky významný pokles. Hodnocení uvedených parametrů u souborů A a B po 360 dnech uvádí **tab. č. 18** (hodnoty po 180 dnech byly obdobné, proto nejsou v tabulce uvedeny). Zhodnocení po 720 dnech přineslo obdobné výsledky (**graf č. 4**). U souboru A nedošlo k poklesu hladin CB ($p = 0,20$), albuminu ($p = 0,10$), IgG ($p = 0,41$) a IgM ($p = 0,89$). Rozdíl u hladiny IgA ($p < 0,01$) byl způsoben vzestupem jeho hladiny u 2 dárců. U souboru B nedošlo za 720 dnů k žádným statisticky významným změnám (CB: $p = 1,0$, albumin: $p = 0,82$, IgG: $p = 0,33$, IgA: $p = 0,85$, IgM: $p = 0,97$).

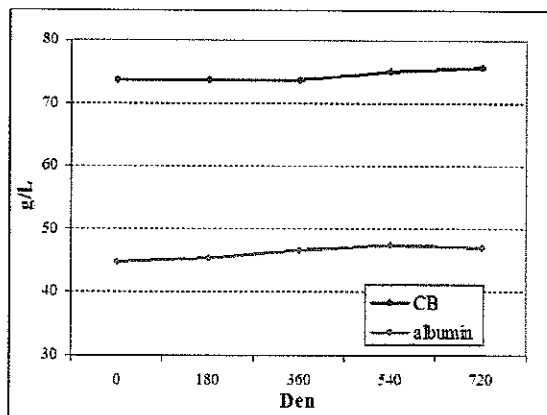
Tab. č. 18 Celková bílkovina, albumin a imunoglobuliny u sledovaného souboru

Den	Soubor A			Soubor B			
	0	360	p	0	360	p	
Počet dárců	19	19		19	19		
Celková bílkovina	AV/SD	73,9 ± 4,3	73,7 ± 4,0	0,20	73,8 ± 2,9	73,5 ± 3,1	0,86
	range	66,7 - 82,8	66,0 - 81,3		69,0 - 79,7	70,2 - 82,5	
	medián	73,4	73,6		73,8	72,7	
Albumin	AV/SD	45,1 ± 1,8	45,9 ± 2,1	0,10	44,3 ± 2,4	45,4 ± 2,6	0,04
	range	42,3 - 48,4	40,5 - 49,1		38,3 - 48,5	39,6 - 48,1	
	medián	44,9	46,4		44,4	45,9	
Imunoglobulin G	AV/SD	10,7 ± 2,3	11,3 ± 2,0	0,09	11,6 ± 2,1	11,6 ± 1,9	0,53
	range	7,29 - 15,5	8,1 - 15,6		9,3 - 18,0	9,9 - 18,2	
	medián	10,3	11,7		11,4	11,4	
Imunoglobulin A	AV/SD	2,61 ± 0,93	2,51 ± 0,8	0,92	2,22 ± 0,74	2,24 ± 0,74	0,81
	range	1,42 - 5,19	1,57 - 4,40		0,84 - 4,39	0,93 - 4,31	
	medián	2,45	2,35		2,08	2,16	
Imunoglobulin M	AV/SD	0,97 ± 0,51	0,89 ± 0,63	0,71	0,95 ± 0,42	0,99 ± 0,49	0,39
	range	0,46 - 2,45	0,33 - 3,11		0,46 - 1,98	0,58 - 2,48	
	medián	0,91	0,8		0,82	0,87	

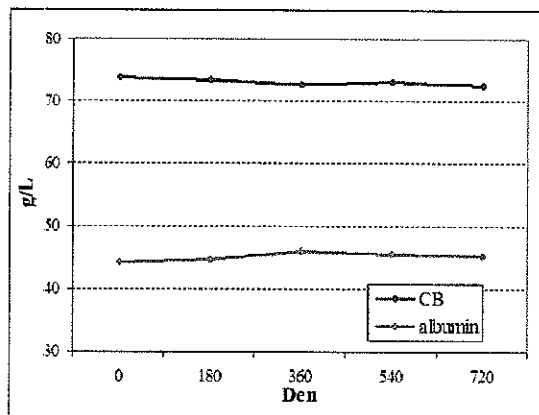
Legenda: Všechny výsledky uvedeny v g/L.

Graf č. 4 Vývoj hladin celkové bílkoviny, albuminu a imunoglobulinů u sledovaného souboru v období dvou let

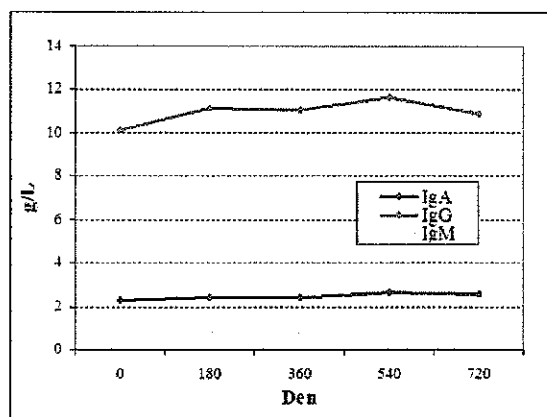
Soubor A



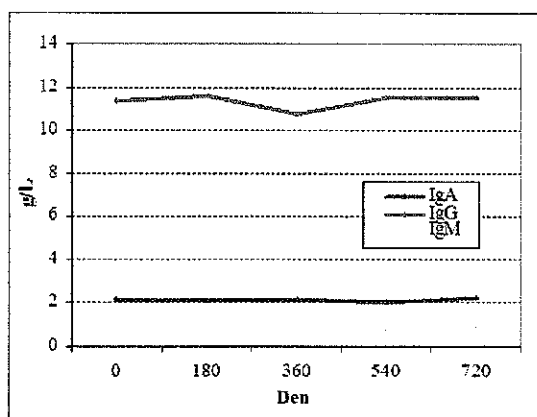
Soubor B



Soubor A



Soubor B



Legenda: Skupina A: odběry 2 TU koncentrátů erytrocytů, trombocytárních koncentrátů. Skupina B: odběry trombocytárních koncentrátů.

4. 3. Jakost transfuzních přípravků

Standardní parametry jakosti (docílení predikované jakosti) a markery buněčného poškození byly vyšetřeny u všech sledovaných typů přípravků.

4.3.1. Parametry jakosti koncentrátů erytrocytů

Základní parametry jakosti erytrocytárních koncentrátů (objem, Hb, Ht a obsah leukocytů v TU) a jejich vývoj během skladování uvádí **tab. č. 19**. EAD MCS, EAD Trima i EAR MCS vykazaly v souladu s jinými autory (4,74,75) vysoký standard objemu a obsahu

Hb v TU v porovnání s ERD z plné krve. U všech jednotek bylo docíleno predikovaného obsahu Hb (> 40 g/TU). Během skladování nedošlo ke snížení obsahu Hb či hodnot Ht v přípravku. Obsah leukocytů u EAD MCS i EAD Trima vyhovoval doporučenému limitu ($< 1 \times 10^6$ /TU) u všech jednotek. U EAR MCS 6 TU stanovený limit ($< 1,2 \times 10^9$ /TU) nesplnilo, 12 TU obsahovalo hraniční příměs leukocytů ($> 1 \times 10^9$ /TU).

Tab. č. 19 Základní parametry jakosti erytrocytárních koncentrátů

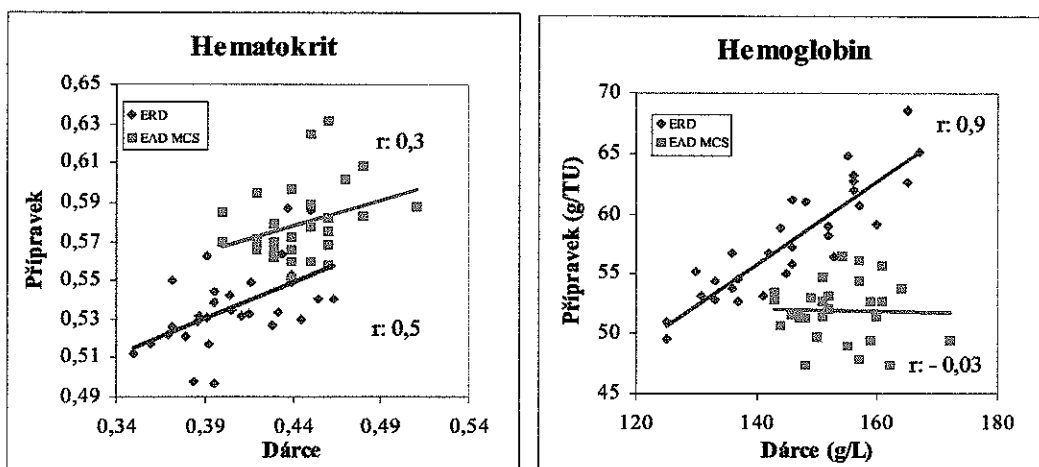
		Objem	Hemoglobin			Hematokrit		Leukocyty	
		ml/TU	den 0	den 40	p	den 0	den 40	p	$\times 10^6$ /TU
EAD MCS n = 40	AV/SD	268 ± 3	53 ± 2	54 ± 2	<0,001	0,57 ± 0,01	0,59 ± 0,02	<0,001	0,05 ± 0,08
	range	260 - 274	50 - 56	51 - 57		0,55 - 0,60	0,55 - 0,64		0,00 - 0,32
	medián	269	53	54		0,57	0,59		0,01
EAD Trima n = 19	AV/SD	276 ± 8	50 ± 2	51 ± 2	<0,001	0,54 ± 0,01	0,56 ± 0,02	<0,001	0,00 ± 0,00
	range	261 - 294	46 - 54	47 - 54		0,52 - 0,57	0,52 - 0,59		0,00 - 0,00
	medián	276	50	51		0,56	0,56		0,00
EAR MCS n = 40	AV/SD	290 ± 3	59 ± 2	59 ± 1	0,01	0,60 ± 0,02	0,63 ± 0,02	<0,001	0,86 ± 0,29 *
	range	281 - 299	56 - 62	57 - 62		0,57 - 0,64	0,58 - 0,67		0,38 - 1,45
	medián	290	59	59		0,60	0,63		0,84
ERD n = 20	AV/SD	295 ± 25	56 ± 5	54 ± 5	0,02	0,55 ± 0,03	0,53 ± 0,04	0,05	0,02 ± 0,04
	range	252 - 327	47 - 66	46 - 63		0,52 - 0,60	0,45 - 0,59		0,00 - 0,12
	medián	301	56	54		0,54	0,53		0,00

Legenda: EADMCS: erytrocyty deleukotizované ze separátoru MCS, EAD Trima: erytrocyty deleukotizované ze separátoru Trima, EAR MCS: erytrocyty resuspendované ze separátoru MCS, ERD: erytrocyty deleukotizované z plné krve, * $\times 10^9$ /TU, n: počet transfuzních jednotek.

U koncentrátů erytrocytů z aferézy (EAD MCS, EAD Trima, EAR) jsme nezjistili korelaci obsahu Hb a Ht v produktu s předodběrovými hodnotami Hb a Ht dárce krve (výsledek standardizovaného přístrojového odběru), tak jako u přípravků z plné krve. Porovnání mezi EAD MCS a ERD uvádí **graf č. 5**. Korelační koeficienty (r) u EAD Trima byly obdobné (pro Hb: -0,01, pro Ht: 0,21).

U všech typů erytrocytárních koncentrátů z aferézy i kontrolního souboru koncentrátů z plné krve došlo ke statisticky významnému vzestupu **markerů membránového poškození buňky** - výsledky stanovení hodnot volného Hb, pH, kalia, hladiny laktátu, LDH, glukosy a annexinu V v den skladování 0 a 40 uvádí **tab. č. 20**.

Graf. č. 5 Závislost Hb a Ht v přípravku na předodběrových hodnotách dárce krve



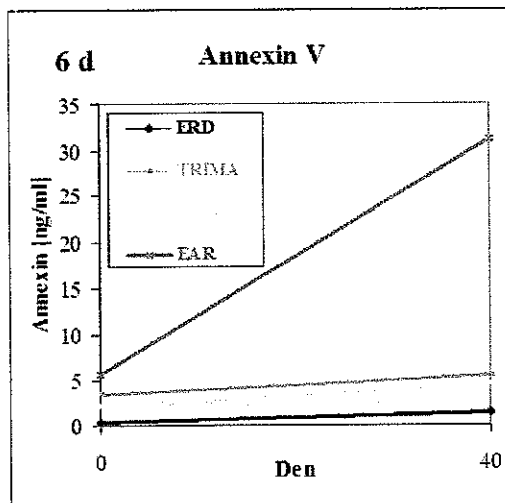
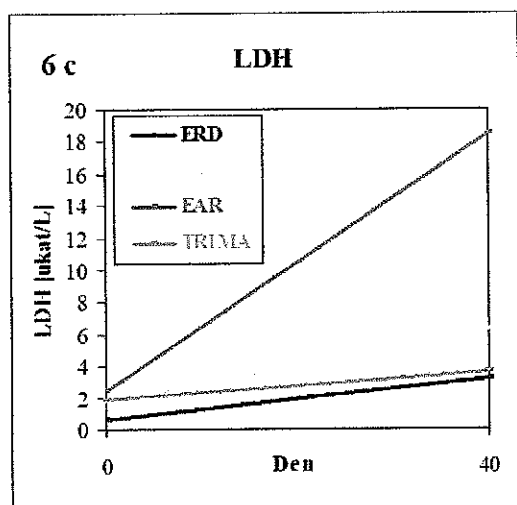
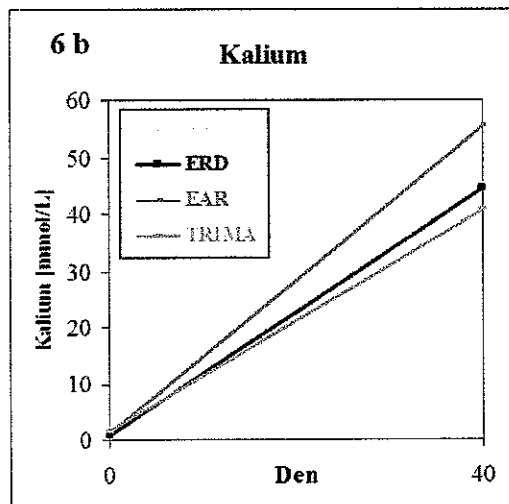
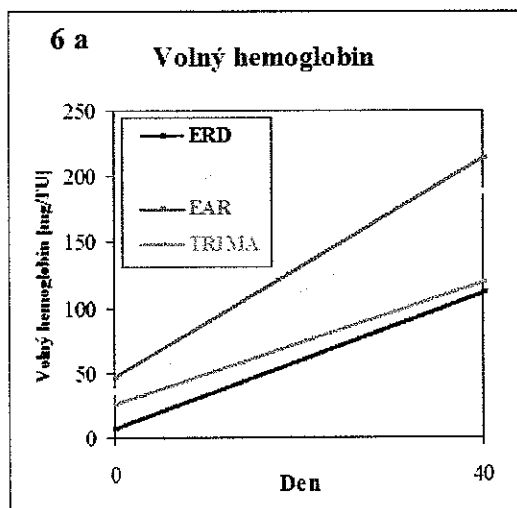
Tab. č. 20 Vývoj parametrů membránového poškození erytrocytu

		EAD MCS n=20		EAD TRIMA n=19		EAR MCS n=20		ERD n=20		
		0	40	0	40	0	40	0	40	
Den										
	Volný Hb	AV/SD	36 ± 5	212 ± 97	26 ± 18	120 ± 33	47 ± 10	216 ± 65	8 ± 6	124 ± 67
	mg/TU	range	29 - 47	80 - 556	11 - 86	82 - 229	27 - 61	129 - 354	3 - 28	
		medián	35	198	21	120	50	196	6	103
pH		AV/SD	7,49 ± 0,14	6,73 ± 0,08	7,32 ± 0,06	6,64 ± 0,05	7,54 ± 0,07	6,75 ± 0,06	7,48 ± 0,10	6,73 ± 0,10
		range	7,16 - 7,65	6,59 - 6,93	7,23 - 7,42	6,53 - 6,73	7,45 - 7,73	6,65 - 6,87	7,37 - 7,78	6,62 - 6,94
		medián	7,54	6,72	7,33	6,66	7,53	6,74	7,46	6,76
K+		AV/SD	1,8 ± 0,7	44,4 ± 16,6	1,7 ± 0,4	40,7 ± 7,9	1,2 ± 0,3	55,2 ± 9,1	0,9 ± 0,2	45,0 ± 10,3
	mmol/L	range	1,0 - 3,1	18,0 - 71,8	1,2 - 2,6 - 3	21,5 - 50,1	0,9 - 2,5	35,5 - 69,0	0,6 - 1,6	25,0 - 59,6
		medián	1,9	49,4	1,6	41,2	1,2	56,8	0,9	47,5
Annexin V		AV/SD	2,1 ± 1,3	4,5 ± 2,7	3,4 ± 1,8	5,5 ± 3,2	5,7 ± 4,2	31,2 ± 3,8	0,3 ± 0,5	1,5 ± 1,0
	ng/mL	range	0,7 - 4,7	1,9 - 11,3	0,9 - 8,2	2,1 - 14,3	1,8 - 20,8	26,1 - 42,4	0,1 - 2,1	0,6 - 4,7
		medián	1,4	3,5	2,9	4,6	4,8	30,4	0,2	1,1
Glukosa		AV/SD	27,0 ± 2,0	9,6 ± 0,8	25,1 ± 1,3	12,3 ± 1,2	26,8 ± 2,1	9,0 ± 1,0	29,9 ± 2,4	14,2 ± 3,1
	mmol/L	range	22,6 - 29,7	7,9 - 11,1	23,7 - 28,8	10,5 - 15,5	23,7 - 32,9	6,8 - 10,4	28,1 - 39,1	11,1 - 20,5
		medián	27,5	9,5	24,8	12,1	26,5	9,0	29,4	14,3
LDH		AV/SD	1,82 ± 0,46	6,52 ± 1,79	1,84 ± 0,81	3,60 ± 0,87	2,44 ± 0,58	18,8 ± 4,39	0,70 ± 0,21	3,50 ± 1,73
	ukat/L	range	0,26 - 2,86	3,97 - 9,64	1,18 - 4,52	1,59 - 5,10	1,77 - 4,24	11,7 - 26,5	0,36 - 1,23	1,73 - 4,98
		medián	1,8	6,21	1,6	3,79	2,32	17,6	0,69	3,10
Laktát		AV/SD	2,77 ± 0,44	22,41 ± 13,7	1,59 ± 0,23	30,98 ± 4,73	2,14 ± 0,25	27,18 ± 13,13	2,02 ± 0,46	31,80 ± 6,65
	mmol/L	range	2,11 - 3,55	8,47 - 45,45	1,27 - 1,95	25,30 - 43,15	1,78 - 2,86	7,58 - 47,25	1,36 - 2,75	24,57 - 43,40
		medián	2,71	13,89	1,57	30,45	2,06	34,87	2,08	33,17

Legenda: EAD MCS: erythrocyty deleukotizované ze separátoru MCS, EAD Trima: erythrocyty deleukotizované ze separátoru Trima, EAR MCS: erythrocyty resuspendované ze separátoru MCS, ERD: erythrocyty deleukotizované z plné krve. Pro všechny rozdíly mezi dnem 0 a 40: p < 0,001.

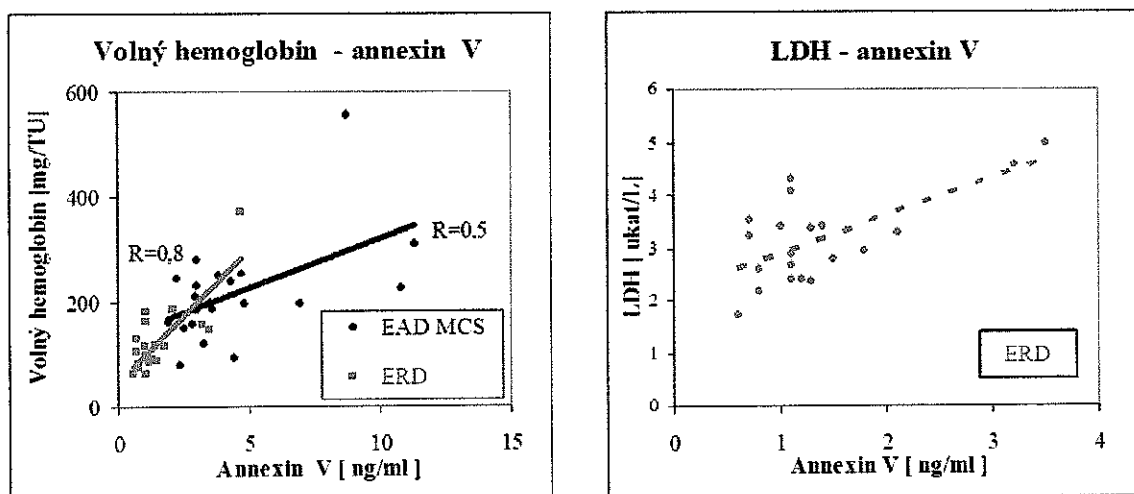
Předepsaný **stupeň hemolýzy** (< 0,8% erythrocytové masy na konci skladování) byl splněn u všech odebraných produktů. Vzestup obsahu **volného Hb** byl významnější u obou typů erytrocytů ze separátoru MCS ve srovnání s ERD z plné krve (EAD MCS: $p = 0,03$, EAR MCS: $p = 0,009$) i s EAD Trima ($p < 0,001$). Rozdíl mezi EAD Trima a ERD nebyl statisticky významný ($p = 0,18$) (**graf č. 6a**). Nejvýznamnější vzestup hladiny **kalia** jsme zaznamenali u EAR MCS (proti EAD MCS: $p = 0,007$, proti EAD Trima a ERD: $< 0,001$), mezi ostatními přípravky nebyly statisticky významné rozdíly (EAD Trima proti EAD MCS: $p = 0,19$, EAD Trima proti ERD: $p = 0,10$, EAD MCS proti ERD: $p = 0,98$) (**graf č. 6b**). Korelaci hodnot kalia se stupněm hemolýzy jsme nepotvrdili (r : EAD MCS: $- 0,1$, ERD: $0,1$, EAR MCS: $0,3$, EAD Trima: $- 0,2$). Významný pokles **pH** jsme zaznamenali u EAD Trima proti EAR ($p < 0,001$) a proti EAD MCS ($p = 0,03$). U žádného typu erythrocytárního přípravku pH nekleslo pod hodnotu 6,5. Vzestup hodnot **LDH** během skladování byl nejvyšší u EAR MCS, vyšší u EAD MCS než u EAD Trima (vše $p < 0,001$) (**graf č. 6c**). Hodnoty LDH středně až velmi silně korelovaly se stupněm hemolýzy u všech typů erytrocytů (r : EAD MCS: $0,7$, ERD: $0,9$, EAR MCS: $0,5$, EAD Trima: $0,4$). Vzestup **laktátu** byl vyšší u ERD proti EAD MCS ($p < 0,01$), bez korelací s ostatními parametry. Pokles hladiny **glukózy** byl srovnatelný u obou přípravků ze separátoru MCS ($p = 0,86$). Obsah glukózy poklesl nejméně u EAD Trima (proti EAD MCS: $p < 0,001$, proti EAR MCS: $p < 0,001$, proti ERD: $p = 0,003$). Vzestup hodnot **annexinu V** byl statisticky nejvýznamnější u EAR MCS ($p < 0,001$). U EAD Trima a EAD MCS byl vzestup annexinu V srovnatelný ($p = 0,33$) (**graf č. 6d**). Při porovnání EAD Trima s ERD z plné krve nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p = 0,25$), u EAD MCS byl vzestup vyšší ($p = 0,009$). Hladiny annexinu V korelovaly se vzestupem volného Hb u EAD MCS a ERD, s LDH pouze u ERD (**graf č. 7**). Hodnoty annexinu V v přípravcích v den 0 byly v porovnání s hladinou u dárce krve před odběrem nižší (EAD MCS: $2,1 \pm 1,3$, dárce $10,7 \pm 8,8$, $p < 0,001$, ERD: $0,3 \pm 0,5$, dárce $6,0 \pm 4,9$, $p < 0,001$, vše v ng/ml). U EAD Trima annexin V u dárců krve nebyl stanoven z finančních důvodů.

Graf č. 6 Vzestup parametrů buněčného poškození erytrocytů během skladování



Legenda: MCS: erythrocyty deleukotizované ze separátoru MCS, Trima: erythrocyty deleukotizované ze separátoru Trima, EAR: erythrocyty resuspendované ze separátoru MCS, ERD: erythrocyty deleukotizované z plné krve.

Graf č. 7 Korelace vzestupu annexinu V s vHb a LDH u erytrocytárních koncentrátů



EAD MCS: $r = 0,8$, $p < 0,001$
 ERD: $r = 0,5$, $p = 0,01$
 EAR MCS: $r = 0,13$, $p = 0,61$
 EAD Trima: $r = 0,22$, $p = 0,40$

ERD: $r = 0,8$, $p < 0,001$
 EAD MCS: $r = 0,4$, $p = 0,08$
 EAD Trima: $r = 0,4$, $p = 0,16$
 EAR MCS: $r = 0,13$, $p = 0,6$

Legenda: EAD MCS: erythrocyty deleukotizované ze separátoru MCS, EAD Trima: erythrocyty deleukotizované ze separátoru Trima, EAR MCS: erythrocyty resuspendované ze separátoru MCS, ERD: erythrocyty deleukotizované z plné krve.

4.3.2. Parametry jakosti trombocytárních koncentrátů

Základní parametry jakosti (objem, obsah trombocytů v přípravku a kontaminace leukocyty) byly zhodnoceny u všech trombocytárních koncentrátů získaných pěti variantami odběrů na dvou separátorech. Výsledky uvádí **tab. č. 21**.

Tab. č. 21 Základní parametry jakosti trombocytárních koncentrátů

Separátor MCS	počet	Objem (ml/TU)			PLT ($\times 10^9$ /TU)		
		AV/SD	range	med.	AV/SD	range	med.
2 TU TA	48	193 ± 7	175 - 214	192	241 ± 33	185 - 321	233
TA + PA	81	233 ± 25	175 - 296	230	277 ± 41	202 - 390	274
TA 300 MCS + PA	57	273 ± 21	233 - 321	247	366 ± 44	265 - 462	370
Separátor Trima							
TA 300 Trima + PA	36	277 ± 23	257 - 284	278	351 ± 37	266 - 491	352
TA 300 + RBC	40	281 ± 4	272 - 290	204	330 ± 31	263 - 412	322

Legenda: TA: trombocyty z aferézy ($> 200 \times 10^9$ PLT), TA 300: trombocyty z aferézy ($> 300 \times 10^9$ PLT), PA: plasma z aferézy, RBC: erythrocyty z aferézy, AV/SD: průměr ± směrodatná odchylka, med.: medián.

Trombocytární koncentráty z obou separátorů vykazaly vysoký standard obsahu trombocytů. Predikované jakosti na separátoru Trima bylo docíleno u 33 ze 36 odběrů TA300 + PA a u 38 ze 40 odběrů TA300 + RBC. U přípravků na separátoru MCS bylo dosaženo stanovené výtěžnosti 200×10^9 u všech odběrů TA + PA, u odběrů TA300 + PA stanovené výtěžnosti 300×10^9 nebylo dosaženo u 4 z 57 odběrů. U odběrů 2 TU TA nebylo stanovené výtěžnosti 200×10^9 docíleno u 3 z 48 odběrů. Limit obsahu leukocytů byl splněn u všech přípravků ($< 1,0 \times 10^6$ /TU). Při porovnání výtěžnosti trombocytárních koncentrátů získaných odběrem TA300 + PA nebyl mezi přípravky z obou separátorů zjištěn statisticky významný rozdíl ($p = 0,08$). Také koncentráty získané odběrem TA300 + RBC měly srovnatelnou výtěžnost s přípravky získanými odběrem TA300 + PA na obou separátorech ($p = 0,11/0,48$).

Markery poškození a aktivace trombocytů na začátku a na konci expirace přípravků (pH, obsah glukosy, laktátu, LDH, annexin V, sP-selektin) byly hodnoceny u trombocytárních koncentrátů s obsahem PLT $> 300 \times 10^9$. U přípravků získaných odběrem TA300 + PA na obou separátorech došlo během skladování k statisticky významným změnám uvedených markerů, výsledky uvádí **tab. č. 22**. U koncentrátů získaných odběrem TA300 + RBC na separátoru Trima byly změny biochemických parametrů srovnatelné s výsledky TA300 Trima (pH: $p = 0,35$, LDH: $p = 0,67$, laktát: $p = 0,25$). S ohledem na toto zjištění a proto, že se jedná o stejný odběrový protokol, jsme stanovení annexinu V a sP-selektinu neprováděli a číselné hodnoty v práci nejsou uváděny.

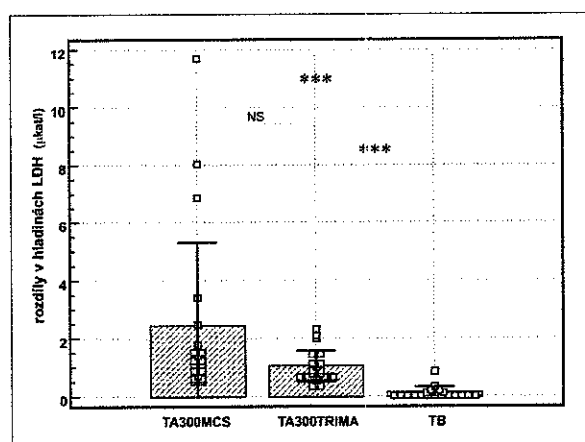
Hodnota **pH** v den přípravy byla statisticky významně nižší u přípravků z plné krve (TB) než u TA300 Trima a TA300 MCS ($p = 0,004$), rozdíly mezi těmito aferetickými přípravky nebyly signifikantní ($p = 0,46$). Na konci expirace byly hodnoty pH u TB vyšší než u aferetických přípravků ($p < 0,001$). Ani v jednom případě nedošlo k poklesu pH pod kritickou mez 6,2. Hladina **glukosy** byla v den 0 nejnižší u TA300 Trima, což souvisí s nízkým obsahem glukosy v použitém antikoagulačním roztoku. Hladina **laktátu** v den přípravy byla u TA300 Trima a TA300 MCS srovnatelná ($p = 0,08$) a nižší než u TB ($p < 0,001$). Hodnota **LDH** v den přípravy byla srovnatelná u aferetických přípravků TA300 i TB (TB proti TA300 Trima: $p = 0,2$, TB proti TA300 MCS: $p = 0,07$, TA300 Trima proti TA300 MCS: $p = 0,2$). Zvýšení hodnoty LDH během skladování bylo srovnatelné u TA 300 z obou separátorů ($p = 0,055$) a vyšší v porovnání s TB ($p < 0,001$) (**graf č. 8**). V den 5 jsme našli extrémně vysoké zvýšení LDH ve třech jednotkách TA300 MCS ($> 30 \mu\text{kat/L}$), což mohlo být způsobeno zhoršenými skladovacími podmínkami, vedoucími k většímu poškození trombocytů v přípravcích.

Tab. č. 22 Parametry poškození a aktivace u trombocytárních koncentrátů

	den	TA 300 Trima n= 20			TA 300 MCS n= 20			TB n= 20		
		0	5	p	0	5	p	0	5	p
pH	AV/SD	7,2 ± 0,0	7,0 ± 0,2	< 0,001	7,2 ± 0,2	6,9 ± 0,2	< 0,001	7,2 ± 0,0	7,3 ± 0,1	< 0,001
	range	7,2 - 7,3	6,3 - 7,3		7,1 - 7,7	6,6 - 7,3		7,1 - 7,2	7,1 - 7,5	
	medián	7,2	7,0		7,2	7,0		7,2	7,3	
Laktát mmol/L	AV/SD	1,5 ± 0,4	16,9 ± 3,7	< 0,001	1,25 ± 0,46	17,06 ± 3,08	< 0,001	2,76 ± 0,58	8,85 ± 2,44	< 0,001
	range	1,3 - 7,3	11,8 - 27,0		0,5 - 2,6	11,4 - 23,1		1,9 - 4,1	5,0 - 14,8	
	medián	1,5	17,0		1,2	17,2		2,7	8,3	
LDH ukat/L	AV/SD	4,4 ± 0,5	7,7 ± 1,7	< 0,001	4,48 ± 1,01	12,44 ± 11,37	0,002	4,14 ± 0,56	5,85 ± 2,38	0,005
	range	3,6 - 5,4	5,4 - 11,8		3,1 - 7,2	4,7 - 48,3		3,0 - 5,3	3,7 - 14,7	
	medián	4,4	7,4		4,4	8,5		4,1	5,0	
Glukosa mmol/L	AV/SD	20,0 ± 1,6	12,7 ± 2,3	< 0,001	25,2 ± 3,0	21,7 ± 1,9	< 0,001	23,6 ± 1,0	20,7 ± 1,2	< 0,001
	range	18,3 - 24,0	8,0 - 16,2		20,2 - 31,7	17,2 - 24,7		22,0 - 26,1	18,5 - 23,0	
	medián	19,4	12,7		25,5	21,9		23,7	21,0	
Annexin V ng/mL	AV/SD	13,5 ± 6,2	20,9 ± 4,2	< 0,001	8,7 ± 6,9	22,7 ± 3,9	< 0,001	14,6 ± 5,2	19,5 ± 3,3	< 0,001
	range	5,2 - 25,9	8,2 - 26,8		0,7 - 24,9	17,3 - 31,2		4,6 - 21,0	9,7 - 24,1	
	medián	11,7	21,5		8,4	23,1		15,4	20,2	
sP-selektin ng/mL	AV/SD	141,3 ± 115,0	357,5 ± 107,4	< 0,001	79,1 ± 59,6	382,0 ± 139,5	< 0,001	173,6 ± 102,8	240,9 ± 105,9	0,053
	range	40,2 - 379,3	175,4 - 533,7		20,4 - 262,3	201,6 - 710,2		51,4 - 374,9	80,0 - 560,5	
	medián	95,8	327,7		58,1	396,9		154,0	218,2	

Legenda: TA300 Trima: trombocyty ze separátoru Trima (> 300x10⁹ PLT), TA300 MCS: trombocyty ze separátoru MCS (> 300 x10⁹ PLT), TB: trombocyty z buffy coatu (kontrolní soubor).

Graf č. 8 Vzestup hladiny LDH u trombocytárních koncentrátů během skladování

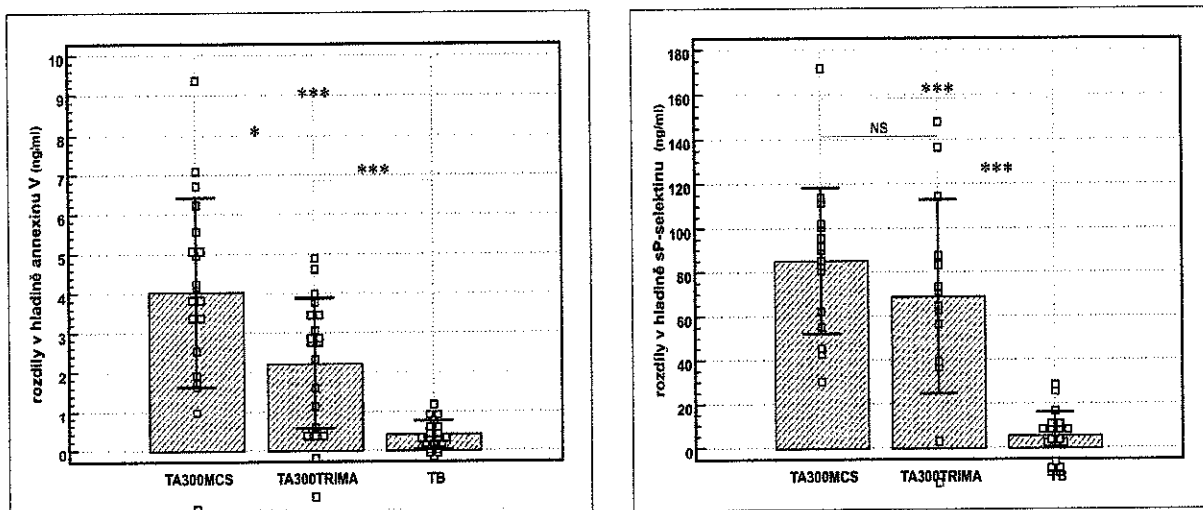


Legenda: *** p < 0,001, NS: p > 0,05.

Hodnoty **annexinu V** (ng/ml) (**tab. č. 22**) na začátku exspirace byly nejnižší u TA300 MCS. U TA300 Trima a TB byly hladiny vyšší (TA300 Trima proti TA300 MCS: $p = 0,02$, TA300 MCS proti TB: $p = 0,002$). Nejvýznamnější vzestup hladiny annexinu V na konci skladování byl zjištěn u TA300 MCS (proti TA300 Trima: $p = 0,01$, proti TB: $p < 0,01$) (**graf č. 9**). Hodnoty **sP-selektinu** (ng/ml) (**tab. č. 22**) byly na začátku exspirace nejnižší u TA300 MCS, vyšší u TA300 Trima a TB. Mezi TA300 Trima a TB nebyl statisticky významný rozdíl (TA300 Trima proti TA300 MCS: $p = 0,07$, TA300 Trima proti TB: $p = 0,32$, TA300 MCS proti TB: $p = 0,002$). Zvýšení hladiny sP-selektinu během skladování bylo srovnatelné u TA300 MCS a TA300 Trima ($p = 0,28$) a vyšší v porovnání s TB ($p < 0,001$), kde ke změně hladiny sP-selektinu nedošlo ($p = 0,053$) (**graf č. 9**).

Graf č. 9

Vzestup annexinu V a sP- selektinu u trombocytárních koncentrátů během skladování



Legenda: TA300 Trima: trombocyty ze separátoru Trima ($> 300 \times 10^9$ PLT), TA300 MCS: trombocyty ze separátoru MCS ($> 300 \times 10^9$ PLT), TB: trombocyty z buffy coatu (kontrolní soubor)
 *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, NS: $p > 0,05$.

Nalezli jsme signifikantní zvýšení hladiny annexinu V i sP- selektinu v TA300 Trima a TB v porovnání s hladinami těchto markerů v periferní krvi u dárců před odběrem (**tab. č. 23**). U TA300 MCS jsme takové zvýšení nenašli. Z výsledků lze usoudit, že tyto změny v hladinách uvedených markerů v různých typech přípravků v čase přípravy mohou být způsobeny pouze vlivem použité technologie.

Tab. č. 23

Hladiny annexinu V a sP selektinu u dárce krve před odběrem a v přípravku

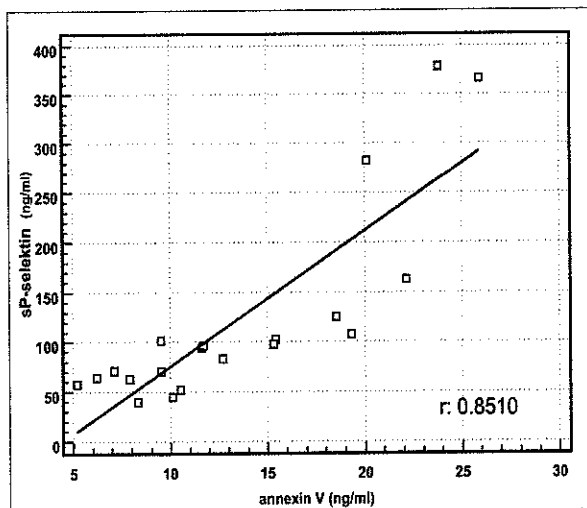
		TA 300 Trima n= 20			TA 300 MCS n= 20			TB n= 20		
		TA	DK	p	TA	DK	p	TA	DK	p
Annexin V ng/ml	AV/SD	13,5 ± 6,2	9,1 ± 5,9	0,02	8,7 - 6,9	9,5 ± 7,2	0,62	14,9 ± 5,1	5,5 ± 4,0	< 0,001
	range	5,2 - 25,9	2,0 - 25,1		0,7 - 24,9	1,6 - 23,4		4,8 - 21,0	1,4 - 19,1	
	medián	11,7	6,9		8,4	6,7		15,4	3,3	
sP-selektin ng/ml	AV/SD	123,6 ± 100,3	63,8 ± 33,5	0,02	80,5 ± 6,9	84,3 ± 62,2	0,81	179,0 ± 102,6	74,7 - 50,3	< 0,001
	range	40,2 - 379,3	31,1 - 146,9		20,4 - 262,3	16,9 - 268,1		51,4 - 374,9	10,5 - 205,0	
	medián	95,8	48,4		59,1	69		154,0	60,5	

Legenda: TA: hladiny annexinu a sP-selektinu v trombokonzentrátech, DK: hladiny annexinu V a sP-selektinu u dárce před odběrem.

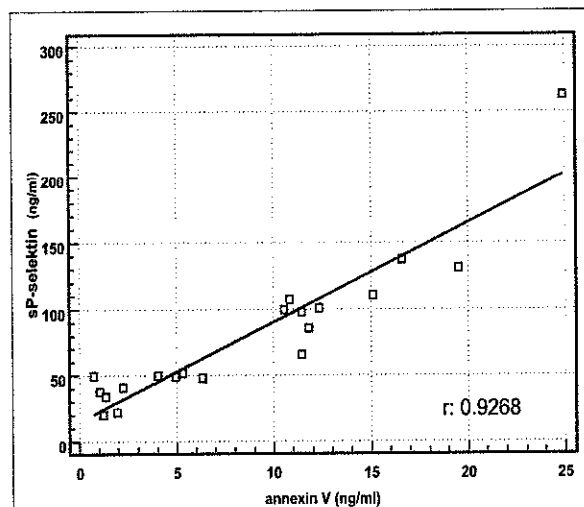
Zhodnotili jsme závislost hladin sP-selektinu na hladině annexinu V na začátku a na konci skladování. Silná až velmi silná závislost byla nalezena v den přípravy u všech typů produktů (TA300 MCS: $r = 0,85$, TA300 Trima: $r = 0,93$ (graf č. 10), TB: $r = 0,72$). Na konci skladování tato závislost nalezena nebyla.

Graf č. 10 Závislost hladin sP-selektinu na annexinu V u TA 300 v den přípravy

TA300 Trima



TA300 MCS



Legenda: TA300 Trima: trombocyty ze separátoru Trima ($> 300 \times 10^9$ PLT), TA300 MCS: trombocyty ze separátoru MCS ($> 300 \times 10^9$ PLT).

U obou uvedených typů trombocytárních koncentrátů z aferézy jsme porovnali vliv trvání aferézy na hodnoty annexinu V a sP-selektinu v přípravcích v den přípravy a na konci skladování. U TA300 Trima jsme prokázali střední stupeň závislosti hodnot annexinu V na trvání aferézy ($r_s = 0,48$, $p = 0,03$) pouze na konci skladování, u sP-selektinu korelace zjištěna nebyla. U TA300 MCS jsme korelaci annexinu V na čase nenalezli, avšak hladina sP-selektinu středně korelovala s časem aferézy v den přípravy i na konci skladování (den 0: $r_s = 0,65$, $p = 0,01$, den 5: $r_s = 0,58$, $p = 0,03$). Je otázkou, zda tento fakt je způsoben vlivem aferetických technologií na trombocyt.

4. 4. Vstupní kritéria pro dárce krve

Vycházeli jsme z Doporučení Rady Evropy (38) a českých pravidel pro výběr dárců krve (143). Na základě výše získaných poznatků jsme vstupní kritéria pro dárce MKO upřesnili.

Pro výběr dárců **dvojitých erythrocytaferéz** je vhodné výběrová kritéria Doporučení Rady Evropy doplnit o stanovení feritinu. Jako optimální se ukázala hodnota nad 40 $\mu\text{g/L}$, při které dárce rychleji doplňovali zásoby železa (str. 34).

U **kombinovaných trombocytaferéz** jsme vyhodnotili vliv předodběrové hodnoty trombocytů dárce a TBV na trvání aferézy. Trvání aferéz silně korelovalo s předodběrovým počtem trombocytů u všech typů odběrů na obou separátorech (odběry TA300 + PA a TA300 + RBC - str. 30, další odběry na MCS: TA + PA: $r = - 0,7$, 2 TA: $r = - 0,8$). Zjistili jsme statisticky významný nižší předodběrový počet trombocytů u dárce krve a kratší trvání aferézy u přístroje Trima v porovnání s odběrem TA300 + PA na přístroji MCS ($p < 0,001$), statisticky významný rozdíl ve výtěžnosti získaných produktů však zjištěn nebyl (str. 30). Prokázali jsme, že předodběrová hodnota trombocytů dárce se tedy ukazuje jako klíčový parametr pro výběr dárce a volbu připravovaného TP a ovlivňuje trvání aferézy.

Řada prací udává TBV jako výběrový faktor pro MKO, avšak bez konstatování jeho významu. Závislost délky odběru na TBV dárce nebyla zjištěna nebo byla slabá (odběry TA300 + PA a TA300 + RBC - str. 30,31, další odběry na MCS: TA + PA: $r = 0,07$, 2 TA: $r = 0,4$). Naše výsledky ukazují, že TBV dárce je u kombinovaných odběrů trombocytů s plasmou nebo erythrocyty limitujícím faktorem pro stanovení odebíraného objemu přípravku, pro trvání aferézy je význam minimální (93,94). Jako optimální se ukazuje hodnota TBV větší než 4 300 ml pro odběr trombocytárních koncentrátů o obsahu $> 300 \times 10^9$ PLT, protože při

této hodnotě TBV je pravděpodobnost překročení povoleného limitu odběru (13% TBV) prakticky vyloučena (97).

Zařazení speciálního váhového kritéria mezi výběrová není mimo odběr dvojité erythrocytaferézy nutné, neboť je zohledněno při výpočtu TBV. Proto jsme také jako výběrové kritérium zařadili váhový limit 50 kg dle Doporučení Rady Evropy (38) (tab. č. 24).

Výsledky ukázaly na nutnost vybírat dárce diferencovaně dle přístrojů i dle jednotlivých protokolů na přístroji. Univerzální výběrová kritéria pro tento typ odběrů nelze očekávat.

Dlouhodobé monitorování zdravotního stavu dárce u opakovaných dvojitých erythrocytaferéz je účelné doplnit o monitorování hladiny feritinu (tab. 14 a 15, str. 35 a 36). Stanovit jednoznačně interval vyšetření je obtížné. Jako optimální se ukazuje stanovení 1x ročně, ale protože dárce obvykle neabsolvují tento typ odběru přesně po 180 dnech, je stanovení feritinu vhodné načasovat v druhém čtvrtletí po dvojitě erythrocytaferéze, kdy je možné očekávat vzestupný trend zásob železa.

Tab. č. 24 Vstupní kritéria pro dárce krve

Parametry	2 TA, TA+PA	TA + RBC	2 RBC	
TBV (ml)	> 4300		> 5000	
Váha (kg)	>50		> 70	
Hematokrit	Muži > 0,40	> 0,30*	> 0,42	> 0,30 *
	Ženy > 0,38			
Hemoglobin (g/L)	Muži > 135	> 110*	> 140	> 110 *
	Ženy > 125			
Trombocyty x 10 ⁹ /L > 1,5 TU	1TU > 200	-	> 130 ⁿ	
	MCS > 260			
	Trima > 220	Trima > 220		
Feritin (ug/L)	-		> 40	
Časový limit (min.)	< 75		-	

Legenda: RBC: erythrocyty z aferézy, TA: trombocyty z aferézy, PA: plasma, TU: transfúzní jednotka (> 200 x 10⁹ PLT), * limit hodnot po odběru, ⁿ spodní fyziologická mez trombocytů v periferní krvi dárce.

5. Rozprava

Problematika multikomponentních aferéz je aktuálním tématem současné transfuziologie. I když metodika je známa přes 10 let, rozvinula se až v posledních letech a neustále se objevují nové detaily, které je nutno prozkoumat. Přispívá k tomu nejen neustálý vývoj přístrojů, ale i nové poznatky v oboru transfuziologie, např. buněčné imunologie v oblasti buněčné apoptózy, jak uvádí řada studií publikovaných v zahraničí (18,63). Naše studie byla v ČR na toto téma jediná a přinesla řadu nových zjištění.

5. 1. Vliv metodiky na zdravotní stav dárce krve

Ověřili jsme bezprostřední bezpečnost metodiky pro dárce krve. V souladu s literaturou jsme nezaznamenali vyšší nežádoucí výskyt vedlejších účinků v porovnání se souborem dárců plné krve (31,73,83,90,91,110). Relativně vysoké množství použitého antikoagulačního roztoku při odběrech TA300 + RBC na separátoru Trima bylo dobře tolerováno, nezaznamenali jsme žádné citrátové reakce, podobně jako jiní autoři (19). Hodnoty hemoglobinu i počtu trombocytů v periferní krvi dárců zkoumaného souboru po všech typech odběrů s vysokou rezervou překračovaly doporučené limity. Po trombocytaferéze na separátoru MCS i Trima byl pokles počtu trombocytů srovnatelný ($p = 0,96$), podobně jako zjistili Picker a spol., 2006 (88). Pokles hladiny hemoglobinu jako našel Beyan a spol., 2003 (8) jsme nezaznamenali. Bylo prokázáno, že při procedurách nedochází k poškození a aktivaci buněk, které jsou navraceny dárci (str. 32 a 33, tab. č. 12 a 13). Toto zjištění lze považovat za původní, v literatuře jsme nenašli obdobnou referenci. Původní je také zjištění vyšších hodnot annexinu V v periferní krvi před odběrem u souboru aferetických dárců ve srovnání s dárci plné krve (96). Protože příčina není jasná a tento fakt jsme v literatuře též nenašli, chceme jej v budoucnu ověřit, také vzhledem k četnosti provedených měření ($n = 69$) u sledovaného souboru. Tento fakt v případě potvrzení může souviset spíše s aplikací aferetických technik obecně.

Dvouleté sledování dárců prokázalo, že nedochází k významným změnám v zásobách železa ani ve spektru sledovaných plasmatických bílkovin, naše zjištění je v souladu s literaturou (5,124). U dárců dvou jednotek erytrocytů došlo po odběru k statisticky významnému poklesu hladiny Hb, Ht, Fe a feritinu. U většiny dárců došlo k spontánní úpravě uvedených parametrů. U hodnot Hb, Ht a Fe tomu tak bylo za 90 dnů, u feritinu za 180 dnů, podobně jako zjistili i jiní autoři (47,110). U dárců s hladinou feritinu nad 40 $\mu\text{g/L}$ docházelo k rychlejší spontánní rekonstituci zásob železa, tuto hodnotu feritinu je možné zařadit jako výběrové kritérium pro dárce tohoto typu odběrů. Bonomo a spol., 2004 (16)

doporučuje hodnotu feritinu nad 50 ug/L, takto se však počet vhodných dárců může významně snížit. Z našeho souboru tomuto kritériu vyhovělo pouze 9 dárců.

Dlouhodobě přetrvával statisticky významný vzestup sTfR i indexu qTfRi. Uvedené změny sTfR a qTfRi jsme zaznamenali i při dlouhodobém sledování dárců plné krve, což může signalizovat obdobně se snižující zásoby železa u obou typů odběrů (91). Porovnání souboru dárců 2 TU RBC se souborem dárců plné krve tak prokázalo, že dvojitá erythrocytaferéza a frekventní dárcovství plné krve představují pro dárce srovnatelnou zátěž. Pro praxi bude u opakovaných dárců nejen dvojitých erythrocytaferéz, ale i plné krve důležité doplnit monitorování metabolismu železa (113), jak je i nově doporučeno 12. vydáním Doporučení Rady Evropy (39). Naše výsledky prokázaly, že monitorování hladiny feritinu bude vhodné zařadit 1x ročně anebo vždy po dvou erythrocytaferézách. Někteří autoři doporučují stanovení sTfR jako citlivější marker nedostatku železa, zejména u dárců dvojitých erythrocytaferéz (29). Nicméně vzhledem k vysoké ceně tohoto vyšetření bude třeba jeho indikaci posuzovat individuálně.

Preventivní aplikace preparátů Fe tak, jak ji doporučují někteří autoři (98,110), by jistě urychlila regeneraci jeho zásob. Naše výsledky ukazují, že paušální substituce přípravky železa není nutná. Domníváme se, že je nutno k ní přistupovat individuálně, s vědomím nutnosti diferenciatně diagnostické rozvahy i nad jinými možnými příčinami nedostatku železa (17,112,121,122), s etickým i medicínským aspektem a doplnit monitorování zásob Fe při opakovaných odběrech.

Vypracování zvláštního schématu pro dlouhodobé sledování dárců MKO se tedy neukázalo jako potřebné, současné doporučení pro monitorování dárců aferéz zaměřené na sledování vybraných plasmatických bílkovin je potřebné doplnit o monitorování feritinu 1x ročně.

5.2. Jakost transfuzních přípravků

Transfuzní přípravky získané metodou MKO vykázaly vysoký standardizovaný objem a obsah účinné látky, tj. hemoglobinu v erythrocytárních koncentrátech a trombocytů v trombocytárních koncentrátech. Z tohoto pohledu je jejich jakost v porovnání s přípravky z plné krve v souladu s literaturou srovnatelná, v některých parametrech vyšší (50, 75,76, 120).

Hodnocení markerů poškození buněk je složitější. Při hodnocení markerů aktivace a apoptózy krevních buněk se ukazuje u koncentrátů erythrocytů i trombocytů, že vliv vlastní technologie lze nejlépe posoudit bezprostředně po odběru, neboť není ovlivněn dalšími

faktory. Otázkou zůstává vliv vlastní technologie na krevní buňky během skladování, neboť stav krevních buněk na konci skladování může být ovlivněn řadou faktorů, které působí během skladování.

Erytrocytární koncentráty

Cílem studie bylo zhodnotit parametry jakosti a markery buněčného poškození erytrocytů z aferézy ze dvou typů separátorů s odlišnou technologií aferézy. Hodnotili jsme dva typy erytrocytů získané dvojitou erythrocytaferézou ze separátoru Haemonetics MCS+ (aferéza probíhá v cyklech): EAR MCS (erytrocyty resuspendované) a EAD MCS (deleukotizované). Ze separátoru Trima Accel (kontinuální aferéza) jsme hodnotili EAD Trima (deleukotizované) získané kombinovaným odběrem s 1TU TA300.

Při hodnocení základních parametrů jakosti (objem přípravku, obsah Hb, Ht, příměs leukocytů) EAD MCS, EAD Trima i EAR MCS vykazaly v souladu s jinými autory (4,74,75,120,141) vysoký standard objemu i obsahu Hb v TU (**tab. č. 18**), který nezávisel na vstupních hodnotách hemoglobinu dárce. Všechny deleukotizované EAD MCS i EAD Trima vyhověly limitu na příměs leukocytů v TU ($< 1,0 \times 10^6/\text{TU}$) (38). Avšak u EAR MCS se průměrná kontaminace leukocyty pohybovala na hranici doporučeného limitu ($0,9 \pm 0,6 \times 10^9/\text{TU}$), 6 TU ze 40 požadovaný obsah leukocytů ($< 1,2 \times 10^9/\text{TU}$) nesplnilo. Nebyl tak splněn jeden ze základních požadavků na jakost přípravku. Přípravek jsme proto nezavedli do běžné praxe.

U hodnocených souborů EAD MCS, EAD Trima i EAR MCS i kontrolního souboru ERD došlo ke statisticky významnému vzestupu markerů membránového poškození buňky (**tab. č. 20**). Přítomnost **volného Hb** v supernatantu přípravku je považována za známku poškození membrány erytrocytu (115). Tento parametr je také v praxi při kontrole jakosti erytrocytů povinně sledován (38). Vzestup obsahu volného Hb byl vyšší u obou typů erytrocytů ze separátoru MCS ve srovnání s ERD z plné krve (ERD proti EAD MCS: $p = 0,03$, ERD proti EAR MCS: $p = 0,009$) i s EAD Trima ($p < 0,001$), nejmarkantnější byl u EAR MCS bez leukodeplece ($p < 0,001$) (**graf č. 6a**). Přes uvedené rozdíly byly hodnoty volného Hb u všech typů erytrocytárních koncentrátů hluboko pod povoleným limitem ($< 0,8\%$ erytrocytové masy na konci skladování).

Při porovnání změn parametrů poškození buňky u deleukotizovaných erytrocytů z aferézy vykazaly EAD MCS vůči EAD Trima vyšší vzestup LDH ($p < 0,001$), vzestupy hladin kalia ($p = 0,19$) a annexinu V ($p = 0,33$) byly srovnatelné (**graf č. 6b-d**). U EAD MCS jsme prokázali silnou korelaci hladiny volného Hb vůči LDH ($r = 0,7$) i annexinu V ($r = 0,8$),

u EAD Trima jen slabou vůči LDH ($r = 0,4$), vůči annexinu V nikoli ($r = 0,22$) (graf č. 7), pravděpodobně vzhledem k nižším hodnotám volného Hb na konci skladování u EAD Trima ($p < 0,001$). Zjištění korelace annexinu V s volným Hb je shodné s teoretickými konstatováními z literatury (7,105), pro korelaci s LDH jsme nenalezli literární reference. Jde o náš původní nález, který pravděpodobně souvisí s mírou poškození erytrocytu, avšak bude třeba jej dále ověřit.

Nejvýznamnější vzestup kalia, LDH a annexinu V vůči všem ostatním typům erytrocytů byl zaznamenán u EAR MCS ($p < 0,001$). Vzhledem k tomu, že EAR MCS jsou připraveny stejnou aferetickou technikou jako EAD MCS (odlišnost je jen v následné filtraci erytrocytů) lze předpokládat, že typ technologie přípravy koncentrátu jako takový patrně nemá takový vliv na poškození erytrocytu během skladování, jako kontaminace přípravku leukocyty. Bylo prokázáno, že přítomnost leukocytů v přípravku může indukovat poškození krevních buněk (114). Toto tvrzení lze doložit i dalšími zdroji, které konstatují, že kombinace mechanického traumatu a přítomnosti leukocytů v přípravku zvyšuje hladinu volného Hb a kalia (105), a že leukodeplece snižuje stupeň hemolýzy v přípravku na konci expirace (44). Tento předpoklad může doložit i nejvýznamnější zvýšení hladin annexinu V u EAR MCS v porovnání s ostatními typy erytrocytárních koncentrátů (graf č. 6d). Matthes však, 2000 (71) porovnával EAR ze separátoru MCS s erytrocytárními koncentráty z plné krve bez leukodeplece a významné rozdíly v hodnocení volného Hb, kalia, laktátu a glukózy neuvádí.

U kontrolního souboru ERD z plné krve došlo během skladování k méně významným změnám či srovnatelným změnám než u EAD MCS a EAD Trima (kalium: proti EAD Trima: $p = 0,10$, proti EAD MCS: $p = 0,98$, volný Hb: proti EAD Trima: $p = 0,18$, proti EAD MCS: $p = 0,03$, annexin V: proti EAD Trima: $p = 0,25$, proti EAD MCS: $p = 0,009$). Naše výsledky při hodnocení volného Hb u EAD Trima a ERD jsou v souladu s prací Elfatha a spol., 2000 (28).

Dále jsme u EAD MCS, EAD Trima i EAR MCS zaznamenali pokles pH, hladiny glukózy a vzestup hladiny laktátu. Významný je poznatek, že u žádného typu přípravku pH nekleslo pod hodnotu 6,5, stejně jako zjistili Moog a spol., 2001 (74). Hodnota pH má vliv na enzymy regulující koncentraci 2,3 - DPG. Tím významně ovlivňuje jeho hladinu a následně vazbu kyslíku na Hb (45,65). Hodnota pH může však být ovlivněna mimo proces apoptózy i koncentrací citrátů v antikoagulačním roztoku (50). Konsumpce glukózy a akumulace laktátu byla v jednotlivých typech přípravků rozdílná, avšak změny těchto parametrů korespondují také s obsahem glukózy v antikoagulačním roztoku (71).

Některé literární zdroje konstatují, že jakost erytrocytů z aferézy při hodnocení markerů buněčného poškození je lepší nežli u přípravků z plné krve (50,65,74). Tyto práce vycházejí z teze, že aferetická technika je vůči manuálním odběrům plné krve šetrnější díky postupnému přidávání antikoagulans v nižší koncentraci ve srovnání s jednorázovým „šokovým“ kontaktem s antikoagulans při odběru plné krve. Je pravděpodobné, že aferetická technika takto může minimalizovat tzv. „RBC collection injury“ při odběru (35,50,72). Dle našeho názoru je však při formulaci závěrů třeba zvážit komplexní vliv celé řady faktorů působících na erytrocyt během přípravy a skladování. Významný je rozdíl mezi manuálním zpracováním plné krve, kdy po odsátí plasmy zůstávají erytrocyty v původním vaku, na rozdíl od automatického zpracování systémem „top and bottom“, kdy erytrocyty jsou vytlačovány pod tlakem do sekundárního vaku a mohou být při této manipulaci mechanicky poškozeny. Zásadní vliv na stav erytrocytu má také způsob filtrace produktu, typ použitého filtru, její trvání či teplota, při které je prováděna (3,53,78). Bez významu nejsou pravděpodobně ani velké rozptyly naměřených hodnot v námi hodnocených i literárních souborech transfuzních přípravků dané tím, že hodnocené parametry mohou být ovlivněny přirozeným stářím erytrocytů při odběru (117). Porovnání s literaturou je velmi obtížné, práce hodnotí rozdílné typy erytrocytů, řada prací neuvádí způsob přípravy erytrocytů z plné krve nebo porovnává aferetické erytrocyty s přípravky z poloautomatického zpracování plné krve (65). Stanovení a hodnocení annexinu V pro porovnání našich výsledků v tomto rozsahu nebylo zatím publikováno.

U EAD MCS a ERD nebyly hodnoty annexinu v přípravku v porovnání s klidovou hodnotou u dárce krve zvýšeny, což dokládá, že krevní buňky nebyly technologií aferézy bezprostředně ovlivněny, u EAR MCS toto můžeme též predikovat, protože aferetický protokol je totožný s protokolem pro odběr EAD MCS. Uzavíráme proto, že pro další vývoj stavu erytrocytů v přípravku z MKO má technologie jejich přípravy oběma separátory minimální vliv. Rozhodující vliv mají skladovací podmínky, mimo obsahu leukocytů v přípravku i složení a hodnota pH skladovacího roztoku (45,49) a pravděpodobně i další faktory.

Otázkou je klinický význam popsaných změn erytrocytu. Aktuálně je diskutován zejména vliv pH na obsah 2,3-DPG v koncentráte erytrocytů s následnými změnami v uvolňování O₂ z Hb (45,48) a následný význam v akutní péči, zejména v souvislosti s aplikací erytrocytárních koncentrátů v druhé polovině expirace (82). Vzhledem k tomu, že řada autorů se zabývá vlivem působení apoptotických buněk v organismu (27), tedy i apoptotických buněk dodaných transfuzí, nelze klinický význam těchto změn také vyloučit.

Trombocytární koncentráty

Pro úspěch transfuze koncentrátů trombocytů je důležitá schopnost transfundovaných destiček setrvat v cirkulaci a plnit hemostatickou funkci, která může být ovlivněna metabolickým stavem trombocytu, tzv. „skladovacími lezemi“. U trombocytárních koncentrátů aplikovaných do 48 hodin od přípravy se předpokládá plně zachovaná funkce a dobré přežití trombocytů v cirkulaci. Po 7 dnech skladování se trombocyty stávají neviabilní. V praxi je však většina koncentrátů aplikována mezi těmito dvěma mezemi. Předpokládá se, že trombocyty jsou schopny reverze některých metabolických změn po transfuzi, pravděpodobně proto, že se po transfuzi dostanou do plasmy s optimální hodnotou pH, hladinou glukosy a laktátu (114). Trombocyty aplikované do 5 dnů skladování by tak po aplikaci měly přežívat v cirkulaci cca 5-7 dnů (100). Protože s hemostatickou funkcí trombocytů in vivo nekoreluje žádný jednoduchý test, je hodnocena řadou testů, které zkoumají odlišné části patofyziologie destičky (56,114).

Za kritický pro viabilitu a funkci trombocytu je považován pokles **pH** pod hodnotu 6,2, kdy dle řady autorů dochází k ireversibilnímu poškození trombocytu, reprezentovanému ireversibilní expresí P-selektinu (25,52,56). Při hodnotách pH mezi 6,2 - 6,8 dochází také k expresi P-selektinu, která je však po inkubaci trombocytu v plasmě reversibilní. Hodnoty pH u námi hodnocených jednotek TA300 Trima i TA300 MCS se pohybovaly v rozmezí 6,8 - 7,4 dle Doporučení Rady Evropy (38). Ani v jednom případě jsme nezaznamenali kritický pokles hodnoty pH pod 6,2. U TA300 Trima i TA300 MCS byly hodnoty pH na začátku expirace vyšší než u TB ($p = 0,004$), avšak během skladování jsme v nich zaznamenali pokles pH, který byl srovnatelný u TA300 z obou separátorů (130). Rozdílné hodnoty pH na počátku expirace mohou být ovlivněny rozdílným složením a koncentrací antikoagulačních roztoků. Během skladování došlo u TA300 Trima, TA300 MCS i TB k vzestupu **hodnot LDH a laktátu (graf č. 8, tab. č. 22)**. Hodnoty LDH a laktátu u TA300 Trima i TA300 MCS také v souladu s literaturou negativně korelovaly s hodnotami pH (52).

Hladina **annexinu V** v den 0 byla v naší studii nejnižší u TA300 MCS, vyšší TA300 Trima a nejvyšší u TB. Někteří autoři při porovnání hladin annexinu V u koncentrátů vyrobenými různými technologiemi nacházejí v den 0 u různých typů přípravků buď srovnatelné hladiny (61), anebo hladiny podobné našemu zjištění (59). Hladina annexinu V v přípravcích v den přípravy nezávisela na jeho hladině u dárce krve před odběrem u TA300 Trima a TB, u TA300 MCS jsme střední závislost prokázali ($r_s = 0,45$, $p = 0,038$). Zjistili jsme statisticky významné zvýšení středních hodnot hladin annexinu V u TA300 Trima a TB v porovnání s jeho hodnotami u dárce krve před odběrem (Trima: $p = 0,02$, TB:

$p < 0,001$), u TA300 MCS jsme takové zvýšení nezjistili (**tab. č. 23**). Znamená to, že zvýšení hladiny annexinu V v koncentrátech v den přípravy je ovlivněno pouze její technologií, a že vliv jednotlivých způsobů přípravy na trombocyt je odlišný. U všech typů trombocytárních koncentrátů došlo během skladování k postupnému zvýšení hodnot annexinu V. Neprokázali jsme jednoznačné korelace s hodnotami pH, LDH ani laktátu, a to na začátku ani na konci expirace u žádného typu přípravků.

Stanovení exprese **P-selektinu** na povrchu trombocytu nebo přítomnost jeho solubilní formy je považováno za predikátor viability trombocytu (62). Přestože jeho definitivní role nebyla zatím jasně stanovena, má se za to, že degranulace P selektinu z vnitřních destičkových granulí může znamenat částečnou ztrátu destičkových funkcí (42,52,62). Některé studie však prokázaly jen nízkou korelaci mezi jeho expresí a přežitím destičky in vivo (43,21, 22). Lze však najít korelaci zvýšení exprese P-selektinu, resp. jeho hladiny, se snížením pH a ztrátou swirling fenoménu (25,114).

V naší studii byly hladiny P-selektinu v den přípravy v souladu s jinými autory nejnižší u TA300 MCS (52,59,118), vyšší u TA300 Trima a nejvyšší u TB. Hladina P-selektinu v přípravcích nezávisela, podobně jako hladina annexinu V, na jeho hladině v krvi u dárců u TB a TA300 Trima, u TA300 MCS jsme závislost prokázali ($r_s = 0,57$, $p = 0,018$). Při porovnání hladiny P- selektinu v přípravku v den přípravy vůči jeho hladině u dárce krve před odběrem došlo u TA300 Trima i TB taktéž k statisticky významnému vzestupu hodnot (Trima: $p = 0,02$, TB: $p < 0,001$). U TA300 MCS zde nebyl statisticky významný rozdíl (**tab. č. 23**). Vzestup hladin P-selektinu během skladování jsme pozorovali u všech typů přípravků (**tab. č. 22**). I zde jeho hladiny kopírovaly vzestup hladin annexinu V.

Předpokládá se, že produkce kyselin snižuje viabilitu a funkci trombocytu, a že snížení metabolické aktivity trombocytu je spojeno s expresí P- selektinu, resp. zvýšením jeho plazmatické hladiny. Ta je v korelaci s hodnotou pH, hladinou LDH a laktátu (52). V naší studii hladina P- selektinu u aferetických přípravků na konci expirace korelovala s hodnotami LDH. Korelaci P- selektinu s hladinou laktátu se nám prokázat nepodařilo, pravděpodobně proto, že hodnota pH a odpovídající hladina laktátu v supernatantu se ve většině stanovení pohybovala ve fyziologickém rozmezí či na jeho hranici. To může znamenat, že nedošlo k významné změně viability buněk.

Hladina P-selektinu dle Krailadsiriho a spol., 2001, těsně reflektuje buněčné poškození stanovené měřením annexinu V (59). Tomuto předpokladu odpovídají i naše výsledky, kdy dynamika vývoje hladin P-selektinu kopíruje vývoj hodnot annexinu V u jednotlivých typů přípravků. Zhodnocením závislosti hladiny P-selektinu na hodnotě annexinu V jsme se

pokusili získat informaci o tom, zda stav aktivace trombocytů v přípravku vyjádřený hladinou P-selektinu je ovlivněn stavem apoptózy buňky vyjádřeným hodnotou annexinu V tak, jak uvádí literatura (59). Zjistili jsme, že tato závislost je silná až velmi silná na začátku expirace u TA300 Trima, TA300 MCS a TB (TA300 MCS: $r = 0,85$, TA300 Trima: $r = 0,93$, TB: $r = 0,72$). Na konci expirace nebyla nalezena u žádného typu přípravku.

Jako nejšetnější technologie při přípravě trombocytárního koncentrátu se jevila aferéza na separátoru MCS, při které hodnoty annexinu V a P-selektinu v přípravku v den 0 byly totožné s předodběrovými hodnotami dárce a ovlivnění trombocytu aferézou tak bylo minimální. Přestože známky aktivace trombocytu byly v den přípravy nižší u přípravků ze separátoru MCS ($p = 0,02$), během skladování u přípravků z tohoto přístroje došlo k nejvyššímu vzestupu hladin annexinu V, P-selektinu i LDH. V den expirace trombocytů z aferézy získané z obou separátorů vykazaly vyšší stupeň aktivace než trombocytů z plné krve ($p < 0,001$), mezi produkty z obou přístrojů však statisticky významný rozdíl zaznamenán nebyl ($p = 0,28$). Vzhledem k tomu, že se hodnoty pH pohybovaly v doporučeném rozmezí, se domníváme, že viabilita buněk nebyla ovlivněna.

Vyšší exprese, resp. zvýšení hladiny P-selektinu u přípravků z přístrojů s kontinuálním průběhem aferézy (např. Cobe Spectra, Amicus) ve srovnání s diskontinuálními separátory, uvádí i další autoři (59,60,118). Zvýšení hladiny P-selektinu v den přípravy odráží vliv použité technologie aferézy (22). U kontinuálních přístrojů jsou trombocytů vystaveny delšímu působení fyzikálních sil i déle trvajícimu kontaktu s plastem odběrového setu v porovnání s diskontinuálními přístroji (87,118). V literatuře se můžeme setkat i s pojmem „apparatus - dependable CD62P“ (na přístroji závislé zvýšení P-selektinu) (25). Stejně vysvětlení lze extrapolovat i pro změny v koncentraci annexinu V.

Lze tedy konstatovat, že stav aktivace trombocytu v koncentrátech v den přípravy, způsobený její technologií pravděpodobně neovlivňuje proces apoptózy buněk během skladování. Vývoj poškození trombocytu je ovlivněn zvláště podmínkami v průběhu skladování produktu, jako je koncentrace trombocytů či složení antikoagulačních roztoků (95,96). Otázka vývoje roztoků pro skladování trombocytárních koncentrátů je v současnosti aktuální (41). Vztah mezi hladinami annexinu V a P-selektinu v přípravku a funkcí trombocytu *in vivo* se je zatím nevyjasněný a klinická interpretace uvedených změn zůstává dosud nejasná.

5.3. Výběrová kritéria pro dárce krve

Úsilí v této části problematiky bylo velice aktuální, jak lze doložit i literárními referencemi v této oblasti (9,16,72,75,110). Na základě vzájemného zhodnocení vztahu parametrů dárců krve, aferetických protokolů a jakosti získaných přípravků jsme provedli upřesnění a doplnění výběrových kritérií pro dárce krve.

U dvojitých erythrocytaferéz lze pro vlastní odběr považovat současná doporučená výběrová kritéria za bezpečná (47,113). Výsledný vysoký standard jakosti TP není ovlivněn vstupními hodnotami Hb a Ht dárce (72). Současně je zaručen bezpečný průběh aferézy, jak dokládá splnění požadavku na poodběrovou hodnotu Hb u všech dárců (**tab. č. 5**). V souladu s literaturou se ukázalo jako potřebné výběrová kritéria doplnit o stanovení feritinu (47,91). Jako výběrové kritérium jsme kvantifikovali hodnotu feritinu nad 40 µg/L, při které u dárců docházelo k rychlejší spontánní úpravě zásob železa.

U kombinovaných trombocytaferéz jsme vyhodnotili vliv předodběrové hodnoty trombocytů dárce a TBV na trvání aferézy a na jakost přípravků. U odběrů trombocytů s plasmou trvání aferéz silně až velmi silně korelovalo s předodběrovým počtem trombocytů u obou separátorů (MCS: $r = -0,8 / -0,8 / -0,7$, Trima: $-0,9$ (103), korelace s TBV nebyla zjištěna nebo byla slabá u separátoru MCS ($r = 0,1 / 0,07 / 0,4$), u separátoru Trima nebyla zjištěna ($r = 0,2$). Prokázali jsme statisticky významný nižší předodběrový počet trombocytů u dárce krve kratší trvání aferézy u přístroje Trima v porovnání s odběrem na přístroji MCS. Statisticky významný rozdíl ve výtěžnosti získaných produktů však zjištěn nebyl. Výtěžnost trombocytů středně korelovala s předodběrovým počtem trombocytů dárce u separátoru MCS ($r = 0,58$), u separátoru Trima nikoli ($r = 0,27$). TBV nebyl klíčovým parametrem pro trvání aferézy, z tohoto pohledu je naše zjištění v souladu s ojedinele publikovanými pracemi (16), které TBV jako výběrové kritérium pro MKO neuvádí (94).

U kombinovaných odběrů trombocytů s erytrocyty klíčovým parametrem pro trvání aferézy byl předodběrový počet trombocytů ($r = -0,74$), vliv TBV na čas odběru nebyl zjištěn ($r = 0,26$), stejně jako vliv předodběrové hodnoty Hb a Ht ($r = 0,24 / 0,22$) (97).

Prokázali jsme tedy, že pro všechny kombinace odběrů trombocytů je klíčovým parametrem předodběrový počet trombocytů dárce, který určuje trvání aferézy. Hodnota TBV dárce má na trvání aferézy jen nízký vliv u separátoru MCS, u separátoru Trima je její vliv nevýznamný. TBV je však limitujícím parametrem pro volbu objemu krevních složek při jednom odběru. Potvrdili jsme hodnotu TBV ($> 4 \cdot 300$ ml) pro odběry krevních složek do 650 ml bez objemové náhrady (**tab. č. 24**) (94,97). Z tohoto důvodu musí být TBV zohledněn zejména při výběru dárce pro odběr více než 2 TU přípravků.

Z praktických důvodů je nutné mezi výběrová kritéria zařadit krevní skupinu dárce (9). Vzhledem k známému rozložení krevních skupin v populaci a nutnému 1 měsíčnímu intervalu mezi erythrocytaferézou a odběrem trombocytů se ukazuje (v souladu s literárními zdroji potvrdila i vlastní praxe) za vhodné vybírat pro kombinované odběry trombocytů s erythrocyty dárce krevních skupin 0+ a A+. U dárců skupiny AB a B je vhodné vycházet z počtu dárců těchto krevních skupin v registru, zohlednit aktuální stav požadavků na trombocyty a volit raději kombinované odběry s plasmou, kde doporučený interval mezi odběry je pouze 2 týdny (9).

Vstupní kritéria pro dárce MKO byla zvolena po podrobném studiu literatury a s využitím vlastních zkušeností z minulé klinické praxe a po provedení výzkumné sondy. Výsledky naší práce prokázaly, že základní parametry byl zvoleny správně (tab. č. 8). Bylo však také výzkumem prokázáno, že je vhodné upřesnění některých významných vstupních parametrů, jak jsme uvedli výše (TBV nebo hmotnost, modifikace vstupních hodnot trombocytů u jednotlivých aferetických protokolů, dále vstupní hodnota feritinu). Významné je i upřesnění časových limitů, které jsme provedli pro odběry nebo termínů následného sledování dárců (tab. č. 24) (94,97).

Možnost konverze dárců plné krve k multikomponentní aferéze

Pokusili jsme se zjistit možnost konverze dárců plasmy na odběry multikomponentní. Analyzovali jsme soubor 447 dárců plasmy (370 mužů, 77 žen). Při aplikaci kritérií Doporučení Rady Evropy bylo pro dvojitou erythrocytaferézu vhodných 293 mužů, žádná žena. Podrobněji jsme analyzovali soubor 150 mužů vhodných dle běžných kritérií pro dvojitou erythrocytaferézu. 13 mužů (8,6 %) odběr dvojitých erythrocytů odmítlo. U 137 mužů jsme doplnili mezi výběrová kritéria hodnotu feritinu 40 ug/L. Toto kritérium splnilo 87 mužů, tj. 63 %. Lze tedy předpokládat, že dvojitý odběr erythrocytů je schopno darovat cca 60 % dárců splňujících kritéria Doporučení Rady Evropy, resp. cca 47 % mužů aferetického souboru. Trombocyty s plasmou nebo s erythrocyty bylo dle našich kritérií (tab. č. 24) schopno darovat 70 % dárců.

Neméně důležitým faktorem pro akceptaci MKO dárce krve je trvání aferézy (140). Z tohoto pohledu je separátor Trima, obecně považovaný za rychlejší přístroj, pro dárce akceptovatelnější, jak popsali i jiní autoři (20,88,89).

5.4. Indikační kritéria pro transfuzní přípravky

Přípravky z MKO mají své výhody, pro které by měly být přednostně směřovány k polytransfundovaným příjemcům. Vysoký standard obsahu erytrocytů či trombocytů v léčebné dávce má vysoký terapeutický účinek (9,90,113), lze tak prodloužit interval mezi transfuzemi erytrocytárních koncentrátů. Snížení expozice příjemce (nižší počet dárců) snižuje riziko imunizace a imunosuprese příjemce. Výskyt septických potransfuzních reakcí je snížen zejména u trombocytárních koncentrátů (79). Dále jsou přípravky indikovány u pacientů s přítomností aloprotilátek proti všem typům krevních buněk. Přípravu erytrocytů z aferézy bez leukodeplece ze separátoru Haemonetics MCS+ v běžné praxi nepovažujeme za vhodnou vzhledem k vysoké příměsi leukocytů. Další indikace přípravků z MKO jsou totožné s přípravky z plné krve.

5.5. Ekonomické hledisko

Při kalkulaci cen transfuzních přípravků na TO KN Liberec se ukázala metodika zvolených protokolů jako rentabilní při hodnocení vynaložených nákladů. Odběr druhé jednotky krevní složky jednoznačně metodiku oproti jednoduché aferéze zefektivňuje, a to v pořadí trombocyty, erytrocyty, plasma. Efekt přináší nejen zisk dalšího přípravku, ale úsporu přináší i redukce nákladů na povinné laboratorní kontroly, zejména na vyšetření virologických markerů (113) či předtransfuzní vyšetření (129). Při zavádění metodiky je primárně nutno vycházet z ceny setů, toto posouzení může některé protokoly předem vyřadit (např. náklady na dvojitou erytrocytaferézu na separátoru Trima). Ekonomické hledisko mohou také ovlivnit požadavky zdravotnického zařízení na transfuzní přípravky, například při přebytku plasmy bude dvojitá erytrocytaferéza jednoznačným přínosem.

5.6. Výhled do budoucna

Projekt přinesl řadu otázek, kterými je vhodné se nadále zabývat. Jde zejména o prozkoumání stavu apoptózy krevních buněk u dárců plné krve a plasmy v periferní krvi, práce v této oblasti zatím publikovány nebyly. Další nezodpovězenou otázkou zůstává klinický význam buněčného poškození a aktivace krevních buněk v přípravcích. V literatuře se objevují práce zabývající se touto tematikou, aktuálně zejména v oblasti apoptózy erytrocytů (18,63). Stejně tak není jasný význam změn krevních buněk zjištěných in vitro v přípravcích, na potransfuzní recovery. Také řada otázek, týkající se klinického vlivu transfuze apoptotických krevních buněk na příjemce zůstává nezodpovězena (27). V našem konkrétním výhledu je proto studium exprese annexinu V na krevních buňkách dárců krve,

studium dalších markerů membránového poškození erytrocytu a studium vlivu dlouhodobých aferéz na stav trombocytů v koncentrátech.

6. Splnění cílů práce

Anotované cíle projektu byly zcela splněny, studie přinesla navíc některé nové poznatky významné pro objasnění dosud nedořešených patofyziologických otázek s možným významem pro klinickou praxi, uvedené níže

6.1. Zhodnocení přímého vlivu multikomponentních aferéz na zdravotní stav dárce krve

Prokázali jsme bezprostřední bezpečnost procedury. Byly zaznamenány jen ojedinělé nezávažné komplikace při odběrech. Hodnoty hemoglobinu a trombocytů po aferézách u všech kombinací odběrů nepoklesly pod doporučené meze. Stanovení hladin annexinu V a sP-selektinu u odběrových protokolů SDR, LDP-LP a LRS prokázalo, že krevní buňky navracené dárce nejsou aferézami poškozeny ani zvýšeně aktivovány. U dárců aferéz jsme zjistili vyšší klidové hodnoty annexinu V v porovnání s kontrolním souborem dárců plné krve. Obě tato zjištění jsou unikátní, dosud nepublikovaná.

6.2. Zhodnocení dlouhodobého vlivu multikomponentních aferéz na zdravotní stav dárce krve

Po dvojité erythrocytaferéze dochází k spontánní úpravě poklesu Hb a Ht do 90 dnů. K spontánnímu doplnění feritinu na předodběrové hodnoty dochází za 180 dnů u dárců se vstupní hodnotou feritinu nad 40 ug/L. Zvýšené hladiny sTfR a qTfRi však signalizují možný vznik sideropenie po opakovaných odběrech, toto však bylo zjištěno i u kontrolního souboru dárců plné krve. Proto jsme zařadili hladinu feritinu mezi výběrová kritéria. Monitorování v ročních intervalech považujeme za potřebné nejen u dárců 2 TU RBC, ale i u frekventních dárců plné krve. Suplementace preparáty Fe by měla být indikována individuálně. U dárců trombocytů byl vývoj všech markerů metabolismu Fe lineární. K poklesu hodnot CB, albuminu a imunoglobulinu G, A a M u sledovaného souboru nedošlo.

Současné doporučení pro monitorování dárců aferéz zaměřené na sledování vybraných plasmatických bílkovin je potřebné doplnit o monitorování feritinu 1x ročně.

6.3. Zhodnocení parametrů jakosti, markerů poškození a aktivace buněk v přípravcích

Prokázali jsme vysoký standard obsahu účinné látky v koncentrátech erytrocytů i trombocytů získaných všemi kombinacemi odběrů. Jakost přípravků je nezávislá na vstupních parametrech dárce krve, přípravky splňují stanovený limit na obsah leukocytů.

Zhodnocení vývoje markerů membránového poškození erytrocytu prokázalo významný, ale srovnatelný vzestup hladin volného Hb, LDH a annexinu V u deleukotizovaných přípravků z obou separátorů i u kontrolního souboru erytrocytů z plné krve. Nejvýznamnější vzestup byl zjištěn u erytrocytů z aferézy bez deleukotizace. Prokázali jsme, že stav erytrocytů v koncentrátech není ovlivněn technologií aferézy, ale skladovacími podmínkami, zejména příměsí leukocytů v přípravcích. Hodnocení vývoje markerů poškození a apoptózy u trombocytárních koncentrátů prokázalo vliv technologie při aferéze na separátoru Trima a přípravě trombocytů z plné krve na stav trombocytu, nikoli u separátoru MCS. Vliv technologie přípravy však neovlivnil proces apoptózy trombocytů během skladování, rozhodujícím faktorem jsou i zde skladovací podmínky. Mezi přípravky z obou separátorů jsme neprokázali významné rozdíly.

6.4. Upřesnění vstupních kritérií pro dárce multikomponentních odběrů

Prokázali jsme, že je nutno používat diferencovaná výběrová kritéria pro jednotlivé přístroje i kombinace odběrů a doplnili jsme je. Současná výběrová kritéria pro dárce 2 TU RBC jsme doplnili o hodnotu feritinu nad 40 ug/L. Pro kombinované odběry trombocytů je klíčovým kritériem předodběrová hodnota trombocytů dárce, pro trombocytaferézy na separátoru Trima Accel je možno vybírat dárce s nižší hodnotou trombocytů než u separátoru MCS. Hodnota TBV je klíčová pro volbu odebíraného množství krevních složek bez objemové náhrady, TBV nad 4 300 ml se ukazuje jako bezpečný.

Z vlastní praxe jsme posoudili možnost konverze dárců plasmy na multikomponentní aferézy. Pro vlastní konverzi jsou limitujícím faktorem biologické parametry dárce a trvání výkonu.

6.5. Indikační kritéria přípravků získaných metodou MKO v hemoterapii

Přípravky z MKO by měly být přednostně směřovány k polytransfundovaným příjemcům. Vysoký standard obsahu erytrocytů či trombocytů v léčebné dávce má vysoký terapeutický účinek. Snížení expozice příjemce nižšímu počtu dárců snižuje riziko imunizace a imunosuprese příjemce. Tak je možné snížit i výskyt infekčních potransfuzních reakcí u

imunokompromitovaných pacientů, zvláště po aplikaci trombocytárních koncentrátů. Dále jsou přípravky indikovány u pacientů s přítomností aloprotilátek proti všem typům krevních buněk. Další indikace jsou totožné s přípravky z plné krve.

6.6. Ekonomické zhodnocení metody

Prokázali jsme ekonomickou návratnost při správné volbě kombinací odběrů, použité technologie a spotřebního materiálu.

7. Závěr

Metoda MKO je dárci dobře akceptována. Zhodnocení klinických projevů a parametrů aktivace buněk při multikomponentních aferézách neprokázalo negativní vliv metody na zdravotní stav dárce krve. Krevní buňky navracené dárci nejsou zvýšeně poškozeny ani aktivovány. Toto zjištění je klíčové, v literatuře jsme nenašli podobnou referenci. Zásadní je i zjištění vyšších klidových hodnot annexinu V u souboru aferetických dárců ve srovnání s dárci plné krve, které rovněž není zatím v literatuře publikováno a v budoucnu jej chceme ověřit. Neprokázali jsme klinicky významný negativní vliv opakovaných odběrů na hladinu plasmatického železa a feritinu, celkové bílkoviny, albuminu a imunoglobulinů. Dvojitá erythrocytaferéza a frekventní dárcovství plné krve představují pro dárce srovnatelnou zátěž. U některých dárců krve může docházet k deficitu zásob železa, substituce přípravky železa by měla být individuální, s ohledem na další možné příčiny jeho deficitu.

Pro jednotlivé přístroje i kombinace odběrů je třeba používat diferencovaná vstupní kritéria pro dárce krve, tato kritéria byla upřesněna. Klíčovým parametrem výběru dárce pro kombinované trombocytaferézy je předodběrový počet trombocytů dárce krve, hodnota TBV je limitujícím faktorem zvláště pro volbu objemu odebíraných přípravků. U dvojitých odběrů erytrocytů je třeba doplnit výběrová kritéria Rady Evropy o stanovení feritinu ($> 40 \text{ ug/L}$). Současná doporučení pro dlouhodobé monitorování zdravotního stavu dárců plasmy, které je zaměřeno na sledování vybraných plasmatických bílkovin, je třeba u dárců dvojitých erythrocytaferéz doplnit o monitorování feritinu.

Jakost přípravků je vysoce standardní, nezávislá na vstupních parametrech dárce, bez zřetelných známek poškození buněk aferézami. Krevní buňky nejsou aferézami poškozeny ani zvýšeně aktivovány. V jakosti přípravků z obou separátorů nebyly zjištěny významné rozdíly. Použité technologie neovlivňují stav buněk v přípravcích na konci skladování, klíčový význam pro jakost přípravků a vývoj změn v krevních buňkách mají podmínky skladování

produktů, např. pH skladovacích roztoků či koncentrace trombocytů v koncentrátech. Bližší poznání apoptózy a aktivace krevních buněk u dárců i v transfuzních přípravcích zůstává otázkou do budoucna. Přípravky od jednoho dárce jsou určeny zejména pro polytransfundované pacienty. Metoda se ukazuje ekonomicky rentabilní při správném výběru kombinací odběrů a může být použita i pro zajištění zejména deleukotizovaných přípravků při nedostatku dárců plné krve.

Při správné volbě kombinací odběrů a výběru dárců se jedná o bezpečnou alternativu dárcovství plné krve, zajišťující vysokou jakost přípravků, s přínosem pro příjemce i transfuzní službu.

8. Souhrn

Úvod: Multikomponentní odběry představují současný odběr různých krevních složek v různých kombinacích od jednoho dárce v jednom sezení. Aplikace více přípravků od jednoho dárce snižuje u pacienta možnost imunizace hemoterapií a riziko přenosu infekcí. Pro transfuzní pracoviště je přínosem flexibilní využití dárcovského fondu dle aktuální potřeby. Všechny aspekty metody nejsou dosud objasněny.

Cílem studie bylo zhodnotit přímý a dlouhodobý vliv MKO na zdravotní stav dárce krve, upřesnit vstupní kritéria pro dárce MKO a upřesnit schema dlouhodobého monitorování dárce. U produktů zhodnotit základní parametry jakosti a markery poškození a aktivace buněk. Dále upřesnit indikaci přípravků získaných MKO v hemoterapii a posoudit ekonomický aspekt metody.

Metodika: Prospektivní studie sledovala určené parametry u dárců MKO a získaných transfuzních přípravků. U souboru 52 dárců bylo provedeno 225 odběrů na dvou separátorech (separátoru Haemonetics MCS+: 98 dvojitých erythrocytaferéz, 52 trombocytaferéz s plasmou a 5 dvojitých trombocytaferéz; separátoru Trima Accel (metoda nově zavedena): 36 trombocytaferéz s plasmou a 28 odběrů trombocytů s erytrocyty). U odběrů byly hodnoceny klinické účinky aferéz na dárce krve a aferetické parametry. Vždy u 20 dárců byly hodnoceny změny hodnot Hb, Ht, trombocytů, hsCRP, annexinu V a sP selektinu po aferéze. Markery metabolismu železa (Fe, transferin, saturace transferinu, feritin, sTfR a qTfRi) byly sledovány v den 30, 90 a 180 u 30 dárců po dvojitě erythrocytaferéze, u 22 dárců trombocytů po 180 dnech. Hladiny celkové bílkoviny, albuminu a imunoglobulinu A, G a M byly sledovány po 180 dnech. U všech získaných transfuzních přípravků byl hodnocen obsah Hb či trombocytů a kontaminace leukocyty v den přípravy, markery buněčného poškození v den přípravy a

expirace. U tří typů erytrocytárních koncentrátů (vždy po 20 TU: deleukotizované EAD MCS a EAD Trima, nedeleukotizované EAR MCS) byly sledovány hodnoty kalia, laktátu, LDH, pH a annexinu V. U dvou typů trombocytárních koncentrátů (TA300 Trima a TA300 MCS, s obsahem $> 300 \times 10^9$ PLT/TU – vždy 20 TU) byla hodnocena hodnota pH, LDH, laktátu, annexinu V a sP-selektinu. Výsledky byly porovnány s parametry alikvotního počtu dárců a přípravků z plné krve. Statistické hodnocení bylo provedeno na hladině významnosti $p < 0,05$.

Výsledky: Zhodnocení klinických projevů a parametrů aktivace buněk neprokázalo negativní vliv metody na zdravotní stav dárce krve. Po aferézách nebyly u dárců zjištěny vyšší hladiny annexinu V a sP-selektinu. Nové je zjištění vyšších klidových hodnot annexinu V u souboru aferetických dárců ve srovnání s nálezem u dárců plné krve, které není zatím v literatuře publikováno. Neprokázali jsme klinicky významný negativní vliv opakovaných odběrů na hladinu plasmatického železa, feritinu, celkové bílkoviny, albuminu a imunoglobulinů. U některých dárců může docházet k deficitu zásob železa, substituce přípravky železa by však měla být individuální, s ohledem na další možné příčiny sideropenie. Pro jednotlivé přístroje i protokoly je třeba používat diferencovaná vstupní kritéria, která byla upřesněna. U dvojitých odběrů erytrocytů je třeba doplnit výběrová kritéria o stanovení feritinu, jehož hladina by měla být nad 40 ug/L. Současné doporučení pro dlouhodobé sledování dárců plasmy, je třeba u dárců dvojitých erytrocytaferéz doplnit o monitorování feritinu. Jakost přípravků je vysoce standardní, nezávislá na vstupních parametrech dárce. Krevní buňky v přípravcích nejsou aferézami poškozeny ani zvýšeně aktivovány. V jakosti přípravků z obou separátorů nebyly zjištěny významné rozdíly. Použité technologie neovlivňují stav buněk v přípravcích na konci skladování, klíčový význam pro jakost přípravků a vývoj změn v krevních buňkách mají podmínky skladování produktů. Bližší poznání apoptózy a aktivace krevních buněk u dárců i v transfuzních přípravcích zůstává otázkou do budoucna. Přípravky od jednoho dárce jsou určeny zejména pro polytransfundované pacienty. Metoda se ukazuje ekonomicky rentabilní při správném výběru kombinací odběrů a může být proto použita i pro zajištění zejména deleukotizovaných přípravků při nedostatku dárců plné krve.

Závěr: Metoda nemá bezprostřední ani dlouhodobý vliv na zdravotní stav dárce. Krevní buňky navrácené dárci nejsou zvýšeně aktivovány. Pro jednotlivé přístroje i kombinace odběrů je třeba vybírat dárce dle diferencovaných výběrových kritérií. Jakost přípravků je vysoce standardní, nezávislá na vstupních parametrech dárce. Krevní buňky v přípravcích nejsou aferézami poškozeny ani zvýšeně aktivovány. Použité technologie neovlivňují stav

apoptózy a aktivace buněk v přípravcích na konci skladování. Při správné volbě kombinací odběrů a výběru dárců se jedná o bezpečnou alternativu dárcovství plné krve, zajišťující vysokou jakost přípravků. Metoda je ekonomicky rentabilní při správném výběru kombinací odběrů. Bližší poznání apoptózy a aktivace krevních buněk u dárců i v transfuzních přípravcích zůstává otázkou do budoucna.

9. Literatura

1. Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. GRADA publishing, vyd. Praha 2003; 787 s., ISBN 80-247-0677-6.
2. Annis A.M., Sparrow R.L. Expression of CD47 (integrin associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apher Sci* 2002; 27: 233-233.
3. Bandarenko N., Rose M. et al. In vivo characteristics of double units of RBC collected by apheresis with a single in-line WBC reduction filter. *Transfusion* 2001; 41: 1373-1377.
4. Bandarenko N. In vitro quality of red blood cells (RBCs) collected by multicomponent apheresis compared to manually collected RBCs during 49 days of storage. *Transfusion* 2007; 47: 687 - 696.
5. Bedchtloff S., Tran-Mi B., Haubelt H. et al. A prospective trial on the safety of long term intensive plasmapheresis in donors. *Vox Sang* 2005; 88: 189-195.
6. Bertino A.M., Qi X.Q., Xia Y. et al. Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37 °C. *Transfusion* 2003; 43: 857-866.
7. Bessos H., Seghatchian J. Red cell storage lesions: The potential impact of storage – induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells. *Transf Apher Sci* 2005; 32: 227-232.
8. Beyan C., Cetin T., Kaptan K., Nevruz O. Effect of plateletpheresis on complete blood count values using three different cell separator system in healthy donors. *Transf Apher Sci* 2003; 29: 45-47.
9. Blanco L. Tailored collection of multicomponent by apheresis. *Transfus Apher Sci* 2002; 27: 123-127.

10. Bláha M., Jebavý L., Široký O., Malý J., Pecka M. Vedlejší účinky hemaferéz. *Vnitř Lék* 1989; 51: 25: 972 – 981.
11. Bláha M. Multikomponentní automatizované odběry – nový trend v dárcovství krve – editorial. *Vnitř Lék* 2005; 51: 320-326.7-866.
12. Bolan Ch.D., Greer S.E., Stacey A. et al. Comprehensive analysis of citrat effects during platepheresis in normal donors. *Transfusion* 2001; 41: 1165-1171.
13. Bolan D.B., Wesley R.A., Yau Y.Y. et al. Randomized placebo – controlled study of oral calcium carbonate administration in plateletpheresis: I. Associations with donor symptoms. *Transfusion* 2003; 43: 1403-1413.
14. Bolan D. B., Cecco S.A., Yau Y.Y. at al. Randomized placebo – controlled study of oral calcium carbonate administration in plateletpheresis: II. Metabolic effects. *Transfusion* 2003; 43: 1414 -1422.
15. Bolan Ch. D., Cecco S.A., Wesley R.A. Controlled study of citrate effects and response to IV calcium administration during allogeneic peripheral blood progenitor cell donation. *Transfusion* 2002; 42: 935-946.
16. Bonomo P., Garozzo G., Bennardello F. The selection of donors in multicomponent collection management. *Transfus Apher Sci* 2004; 30: 55-59.
17. Boulton F. Managing donors and iron deficiency. *Vox Sang* 2004; 87 (suppl.2): 22-24.
18. Bratosin D., Estaquier J., Petit F. et al. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 2001; 8: 1143-1156.
19. Bueno J.L. A comparison of PLT collections from two apheresis devices. *Transfusion* 2004; 44: 119-124.
20. Bueno J.L., García F., Castro E. A randomized crossover trial comparing three plateletpheresis machines. *Transfusion* 2005; 45: 1373 – 1381.

21. Cardigan R., Turner C., Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang* 2005; 88: 153 - 163
22. Curvers J., van Pampus E.C.M., Feijge M.A.H. et al. Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. *Transfusion* 2004; 44: 49-58.
23. Čermák J., Brabec V. Klinický význam vyšetření hladiny cirkulujících transferinových receptorů v séru. *Vnitřní lékařství* 1999; 45: 468-472.
24. Čermák J., Brabec J. Transferin receptor – ferritin index: a useful parameter in differential diagnosis of iron deficiency and hyperplastic erythropoiesis. *European Journal of Haematology* 1998; 61: 210-212.
25. Dijkstra-Tiekstra M.J., Pietersz R.N.I., Huijgens P.C. Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and in vitro and in vivo parameters. *Vox Sang* 2004; 87: 257-263.
26. Dimonte D., Pepe M., Silletti I. et al. Serum transferin receptor is a marker of iron deficiency in patients included in programs for preoperative autologous blood donation. *Transfus Apher Sci* 2002; 27: 211-216.
27. Dzik W.H. Apoptosis, TGF beta and transfusion – related immunosuppression: Biologic versus clinical effects. *Transfus Apher Sci* 2003; 29: 127-129.
28. Elfath M.D., Whitley P., Jacobson M.S. et al. Evaluation of an automated system for the collection of packed RBCs, platelets, and plasma. *Transfusion* 2000; 40: 1214-1222.
29. Flesland O., Eskelund A.K., Flesland A.B. et al. Transferrin receptor in serum. A new tool in the diagnosis and prevention of iron deficiency in blood donors. *Transfus Apher Sci* 2004; 31: 11-16.
30. Furuta M., Shimizu T., Mizuno S. et al. Clinical evaluation of repeat apheresis donors in Japan. *Vox Sang* 1999; 77: 17-23.
31. Gable R.G. The use of platelet concentrates versus platepheresis – the donor perspective. *Transfusion* 2001; 41: 727-729.

32. Garcia Gala J.M., Vincente P.R. et al. Utility of red blood cell apheresis in autologous blood donation. *Transfus Sci* 2000; 23: 69-73.
33. Gašová Z. Od odběrů plné krve k multikomponentnímu dárcoství – editorial. *Vnitř Lék* 2005; 51: 274- 275.
34. Gemmell Ch. Activation of platelets by in vitro whole blood contact with materials: increases in microparticle, procoagulant activity and soluble P – selectin blood levels. *J. Biomater Sci Polym Ed* 2001; 12: 933-943.
35. Gibson J.G., Murphy W.P., Scheitlin W.A. et al. The influence of intracellular factors involved in the collection of blood in ACD on maintenance of red cell viability during refrigerated storage. *Am J Clin Pathol* 1956; 26: 858 - 873.
36. Goodnough L.T., Shander A., Brecher M.E. Transfusion medicine: looking to the future. *The Lancet* 2003; 361: 161-188.
37. Guidelines for the clinical use of blood cell separators. *Clin Lab Haem* 1998; 20: 265-278.
38. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 9th ed. Strasburg, Council of Europe Publishing, 2003.
39. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 12th ed. Strasburg, Council of Europe Publishing, 2006.
40. Gullikson H. Platelet storage media. *Transfus Apher Sci* 2001; 24: 241–244.
41. Gullikson H. New additive solutions for the storage of platelets. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 89- 92.
42. Gutensohn K., Alisch A., Geidel K. et. al. Annexin V and platelet antigen expression is not altered during storage of platelet concentrates obtained with AMICUS cell separator. *Transfus Sci* 1999; 20: 113-120.
43. Gutensohn K., Geidel K., Kroeger N. et al. Platelet function testing in apheresis products: flow cytometric, resonance thrombographic (RTG) and rotational thrombelastographic (roTEG) analyses. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 147-155.

44. Gyongyosy-Issa M. I. C., Weiss S.L., Sowenimo-Coker S.O. Prestorage leukoreduction and low-temperature filtration reduce hemolysis of stored red cell concentrates. *Transfusion* 2005; 45: 90-96.
45. Hess J.R. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sanq* 2006; 91: 13-19.
46. Höcker P. Red cell apheresis in autologous preoperative blood donation. *Transfus Apher Sci* 2001; 24: 75-78.
47. Hogler W., Mayer W., Messmer Ch. et al. Prolonged iron depletion after allogeneic 2-unit apheresis. *Transfusion* 2001; 41: 602-605.
48. Högman C.F., Meryman H.T. Red blood cells intended for transfusion: quality criteria revisited. *Transfusion* 2006;46:137-142.
49. Högman C.F., Löf H., Meryman H.T. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate. *Transfusion* 2006; 46:1534-1552.
50. Holme S., Elfath M.D., Whitley P. Evaluation of in vivo and in vitro quality of apheresis-collected RBC stored for 42 days. *Vox Sanq* 1998; 75: 212 – 217.
51. Holme S., Andres M., Goermar N. et al. Improved removal of white cells with minimal platelet loss by filtration of apheresis platelets during collection. *Transfusion* 1999; 39: 74-82.
52. Holme S., Sweeney S. et al. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss in vivo viability. *Transfusion* 1997; 37: 12-17.
53. Hornsey V., Drummond O., Mac Gregor I. et al. Leucofiltration, retention/generation of soluble prion and Annexin V and storage of blood components. *Transfus Sci* 2000; 22: 75-76.
54. Hrubíško M., Dobrý E. *Základy hemoterapie*. Osveta, 1974, s. 5 -16.
55. Chrobák L. Mikrocytární a hypochromní anemie. *Vnitř lék* 2001; 47: 166-174.

56. Jebavý L., Malý J., Štěpánová V., Blažek M., Procházková R., Cermanová M., Měřička P., Bláha M. Danger of infection transmission during hematological progenitor cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2005; 33: 239.
57. Jebavý L., Kmoníček M., Žák P., Kačerovský A., Čerovský J., Brndiar M., Zachoval R., Vacková M., Špliňo M., Malý J , Bláha M., Měrka V., Pecka M. Vyhodnocení změny spektra bakterií u infekčních komplikací imunosuprimovaných osob. *Med Milit Slov* 2000; 4: 80.
58. Krailadsiri P., Seghatchian P., Amiral J. et al. Annexin V, a new marker of platelet storage lesion: correlation with dMPV. *Transfus Sci* 1997; 18: 223-226.
59. Krailadsiri P., Seghatchian J. Effect of processing and storage on platelet activation, cellular injury and microvesiculation. *Transfus Apher Sci* 2001, 24: 237-238.
60. Krailadsiri P., Seghatchian J. Are all platelet concentrates equivalent? *Vox Sang* 2000; 78:171-175.
61. Krailadsiri P., Seghatchian J., Williamson L.M. Platelet storage lesion of WBC-reduced, pooled buffy coat – derived platelet concentrates prepared in three in-process filter/storage bag combinations. *Transfusion* 2001; 41: 243-250.
62. Lai M., Rumi C., D Onofrio G., Puggioni P.L. Phosphatidylserine exposure in platelet concentrates during the storage period: differences between the platelets collected with different cell separators. *Transfus Apher Sci* 2002; 27: 239-245.
63. Lang F., Foller M., Lang K.S. et al. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membrane Biol* 2005; 205: 147-157.
64. Laspina S.J., Browne M.A., Mc Sweeney E.N. et al. QTc Prolongation in apheresis platelet donors. *Transfusion* 2002; 42: 899-903.
65. Leitner G.C., Stohlawetz P.J., Stiegler G. et al. Quality of packed red blood cells and platelet concentrates by multicomponent collection using the MCS Plus device. *Journal of Clinical Apheresis* 2003; 18: 21-25.

66. Lin S.J., Tzeng C.H., Hao H.Y. et al. Cytokine release in febrile non-haemolytic red cell transfusion reactions. *Vox Sang* 2002; 82: 156-160.
67. Llohn A., Vetlesen A., Fagerhol M.K. et al. The effect of pre-storage cooling on 2,3-DPG levels in red cells stored in SAG-M. *Transfus Apher Sci* 2005; 33: 113-118
68. Loudová M., Krejsek J., Kopecký O. et al. Cytoimunofluorometrie a její využití v detekci aktivované destičky. *Vnitř lék* 2001; 47: 175-180.
69. Makar Y.F., Butler M.O., Cockersole G.M. et al. National audit of citrate toxicity in plateletpheresis donors. *Transfusion Medicine* 2002; 12: 187- 191.
70. Malý J., Blažek M., Bláha M., Bláha V., Pecka M., Cermanová M. LDL-aféze a endoteliální funkce. (LDL apheresis and endothelial function.) in: *Atherosclerosis 2005*, eds.: IV. interní klinika LFUK, Praha 2005. s. VI.
71. Matthes G.A. Red cell apheresis: new concepts of blood component processing. *Ther Apher* 1997; 1: 22-28.
72. Matthes G. A. Options and cost effectiveness of multicomponent blood collection. *Transfus Apher Sci* 2002; 27: 115-121.
73. Mauricio R., de Sousa G., Seghatchian J. What's happening? An overview of potential adverse reactions associated with apheresis technology. *Transfus Apher Sci* 2006; 33: 351 -356.
74. Moog R., Franck V., Pierce J.A. et al. Evaluation of a concurrent multicomponent collection system for the collection and storage of WBC – reduced RBC apheresis concentrates. *Transfusion* 2001; 41: 1159-1164.
75. Moog R., Bartsch R., Muller N. Concurrent collection of in-line filtered platelets and red blood cells by apheresis. *Ann Haematol* 2002; 81: 322-325.
76. Moog R. A new technology in blood collection: Multicomponent apheresis. In: Peterson B.R. *New developments in blood transfusion research*. 2006 Nova Science Publishers, Inc.s.141 - 156. ISBN 1 - 59454 - 962 - 1.

77. Moore S. B., Winters J.L. Multiple blood donations and iron deficiency in patients with restless legs syndrome. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 654.
78. Müller – Steinhardt M., Janetzko K. et al. Impact of various red cell concentrate preparation methods on the efficiency of prestorage white cell filtration and red cells during storage for 42 days. *Transfusion* 1997; 37: 1137-1142.
79. Ness P., Braine H., King K. et al. Single donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. *Transfusion* 2001; 41: 857-861.
80. Newman B.H., Pichette S., Pichette D. et al.: Adverse effects in blood donors after whole-blood donation: a study of 1000 blood donors interviewed 3 weeks After whole blood donation. *Transfusion* 2003; 43: 598-603.
81. Novosad J., Kodydková K., Krejsek J. Apoptóza, její mechanismy a medicínský význam. I. Definice buněčné apoptózy a její průběh na buněčné úrovni. *Vnitř lék* 2001; 47: 381-386.
82. Offner P. J. Age of blood: does it make a difference? *Critical Care* 2004; 8 (suppl 2): S24-S26.
83. Quendro I., Moog R., Muller N. A questionainre: will plateletpheresis donors accept multicomponent donation? *Transfus Apher Sci* 2002; 27: 95-99.
84. Pagliariccio A., Guermandi G. Marinozzi M. et al. Can better information increase hemapheresis ? *Transfus Apher Sci* 2003; 28: 149-153.
85. Pácal L., Kaňková K. Novější poznatky o metabolismu železa a jeho poruchách. *Čas Lék čes* 2004; 143: 9-14.
86. Perrotta P. L., Perrotta Ch. L., Snyder E. L. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion* 2003; 43: 526-535.
87. Perseghin P., Mascaretti L., Speranza T. et al. Platelet activation during plasma –reduced ulticomponent PLT collection: a comparison between COBE Trima and Spectra LRS turbo cell separators. *Transfusion* 2004; 44: 125 –130.

88. Picker S.M., Radojska S.M., Gathof B.S. Evaluation of concurrent collection of in-line filtered platelets and packed red blood cells by multicomponent apheresis with three last-generation apparatuses. *Vox Sang* 2006; 91: 47-55.
89. Picker S.M., Radojska S.M., Gathof B.S. Prospective comparison of high-dose plateletpheresis with the latest apheresis systems on the same donors. *Transfusion* 2006; 46: 1601-1608.
90. Popovsky M. A. Multicomponent apheresis blood collection in the United States: Current status and future directions. *Transfus Apher Sci* 2005; 32: 299-304.
91. Popovsky M.A. Safety of RBC apheresis and whole blood donation in allogeneic and autologous blood donors. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 205-211.
92. Procházková R., Řehořová L., Hubáčková L. Blood donors' entrance criteria for multicomponent apheresis – retrospective study. Abstract Book, 14th Congress of the ESFH, Prague 2003, s. 38, ISBN 80-903238-8-X.
93. Procházková R., Kurková R., Řehořová R., Hubáčková L. Suitability apheresis donors for multicomponent apheresis. *Vox Sang* 2004; 87 (suppl 3): 21.
94. Procházková R., Hubáčková L., Řehořová L. Výběr dárců pro multikomponentní odběry krve. *Transf Hemat dnes* 2005; 11: 54 - 61.
95. Procházková R., Andrýs C., Hubáčková L., Řehořová L., Krejsek J. Zhodnocení markerů apoptózy a aktivace trombocytů u aferetických odběrů trombocytů s plasmou. *Transf Hemat dnes* 2006; 12: 159-165.
96. Procházková R., Andrýs C., Hubáčková L. Krejsek J. Markers of apoptosis and platelet activation in platelet concentrates collected by apheresis. *Transfus Apher Sci* 2007; 37: 115 – 123.
97. Procházková R., Hubáčková L., Řehořová L. Suitability of donors for erythro-thrombocytapheresis on Trima Accel. *Vox Sang* 2006; 91 (suppl 3): 210.

98. Radtke H., Mayer B., Rocker et al. Iron supplementation and 2-unit red blood cell apheresis: a randomized, double blind, placebo – controlled study. *Transfusion* 2004; 44: 1463-1467.
99. Regan F., Teesdale P. et al. Comparison of in vivo red cell survival of donations collected by Haemonetics MCS versus conventional collection. *Transfusion Medicine* 1997;7: 25-28.
100. Rinder H.M., Smitd B.R. In vitro evaluation of stored platelets: Is there hope for predicting posttransfusion platelet survival and function? *Transfusion* 2003; 43: 2-6.
101. Runkel S., Haubelt H., Hitler P. et al. The quality of plasma collected by automated apheresis and recovered plasma from leukodepleted whole blood. *Transfusion* 2005; 45: 427-432.
102. Runkel S., Bach J., Anders C. et al. The impact of two whole blood inline filters on markers of coagulation, complement and cell activation. *Vox Sanq* 2005; 88: 17-21.
103. Seghatchian M.J., Wadhwa M., Thorpe R. Cytokines in platelet concentrates: A comparison of apheresis platelet (Haemonetics) and filtered and unfiltered pooled buffy – coat derived platelet concentrates. *Transfus Sci* 1997; 18: 103-107.
104. Seghatchian J., Krailadsiri P. The platelet storage lesion. *Transfus Med Rev* 1997; 11: 130-144.
105. Seghatchian J., Krailadsiri P. Red cell storage lesion assesed by the levels of potassium, hemoglobin and annexin V in supernatant. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 121-127.
106. Seghatchian J., Krailadsiri P. The quality of MCS + version C2 double dose platelet concentrate with leucodepletion through a continuous filtration process. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 37-41.
107. Seghatchian J. Krailadsiri P., Dilger P. et al. Cytokines as quality indicators of leucoreduced red cell concentrates. *Transfus Apher Sci* 2002; 26: 43-46.

108. Seghatchian J., Krailadsiri P., Sutherland J. et al. Evaluation of sampling procedures for quality monitoring of red cell concentrates: The need for improving sampling and sample handling techniques of red cell concentrate *Transfus Sci* 1998; 19: 393-395.
109. Seghatchian J. Platelet storage lesion: An update on the impact of various leukoreduction processes on the biological response modifiers. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 125 –130.
110. Shi P.A., Ness P.M. Two – unit red cell apheresis and its potential advantages over traditional whole – blood donation. *Transfusion* 1999; 39: 218-225.
111. Silberman S. Platelets: preparations, transfusion modifications, and substitutes. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 889-894.
112. Simon T.L. Iron, iron everywhere but not enough to donate. *Transfusion* 2002; 42: 664-665.
113. Smith J.W., Gilcher R.O. The future of automated red blood cell collection. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 219 – 226.
114. Solheim B.G., Flesland O., Seghatchian J. et al. Clinical implications of red blood cell and platelet storage lesions: an overview. *Transfus Apher Sci* 2004; 31: 185-189.
115. Sowemimo-Coker S.O. Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus Med Rev* 2002; 16: 46-60.
116. Snyder E.L., Elfath M.D., Taylor H. et al. Collection of two unit soft leukoreduced RBCs from a single donation with a portable multiple-component collection system. *Transfusion* 2003; 43: 1965-1705.
117. Sparrow R.L., Healey G., Patton K.A. et al. Red blood cell age determines the impact of storage and leukocyte burden on cell adhesion molecules, glycoprotein A and the release of annexin V. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 15-23.
118. Stohlwetz P.O., Hergovich N., Stiegler G. et al. Differential induction of P selectin on platelets by two cell separators during platepheresis and the effect on the release of soluble P-selectin. *Transfusion* 1998; 38: 24-30.

119. Straub J., Kolečková E., Haber J. Sideropenická anémie jako projev selektivní malabsopce železa. *Vnitř Lék.* 2001; 7: 493-495.
120. Sweeney J.D. Standardization of the red cell product. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 213-218.
121. Ščudla V., Adam Z., Ščudlová M. Současné možnosti diagnostiky a léčby anémie vnitřních chorob. *Vnitř lék* 2001; 47: 400-406.
122. Špičák J. Screening kolorektálního karcinomu - realita a perspektivy. *Prakt Lék.*2006; 96: 254-259.
123. Tomita T., Takayanagi M., Kiwada K. et al. Vasovagal reactions in apheresis donors. *Transfusion* 2002; 42: 1561-1566.
124. Tran-Mi B., Storch H., Seidel K. et al. The impact of different intensities of regular donor plasmapheresis on humoral and cellular immunity, red cell and iron metabolism, and cardiovascular risk markers. *Vox Sang* 2004; 86: 189.
125. Tzima E., Walker J.H. Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets* 2000; 11: 245 – 251.
126. Urbánek P., Mareček Z., Brodanová M. et al. Rizikové faktory přenosu viru hepatitidy C (HCV) v české populaci. *Čas Lék Čes* 2002; 6:185-188.
127. Valbonesi M. et al. Evaluation of dosed red blood cell units collected with Gambro BCT-Trima. *Transfus Apher Sci* 2001; 24: 65-70.
128. Valbonesi M., Bruni R., Bo A. et. al. Double platepheresis (DPA) and tailored RBC collection with the Excel- Pro: preliminary results. *Transfus Apher Sci* 2001; 24: 71-73.
129. Valbonesi M. et al.: Cellular contamination of plasma collected with various apheresis system. *Transfus Apher Sci* 2001; 24: 91-94.
130. Vasconcelos Y.E., Figueiredo A.C. Seghatchian J. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. *Transfus Apher Sci* 2003; 29:13-16.

131. Vášová I., Mayer J. Biologické účinky alogenních leukocytů a de leukotizace buněčných krevních derivátů. *Vnitř lék* 1995; 10: 713-718.
132. Wadhwa M., Seghatchian J., Thorpe R. Are cytokines in platelet concentrates responsible for febrile transfusion reactions ? *Transfus Sci* 1997; 18: 367-71.
133. Wadhwa M., Seghatchian M.J., Dilger P. et al. Cytokine accumulation in stored red cell concentrates: effect of buffy – coat removal and leucoreduction. *Transfus Sci* 2000; 23: 7-16.
134. Wadhwa M., Seghatchian M.J., Dilger P. et al. Cytokines in WBC – reduced apheresis PCs during storage: a comparison of two WBC – reduction methods. *Transfusion* 2000; 40: 1118-1126.
135. Wadhwa M., Krailadsiri P., Dilger P. et al. Cytokine levels as performance indicators for white blood cell reduction of platelet concentrates. *Vox Sanq* 2002; 83: 125-136.
136. Waxman D.A. Volunteer donor apheresis. *Therapeutic Apheresis* 2002; 6: 77-81.
137. Weisbach V., Wanke C., Zingsem J., et al. Cytokine generation in whole blood, leukocyte depleted and temporarily blood cell concentrates. *Vox Sanq* 1999; 76:100-106.
138. Western H.K., Videm V. Donor neutrophil function after plateletpheresis. *Transfusion* 2000; 40: 1414- 1418.
139. Wolfe L.C. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. *Transfusion* 1985; 25: 185-202.
140. Wollersheim J., Dautzenberg M., van de Griendt and al. Donor selection criteria to maximize double platelet products (DPP) by platelet apheresis. *Transfus Apher Sci* 2006; 34: 179-186.
141. Zeiler T.A., Kretschmer V. Automated blood component collection with the MCS 3p cell separator: evaluation of three protocols for buffy coat – poor and white cell-reduced packed red cells and plasma. *Transfusion* 1997; 37: 791-797.

142. Zingsem J., Weisbach V., Zimmermann R. et al. Preparation of FFP as by-product of platepheresis. *Transfusion* 2001; 42: 81-86.
143. Posuzování způsobilosti k dárcovství krve, krevních složek a krvetvorných buněk. *Věstník ministerstva zdravotnictví ČR*, 1998, částka 1.
144. Commission Directive 2004/33/EC of 22 March 2004 implementing Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for blood and blood components.

10. Seznam zkratek

2,3 DPG	2,3 difosfoglycerát
AB-16	antikoagulační roztok k odběru trombocytů
ACD	antikoagulační roztok
ACD -A	antikoagulační roztok k odběru erytrocytů a trombocytů
ATP	adenosintrifosfát
AV/SD	průměr / směrodatná odchylka
CB	celková bílkovina
CMV	cytomegalovirus
CPD	antikoagulační roztok k odběru erytrocytů
EAD MCS	erytrocyty z aferézy deleukotizované ze separátoru MCS+
EAD Trima	erytrocyty z aferézy deleukotizované ze separátoru Trima
EAR MCS	erytrocyty z aferézy resuspendované
ELISA	enzymová imunoanalýza
ERD	erytrocyty z plné krve deleukotizované
ESFH	European Society for Heamotherapy and Heamapheresis
FDA	Food and Drug Administration
Fe	železo
Hb	hemoglobin
HLA	histokompatibilní leukocytový antigen
Ht	hematokrit
IgA	imunoglobulin A

IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
LDH	laktátdehydrogenáza
ln	přirozený logaritmus
LRS	leukoredukční systém
MKO	multikomponentní odběr
PA	plasma z aferézy
PF-4	destičkový faktor 4
PK	plná krev
PLT	trombocyty
PSGL-1	prostaglandin 1
qTfRi	index solubilního transferinového receptoru
RBC	erytrocyty
SAGM	skladovací roztok pro konzervaci erytrocytů
sTfR	solubilní transferinový receptor
TA	trombocyty z aferézy
TA300	trombocyty z aferézy ($> 300 \times 10^9$ PLT)
TA300 MCS	trombocyty z aferézy ze separátoru MCS ($> 300 \times 10^9$ PLT)
TA300 Trima	trombocyty z aferézy ze separátoru Trima ($> 300 \times 10^9$ PLT)
TB	trombocyty z buffy coatu
TBV	celkový objem krve
TGF-β	transformující růstový faktor beta
TP	transfuzní přípravek
TPV	zpracovaný objem krve (total procedure volume)
TU	transfuzní jednotka
β-TG	beta-tromboglobulin

11. Seznam ilustrací

Tab. č. 1	Možné kombinace multikomponentních odběrů	7
Tab. č. 2	Separátory pro multikomponentní odběry.....	8
Tab. č. 3	Antikoagulační a skladovací roztoky.....	8
Tab. č. 4	Výběrová kritéria pro odběr dvou jednotek erytrocytů.....	10
Tab. č. 5	Parametry krevního obrazu a zásob železa po dvojité erythrocytaferéze	13
Obr. č. 1	Separátor Haemonetics MCS+.....	22
Obr. č. 2	Separátor Trima Accel.....	22
Tab. č. 6	Spektrum provedených odběrů.....	23
Tab. č. 7	Základní charakteristika sledovaného souboru.....	24
Tab. č. 8	Pracovní vstupní kritéria pro dárce krve multikomponentních aferéz.....	29
Tab. č. 9	Charakteristika kontrolního souboru	28
Tab. č. 10	Parametry aferetických protokolů	30
Graf č. 1	Závislost trvání aferézy na počtu trombocytů dárce.....	31
Graf č. 2	Závislost trvání aferézy na TBV dárce.....	32
Tab. č. 11	Změny parametrů krevního obrazu po MKO.....	33
Tab. č. 12	Změny annexinu a sP-selektinu po aferéze u sledovaného souboru	34
Tab. č. 13	Porovnání hladin annexinu V a sP-selektinu u dárců MKO a kontrolního souboru před odběrem.....	34
Graf č. 3	Vývoj parametrů metabolismu Fe po dvojité erythrocytaferéze	35
Tab. č. 14	Vývoj hemoglobinu a parametrů metabolismu Fe po dvojité erythrocytaferéze.....	36
Tab. č. 15	Vývoj parametrů metabolismu Fe po 2. a 3. erythrocytaferéze	37
Tab. č. 16	Vývoj hemoglobinu a parametrů metabolismu Fe u dárců trombocytů a plasmy	38
Tab. č. 17	Vývoj hemoglobinu a parametrů metabolismu Fe u kontrolního souboru dárců plné krve.....	39
Tab. č. 18	Celková bílkovina, albumin a imunoglobuliny u sledovaného souboru.....	40
Graf č. 4	Vývoj hladin celkové bílkoviny, albuminu a imunoglobulinů v období dvou let.....	41
Tab. č. 19	Základní parametry jakosti erythrocytárních koncentrátů.....	42
Graf č. 5	Závislost Hb a Ht v přípravku na předodběrových hodnotách dárce krve.....	43
Tab. č. 20	Vývoj parametrů membránového poškození erythrocytu.....	43

Graf č. 6 Vzestup parametrů buněčného poškození erytrocytů během skladování.....	45
Graf č. 7 Korelace vzestupu annexinu V s vHb a LDH u erytrocyt. koncentrátů.....	46
Tab. č. 21 Základní parametry jakosti trombocytárních koncentrátů.....	46
Tab. č. 22 Parametry poškození a aktivace trombocytárních koncentrátů	48
Graf č. 8 Vzestup LDH u trombocytárních koncentrátů během skladování.....	48
Graf č. 9 Vzestup annexinu a sP-selektinu u trombocyt. koncentrátů během skladování.....	49
Tab. č. 23 Porovnání annexinu V a sP-selektinu u dárce krve a v přípravku.....	50
Graf č. 10 Závislost hladin sP-selektinu na annexinu V u trombocytů z aferézy v den přípravy.....	50
Tab. č. 24 Vstupní kritéria pro dárce krve.....	52