ΜΟΡΦΕΣ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ: ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

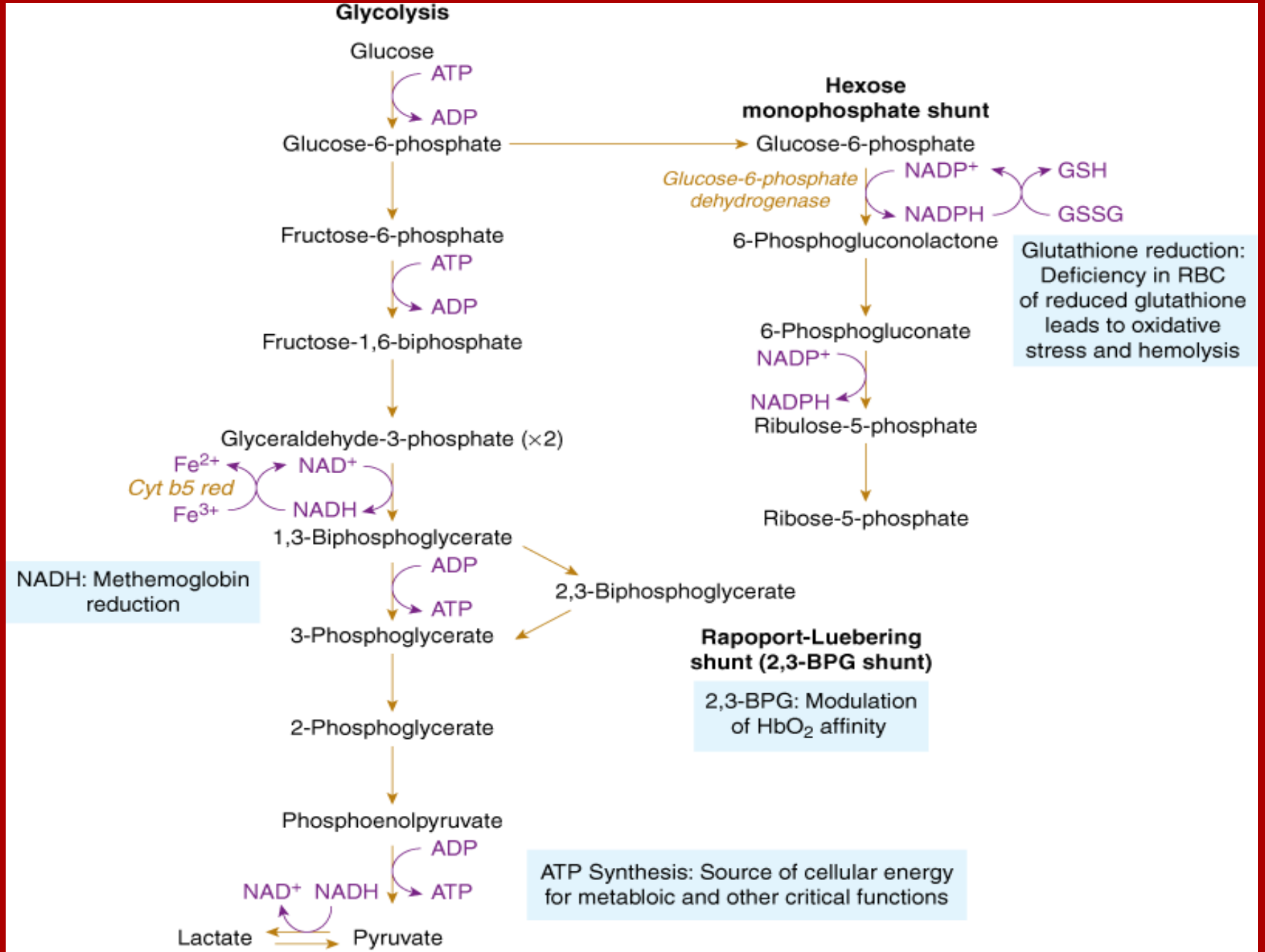
ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΗΛΙΑΔΗ, MD, MSc
Βιοπαθολόγος, Γ.Ν.Φλώρινας (Γ.Ν.Α. Λαϊκό)
Σεμινάριο Αιμοδοσίας, Θεσσαλονίκη, 2018

Μεταβολισμός ερυθροκυττάρων

1. Αναερόβια γλυκόλυση (Emden-Meyerhof) (παραγωγή NADH και ATP)

2. Κύκλωμα μονοφωσφορικής πεντόζης (NADPH – γλουταθειόνη – εξουδετέρωση οξειδωτικών ριζών, μεθαιμοσφαιρίνη)

3. Παράκαμψη Luebering-Rapoport (2,3 DPG)

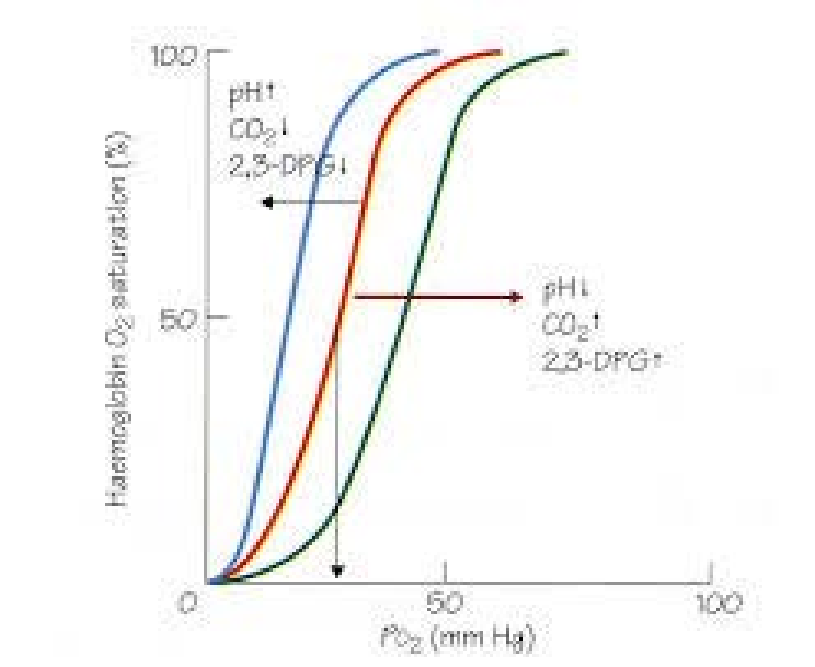


Source: Nelson LS, Lewin NA, Howland MA, Hoffman RS, Goldfrank LR, Flomenbaum NE: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 9th Edition*: http://www.accessemergencymedicine.com

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Καμπύλη κορεσμού O_2

- 2,3-DPG
- pH
- Συγγένεια Hb προς το O_2



Μεταβολικές αλλαγές

- Η λειτουργία της Να/Κ ΑΤΡάσης αναστέλλεται σε χαμηλές θερμοκρασίες
- Συνεχής διαφυγή ενδοκυττάριου Κ+
- Είσοδος Να στα ερυθρά
- Αύξηση συγκέντρωσης Κ+ στο συντηρητικό διάλυμα
- Κίνδυνος υπερκαλιαιμίας

- ❑ Πλύσιμο για αποφυγή υπερκαλιαιμίας σε επιρρεπείς ασθενείς
- ❑ Μετά τη μετάγγιση τα επίπεδα Να+ επανέρχονται σε 24 ώρες, αλλά το Κ+ χρειάζεται 4 μέρες
- ❑ Αφού μεταγγιστούν, τα ερυθρά αναπληρώνουν το ATP και το 2,3-DPG. Το δεύτερο αποκαθίσταται κατά 50% τις πρώτες 3-8 ώρες και φτάνει σε φυσιολογικά επίπεδα σε 24-72 ώρες.

Αποθηκευτική βλάβη

Βιοχημικές - Μεταβολικές αλλαγές	Μηχανικές αλλοιώσεις	Οξειδωτικό stress
• Μείωση γλυκόλυσης • Ελάττωση ATP • Πτώση pH • Μείωση 2,3-DPG • Μείωση GSH • Αύξηση ενδοκυτ. Ca++ • Απώλεια K+	• Αλλοίωση λιπιδικής διπλοστιβάδας • Καθίζηση μεθαιμοσφαιρίνης • Μείωση παραμορφωσιμότητας • Μεταβολές σχήματος, Εχινοκύτταρα • Αιμόλυση	Οξείδωση: • Hb • λιπιδίων • πρωτεϊνών

Οι συνέπειες της αποθηκευτικής βλάβης

- Συσσώρευση βιοδραστικών ουσιών
- Μεταβολικές αλλοιώσεις, αλλαγές σχήματος, αλλοιώσεις ρεολογικών ιδιοτήτων, οξειδωτική βλάβη
- Ελεύθερη Hb → ισχυρός επαγωγέας οξειδωτικού στρες, αγγεισύσπαση, ενεργοποίηση PLTs, φλεγμονή = σημαντικά για ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση
- Ουσιαστικά: κακή ποιότητα μεταγγιζόμενου παραγώγου!

Αντιπηκτικά διαλύματα

- Φωσφορικού οξέος – δεξτρόζης (CPD) 35 ημερών
- Φωσφορικού οξεός- διπλής δεξτρόζης (CP2D) με συντηρητικό διάλυμα 42 ημερών
- Κιτρικού φωσφόρου-δεξτρόζης-αδενίνης (CPDA-1) 35 ημερών
- Με προσθήκη SAG-M (Sodium Chloride- Adenine – Glucose – Mannitol) 42 ημερών

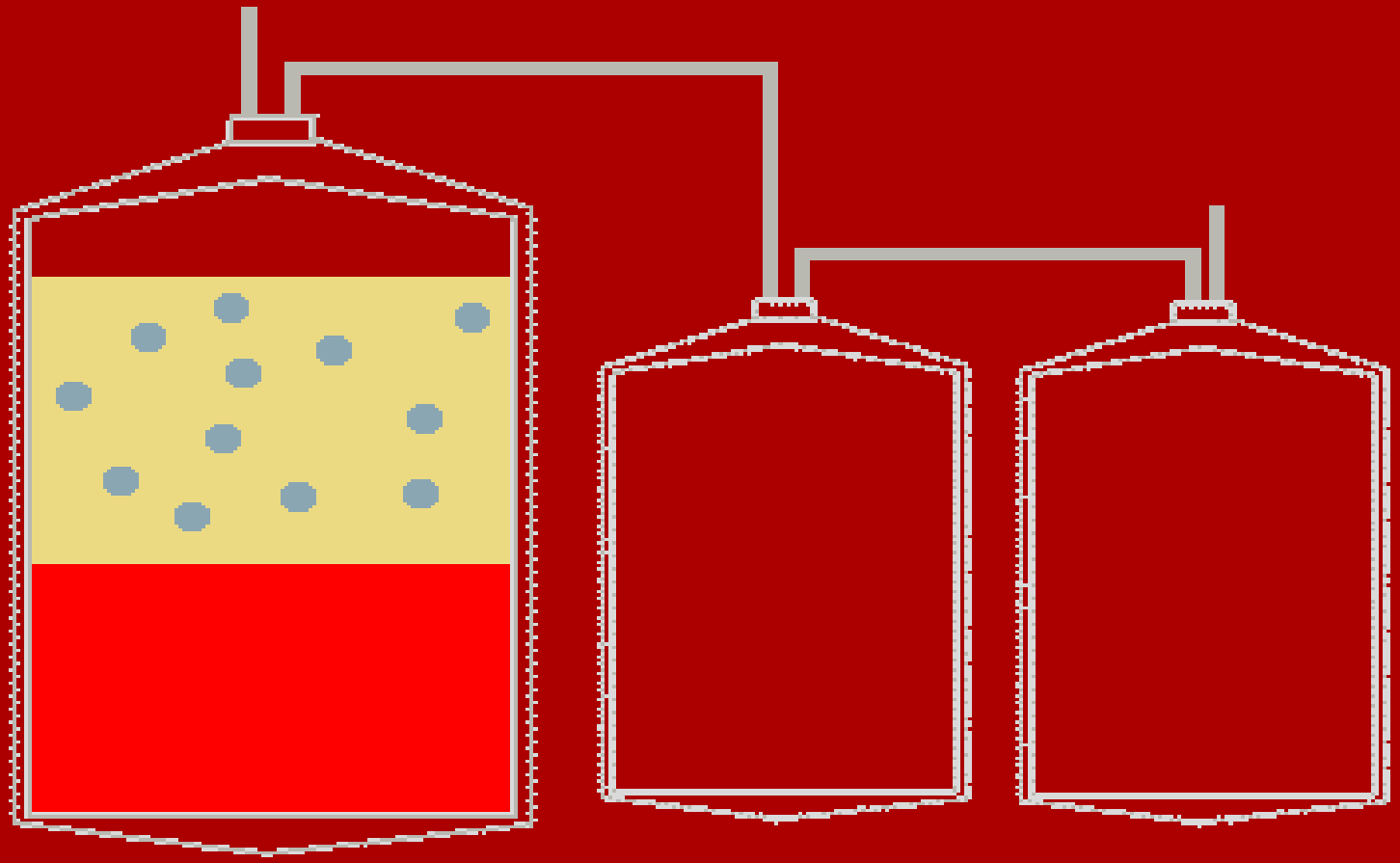
Δράση αντιπηκτικών διαλυμάτων

- ✓ Τα κιτρικά δεσμεύουν Ca++, αναστέλλουν την πήξη κι επιβραδύνουν τη γλυκόλυση
- ✓ Το κιτρικό οξύ ρυθμίζει το pH
- ✓ Η δεξτρόζη είναι πηγή ενέργειας για σύνθεση ATP, μειώνει το ρυθμό υδρόλυσης του φωσφόρου
- ✓ Η μαννιτόλη προστατεύει από αιμόλυση (ακεραιότητα μεμβράνης)
- ✓ Η αδενίνη αποτελεί υπόστρωμα για τη σύνθεση ATP
- ✓ Το μονοφωσφορικό Να+ υποστηρίζει την παραγωγή ATP

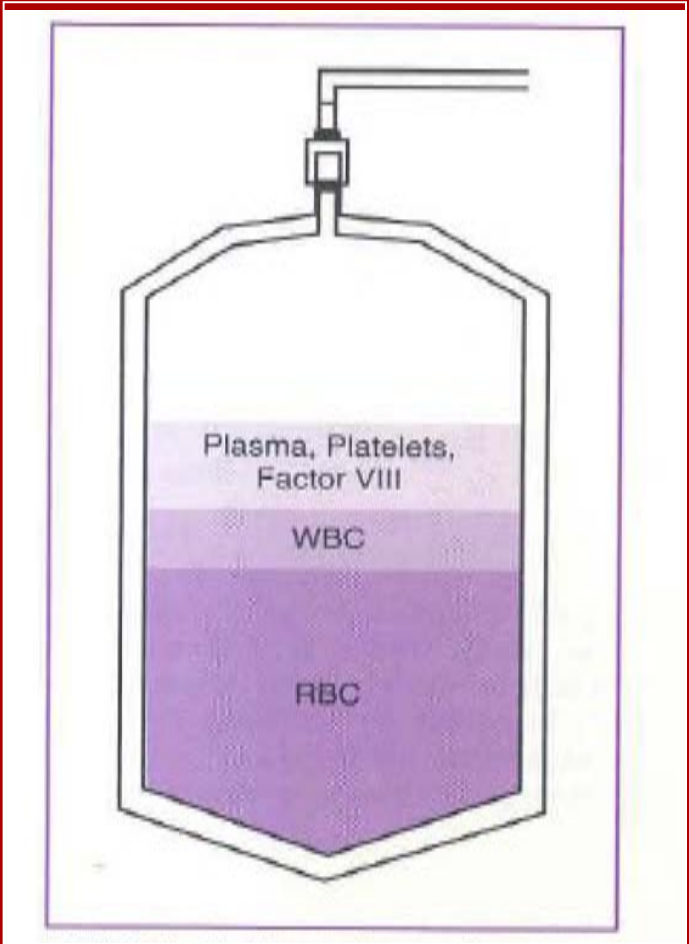
Παρασκευή Παραγώγων – Διαχωρισμός Ολικού Αίματος

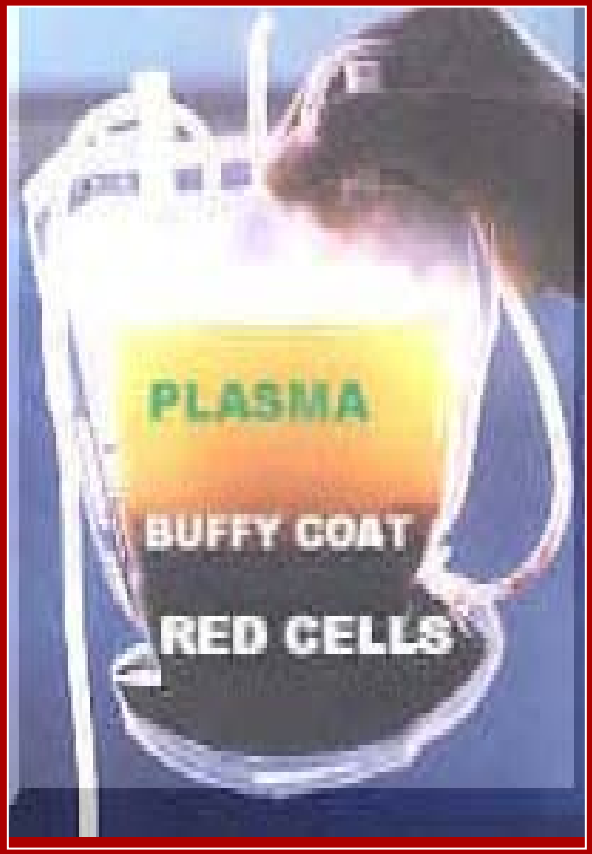
- Φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές.
- Απομάκρυνση του platelet rich plasma (PRP).
- Φυγοκέντρηση PRP σε υψηλές στροφές.
- Απομάκρυνση του platelet poor plasma.
- Συντήρηση αιμοπεταλίων στους 22°C.
- Κατάψυξη του πλάσματος σε 8 ώρες.
- Απόψυξη του πλάσματος στους 1-4^{o}C – δημιουργία κατακρημνίσματος.
- Φυγοκέντρηση – κρυοκαθίζημα.

Ολικό Αίμα σε Τριπλό Ασκό μετά την 1η φυγοκέντρηση

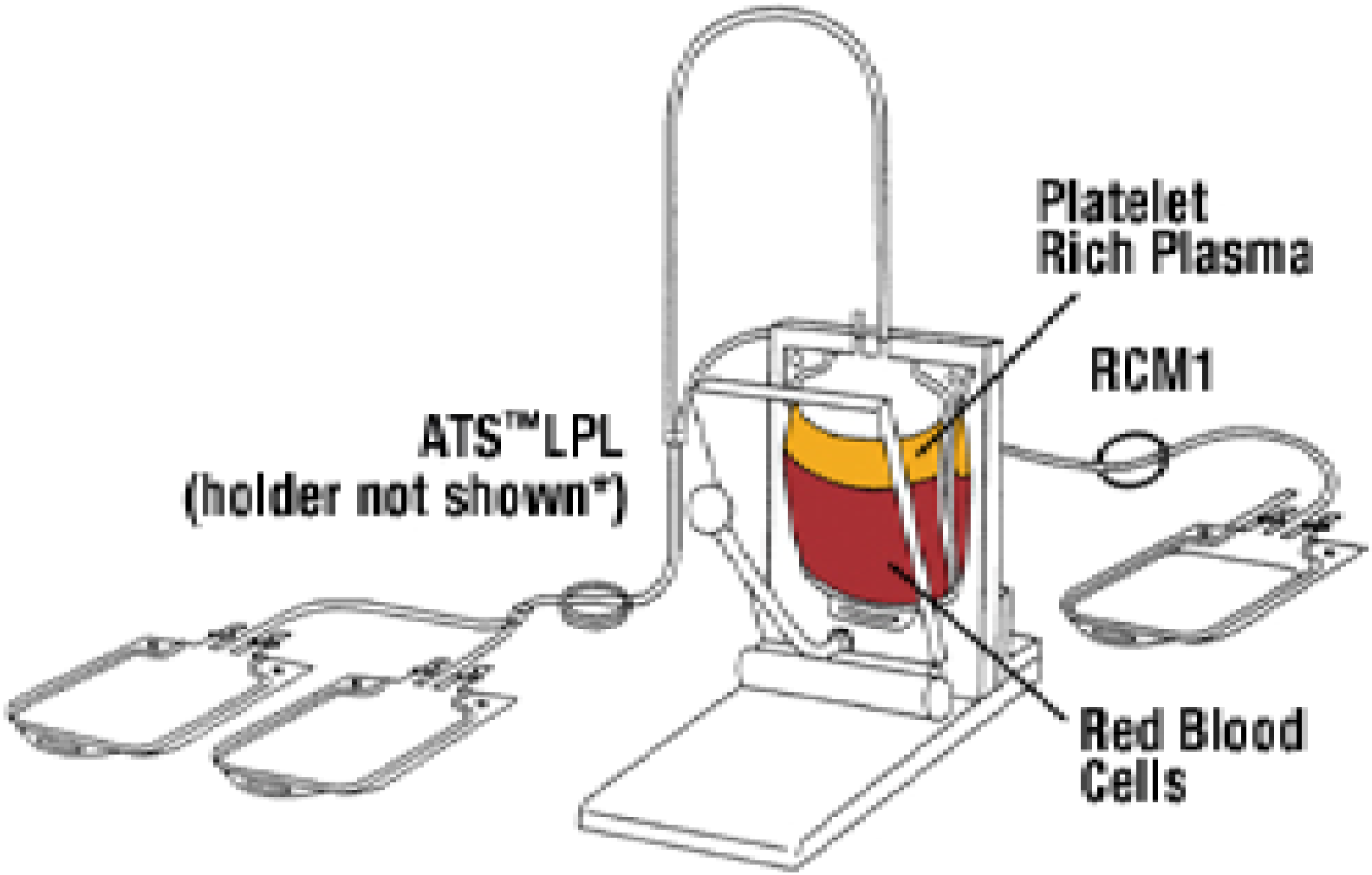


Ολικό Αίμα σε Τριπλό Ασκό μετά την 1η Φυγοκέντρηση

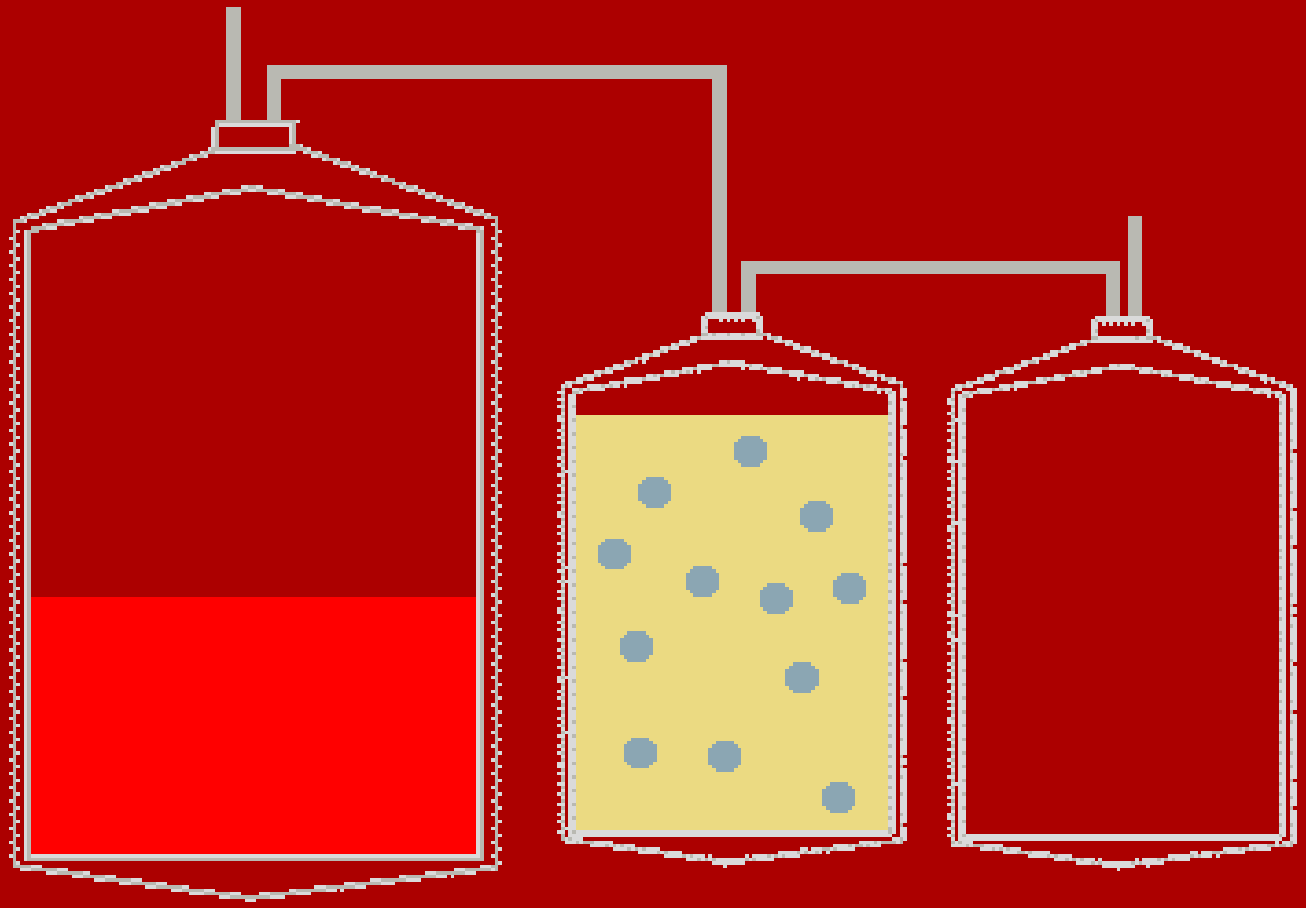




Αποχωρισμός Ολικού Αίματος



Ολικό Αίμα σε Τριπλό Ασκό μετά την 1η Φυγοκέντρηση και τον Αποχωρισμό του PRP



Μορφές συμπυκνωμένων ερυθρών

- Συμπυκνωμένα ερυθρά (ΣΕ)
- ΣΕ σε διάλυμα με πρόσθετες ουσίες (AS)
- ΣΕ χωρίς τη στιβάδα λευκών (BCR)
- ΣΕ χωρίς τη στιβάδα λευκών σε προσθετικό διάλυμα (AS-BCR)
- Λευκαφαιρεμένα
- Ακτινοβολημένα
- Πλυμένα
- Κατεψυγμένα (κρυοσυντηρημένα)

Ποιοτικός έλεγχος

- ✓Προδιαγραφές ποιότητας
- ✓Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την Ποιότητα των Φαρμάκων και της Φροντίδας Υγείας (EDQM)
- ✓Διαδικασίες
- ✓ Τυχαίος έλεγχος μονάδων
- ✓ Τήρηση αρχείων
- ✓ Ανάλυση αποτελεσμάτων
- ✓ Διορθωτικές ενέργειες

Προϋποθέσεις διασφάλισης ποιότητας κοινές για το ολικό αίμα και τα ΣΕ

Παράμετρος που ελέγχεται	Απαιτήσεις ποιότητας	Συχνότητα ελέγχου
ABO, RhD	Ταυτοποίηση ομάδας και Rh	Όλες οι μονάδες
Anti-HIV 1&2	Αρνητικό με εγκεκριμένες μεθόδους	Όλες οι μονάδες
HBsAg	Αρνητικό με εγκεκριμένες μεθόδους	Όλες οι μονάδες
Anti-HCV	Αρνητικό με εγκεκριμένες μεθόδους	Όλες οι μονάδες

ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΑ ΕΡΥΘΡΑ (ΣΕ)

- από ολικό αίμα μετά από φυγοκέντρηση και αφαίρεση μέρους του πλάσματος.
- το βασικό παράγωγο για διόρθωση αναιμίας.
- 2-6°C για 35 ή 42 ημέρες ανάλογα με το αντιπηκτικό
- Μια μονάδα ΣΕ περιέχει όλα τα ερυθροκύτταρα της αρχικής μονάδας ολικού αίματος και ~ 2.5 - 3.0 × 10^9 λευκά, αριθμός αιμοπεταλίων ποικίλλει ανάλογα με τη μέθοδο φυγοκέντρησης

Παράμετρος που ελέγχεται	Απαιτήσεις ποιότητας (προδιαγραφές)	Συχνότητα ελέγχου
Όγκος	280 +/- 50 mL (250 -330 ανάλογα το προσθετικό διάλυμα)	1% όλων των μονάδων
Αιματοκρίτης	65% - 75%	4 μονάδες το μήνα
Αιμοσφαιρίνη	Τουλάχιστον 45 g	4 μονάδες το μήνα
Αιμόλυση στο τέλος της αποθήκευσης	<0,8% της μάζας των ερυθροκυττάρων	4 μονάδες το μήνα

ΣΕ σε διάλυμα με πρόσθετες ουσίες (Additive solution, AS)

- Παρασκευάζονται από το ολικό αίμα με φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του πλάσματος με επακόλουθη προσθήκη κατάλληλου θρεπτικού διαλύματος.
- ~ 2.5 - 3.0 × 10^9 λευκά, αριθμός αιμοπεταλίων ποικίλλει ανάλογα με τη μέθοδο φυγοκέντρησης

Παράμετρος που ελέγχεται	Απαιτήσεις ποιότητας (προδιαγραφές)	Συχνότητα ελέγχου
Όγκος	ανάλογα το προσθετικό διάλυμα	1% όλων των μονάδων
Αιματοκρίτης	50% - 70%	4 μονάδες το μήνα
Αιμοσφαιρίνη	Τουλάχιστον 45 g	4 μονάδες το μήνα
Αιμόλυση στο τέλος της αποθήκευσης	<0,8% της μάζας των ερυθροκυττάρων	4 μονάδες το μήνα

ΣΕ χωρίς τη στιβάδα των λευκών (Buffy Coat Removed, BCR)

- Από το ολικό αίμα με αφαίρεση σχεδόν όλου του πλάσματος και της λευκής στιβάδας με φυγοκέντρηση. Υπάρχει μικρό υπόλειμμα λευκών και ποικίλος αριθμός αιμοπεταλίων.

Παράμετρος που ελέγχεται	Απαιτήσεις ποιότητας	Συχνότητα ελέγχου
Όγκος	250+/- 50 mL	1% όλων των μονάδων
Αιματοκρίτης	50% - 70%	4 μονάδες το μήνα
Αιμοσφαιρίνη	Τουλάχιστον 43 g ανά μονάδα	4 μονάδες το μήνα
Αριθμός λευκών ανά μονάδα	<1,2*10^9	4 μονάδες το μήνα
Αιμόλυση στο τέλος της αποθήκευσης	<0,8% της μάζας των ερυθροκυττάρων	4 μονάδες το μήνα

Ερυθροκύτταρα από τα οποία έχει αφαιρεθεί η στιβάδα λευκών, σε θρεπτικό διάλυμα (additive solution, buffy coat removed, AS-BCR)

Από το ολικό αίμα με φυγοκέντρηση και απομάκρυνση πλάσματος και στιβάδας λευκοκυττάρων κι επακόλουθη προσθήκη θρεπτικού διαλύματος στα ερυθρά. Περιέχει όλα τα ερυθρά της αρχικής μονάδας μειωμένα κατά 10-30 mL.

Παράμετρος που ελέγχεται	Απαιτήσεις ποιότητας	Συχνότητα ελέγχου
Όγκος	Ανάλογα με το διάλυμα	1% όλων των μονάδων
Αιματοκρίτης	50% - 70%	4 μονάδες το μήνα
Αιμοσφαιρίνη	Τουλάχιστον 43 g ανά μονάδα	4 μονάδες το μήνα
Αριθμός λευκών ανά μονάδα	<1,2*10^9	4 μονάδες το μήνα
Αιμόλυση στο τέλος της αποθήκευσης	<0,8% της μάζας των ερυθροκυττάρων	4 μονάδες το μήνα

Λευκαφαιρεμένα ερυθρά

- FNHTR (πυρετικές μη-αιμολυτικές αντιδράσεις)
- Μεταφορά ενδοκυττάριων παθογόνων (CMV…)
- HLA αλλοανοσοποίηση
- Όμως: επιθυμητή φαγοκυττάρωση

- Έστω ένα επεισόδιο FNHTR
- Πολυμεταγγιζόμενοι
- Ανοσοκατασταλμένοι, υποψήφιοι ΜΑΚ
- Ενδομήτριες μεταγγίσεις, νεογνά, βρέφη

Λευκαφαιρεμένα ερυθρά

1. **Λευκαφαίρεση πριν την αποθήκευση**
   - Με φίλτρα ενσωματωμένα στον ασκό (pre-storage leucodepletion)
2. **Λευκαφαίρεση μετά την αποθήκευση**
   - πριν την μετάγγιση (εργαστηριακά φίλτρα)

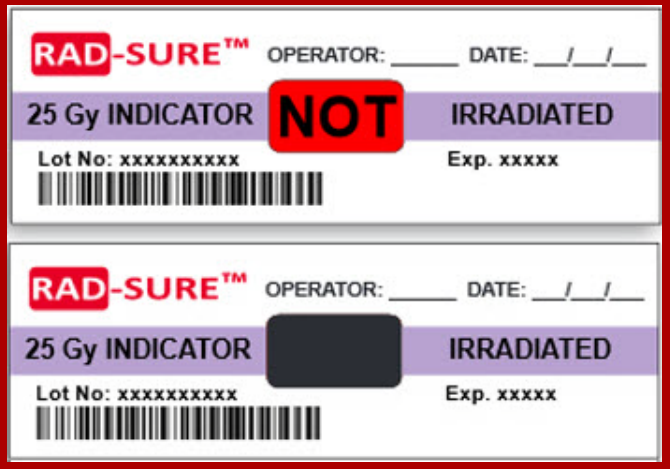
- κάθε μονάδα θα πρέπει να περιέχει < 1x 10^6 λευκοκύτταρα.

Λευκαφαιρεμένα ερυθρά με προσθετικό διάλυμα

Παράμετρος που ελέγχεται	Απαιτήσεις ποιότητας (προδιαγραφές)	Συχνότητα ελέγχου
Όγκο	Αναλόγως αντιπηκτικού	1% των μονάδων
Αιματοκρίτη	50%-70%	4 μονάδες το μήνα
Αιμοσφαιρίνη	Τουλάχιστον 40g ανά μονάδα	1% των μονάδων ή 4 το μήνα
Υπολειπόμενα λευκά	<1x10^6 ανά μονάδα	1% των μονάδων ή τουλάχιστον 10 το μήνα
Αιμόλυση	<0,8 της μάζας των ερυθροκυττάρων	4 μονάδες το μήνα

Ακτινοβολημένα ερυθρά

- Τα κυτταρικά προϊόντα αίματος ακτινοβολούνται για να αδρανοποιηθούν τα Τ-λεμφοκύτταρα (καταστοφή DNA και πρωτεϊνών). Αποφυγή TA-GvHD.
- Δόση 25-50 Gy.
- Ακτινοβολούνται έως 14 μέρες από τη συλλογή
- Χρήση έως 14 μέρες από την ακτινοβόληση
- Διαπερατότητα στιβάδας ερυθρών - Αυξημένο K+
- Ειδική σήμανση ακτινοβολημένου ασκού



Ακτινοβοληµένα ερυθρά

- Νεογνά/βρέφη µε συγγενή ή επίκτητη ανοσοανεπάρκεια
- Ενδοµήτριες µεταγγίσεις
- Νεογνά <1500 g ή <30 εβδοµάδων
- Δέκτες µυελικού µοσχεύµατος
- Αιµοδότης συγγενής α’ βαθµού ή HLA συµβατός

❖ Ισχύουν οι προδιαγραφές ποιότητας των επιµέρους παραγώγων που ακτινοβολούνται

Πλυμένα ερυθρά

- Απομάκρυνση πλάσματος και πρωτεϊνών του, λευκών και αιμοπεταλίων
- Πλύσιμο με ισότονο φυσιολογικό ορό 4°C
- Πρόληψη αλλεργικών αντιδράσεων και υπερκαλιαιμίας

Παράμετρος που ελέγχεται	Απαιτήσεις ποιότητας	Συχνότητα ελέγχου
Όγκος	Ανάλογα με το σύστημα παρασκευής	Όλες οι μονάδες
Αιματοκρίτης	65% - 75%	Όλες οι μονάδες
Αιμοσφαιρίνη	Τουλάχιστον 40 g ανά μονάδα	Όλες οι μονάδες
Αιμόλυση στο τέλος της αποθήκευσης	<0,8% της μάζας των ερυθροκυττάρων	Όλες οι μονάδες
Περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο τελικό υπερκείμενο	<0,5 g ανά μονάδα	Όλες οι μονάδες

Πλυμένα ερυθρά

Ενδείξεις:

- Συγγενή έλλειψη IgA με anti-IgA
- προηγούμενες σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις
- FNHTR που δεν αντιμετωπίζεται με λευκαφαιρεμένα και φάρμακα
- Σε κίνδυνο υπερκαλιαιμίας
- Ενδομήτρια μετάγγιση/μικρά πρόωρα

Αυτόματη συσκευή πλύσης

equipnet.com

Κρυοσυντηρημένα (κατεψυγμένα) ερυθρά

- από ολικό αίμα, μέσα σε 7 ημέρες από τη συλλογή, καταψύχεται με προσθήκη κρυοπροστατευτικού διαλύματος.
- Γλυκερόλη – Δύο μέθοδοι.
- Αποθήκευση από –60^{o}C έως –80^{o}C (ή –140^{o}C έως –150^{o}C σε υγρό άζωτο) για διάστημα μέχρι 10 έτη.
- Ενδείξεις: απόθεμα σπάνιας ομάδας αίματος, πολλαπλά αλλοαντισώματα.
- Πριν τη χορήγηση τα κύτταρα αποψύχονται, πλένονται και προστίθεται ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου ή θρεπτικό διάλυμα.
- Μετά την απόψυξη αποθήκευση σε 2^{o}C έως 6^{o}C. Χορήγηση το συντομότερο (<24 ωρών).

Κρυοσυντηρημένα (κατεψυγμένα) ερυθρά – Δείκτες ποιότητας

Παράμετρος που ελέγχεται	Απαιτήσεις ποιότητας	Συχνότητα ελέγχου
Όγκος	>185 mL	Όλες οι μονάδες
Αιμοσφαιρίνη (υπερκείμενο)	<0.2 g ανά μονάδα	Όλες οι μονάδες
Αιματοκρίτης	65% - 75%	Όλες οι μονάδες
Αιμοσφαιρίνη	Τουλάχιστον 36 g ανά μονάδα	Όλες οι μονάδες
Ωσμοτικότητα	<340 mOsm/L	1% όλων των μονάδων ή τουλάχιστον 4 το μήνα. Αν λιγότερες, όλες οι μονάδες.
Λευκοκύτταρα	<0,1 x 10^6 ανά μονάδα	1% όλων των μονάδων ή τουλάχιστον 4 το μήνα. Αν λιγότερες, όλες οι μονάδες.
Στειρότητα	Στείρα	1% όλων των μονάδων ή τουλάχιστον 4 το μήνα. Αν λιγότερες, όλες οι μονάδες.

Θερμοκρασία αποθήκευσης και μεταφοράς

- 2° έως 6°C, αναστολή γλυκόλυσης και πολλαπλασιασμού παθογόνων
- Μέγιστος χρόνος μεταφοράς 24 ώρες. Στο τέλος του η θερμοκρασία να μην έχει υπερβεί τους 10°C.
- Σε ψυγεία αιμοδοσίας/φορητά ψυγεία μεταφοράς αίματος - παγοκύστες
- Εταιρείες μεταφοράς βιολογικού υλικού, θάλαμοι με σταθερή θερμοκρασία για κάθε παράγωγο
- Κατά το άνοιγμα του περιέκτη ελέγχεται η θερμοκρασία με θερμόμετρο (ηλεκτρονικό).
- Συνιστάται η χρήση καταγραφικού θερμοκρασίας και συναγερμού.

Έλεγχος Θερμοκρασίας

Καταγραφικό και σύστημα ηχητικής ειδοποίησης

Λόγοι απόρριψης μονάδων παραγώγων αίματος

- Διαρροή/ανοιγμένος ή σπασμένος ασκός
- Αιμόλυση
- Πήγματα
- Λιπαιμία
- Αποχρωματισμός/ μωβ χρώμα ερυθρών, υπερκείμενο πλάσμα σκουρόχρωμο/καφέ/έντονο κόκκινο ή μωβ
- Ίκτερος/χολερυθρίνη
- Διακύμανση βάρους >10%

Αιμόλυση

- Ποσοστό αιμόλυσης=(1-Hct)xHb πλάσματος/ολική Hb
  Hb πλάσματος 25mg/dL ροζ χροιά, 100 mg/dL κόκκινο

- Αίτια αιμόλυσης:

- Διακυμάνσεις στις προδιαγραφές των ασκών
- Ταχεία ανάμιξη με αντιπηκτικό και προσθετικά διαλύματα
- Διαταραχή αναλογίας αίματος/αντιπηκτικού
- Καθυστέρηση μεταξύ συλλογής και διαχωρισμού
- Βακτηριακή επιμόλυνση
- Μεγάλες διακυμάνσεις ή μεγάλη ταχύτητα φυγοκέντρησης
- Πλύσιμο ερυθρών

Αιμόλυση

Supernatant of RBC
Percent Hemolysis = 0.11 %
Supernatant of RBC
Percent Hemolysis = 0.36 %
Supernatant of RBC showing higher levels of hemolysis
Percent Hemolysis = 1.14 %

Ολοκληρωμένο σύστημα ποιότητας

- Όλα τα στάδια είναι σημαντικά για τη διασφάλιση της ποιότητας του τελικού παραγώγου

Επιλογή αιμοδότη	**Εξοπλισμός**
Σύστημα συλλογής	**Αποθήκευση και συντήρηση**
Φλεβοκέντηση	**Ποιοτικός έλεγχος**
Ανάμιξη με αντιπηκτικό	**Έλεγχος ψυγείων**
Χρόνος	**Διακίνηση και μεταφορά**
Σήμανση	**Έλεγχος απόδοσης**
Κατευθυντήριες οδηγίες	**Επάρκεια προσωπικού**
Εργαστηριακές τεχνικές	**Ολοκληρωμένο σύστημα ποιότητας**

Ευχαριστώ!
Καλό χειμώνα!