



RED CELLS MANUFACTURED FROM LIPAEMIC WHOLE BLOOD DONATIONS: DO THEY HAVE HIGHER HAEMOLYSIS?

LİPEMİK TAM KAN BAĞIŞLARINDAN ÜRETİLEN ERİTROSİTLER: DAHA YÜKSEK ORANDA HEMOLİZE UĞRAR MI?

ALINTI: doi:10.1111/vox.13366

YAZARLAR: Kelly M.Winter, Rachel G.Webb, Denese C.Marks

ÖZETLEYEN: Dr. Selvi YÜKSEL

GİRİŞ

Lipemi, daha yaygın olarak trigliseridler olmak üzere emülsifiye kan konsantrasyonunun varlığıdır. Bağışçı bağışından önce fazla yağlı bir yemek tüketmişse bağış lipemik olabilir. Lipemi ayrıca diyabet gibi tıbbi nedenler veya hormonal durumlardan kaynaklanabilirken, bağışçının sağlığı ve yaşam tarzı (vücut kitle indeksi (BMI), fiziksel aktivite, sigara ve alkol kullanımı ve kardiovasküler nedenler) da lipid seviyelerini etkileyebilir.

Kan bağışlarındaki lipeminin depolanmış eritrosit komponentlerinde hemolizi etkilediği düşünülmektedir. Yüksek lipid konsantrasyonlarının eritrosit fragilitesini artırarak kanın alınması ve sonraki depolanma sürecinde hemolizi arttırdığına inanılmaktadır. Lipemik plazma transfüzyonunun klinik etkisi tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte kan komponentlerinin terapötik değerini etkilemediği düşünülmektedir.

Tam kan bağışlarındaki lipemi oranının artışıyla birlikte bu çalışma, lipemik kan bağışlarından hazırlanarak 42 gün SAGM'de depolanan eritrositlerin in vitro kalitesini incelemeyi amaçlamıştır. Lipemik olmayan kan bağışlarından elde edilen eritrositlerin hemoliz durumuyla karşılaştırma yapılmıştır. Ayrıca plazma lipoproteinleri ile eritrosit hemolizi arasındaki ilişki incelenmiş, plazma lipoproteinleri ile eritrositlerin son kullanım tarihindeki hemolizinin ilişkisi gözlemlenmiştir.

GEREÇ-YÖNTEM

Tam Kan Toplama: Bu çalışma Avusturalya Kızilhacı Yaşam kanı İnsan Araştırmaları Etik Komitesi tarafından geliştirilmiştir. 470 ml. tam kan bağıışı alınarak santrifüj edilene kadar 20-22°C'de CPD'li torbalara alınmış, in-line filtre ile lökositleri azaltılarak SAGM'de 2-6°C de depolanmıştır.

Komponent Seçimi: Lipemik (n:54) ve non-lipemik (n:20-kontrol) plazma komponenti görsel bakıyla seçilmiş, hızlı plazma dondurucularında dondurularak -30°C'nin altında depolanmıştır. Tüm kan grupları çalışmaya dahil edilmiştir. Kontroller bağıışçı cinsiyeti ve yaş gruplarına göre (18-35, 36-55 ve 55 üzeri şeklinde) ayrılmıştır.

İnvitro Plazma Kalitesi: Plazma 37°C'lik banyolarda eritilmiş, görsel olarak incelenmiş ve test edilmiştir. Plazma Faktör VIII, Faktör IX, Faktör X, von willebrand faktör ve fibrinojen açısından incelenmiştir. 12 ml. lik bir plazma 24 saat boyunca şilomikron varlığı ve şilomikron tabakasının uzunluğunu tespit etmek için dondurulmuştur. Kalan plazma örnekleri ise Faktör II, Faktör V ve anti-trombin III gibi koagülasyon faktörleri ile trigliserid, kolesterol, HDL ve total proteinlerin ölçümü için -80°C'de dondurulmuştur. Plazmadaki lipemi oranının derecelendirilmesi için bir biyokimya cihazı ile turbidite skoru ölçülmüştür.

İnvitro Eritrosit Kalitesi: Eritrositler alındıktan sonraki 7, 21 ve 42. günlerde örneklenmiştir. Hb, Htc, RBCC, MCV, RDW, MCH ve MCHC değerleri ile pH metre yardımıyla oda ısısındaki pH değeri ölçülmüştür. Eritrositlerden elde edilen süpernatantlar 5000 devirde 8 dk santrifüj edildikten sonra -80°C'de depolanmıştır. Sonrasında süpernatandaki serbest hemoglobin ve Hb hemoliz oranı ölçülmüş, glikoz, laktat, potasyum ve LDH düzeyleri de ölçülerek kaydedilmiştir. Eritrositler %10'luk trikloroasetik asit ile deproteinize edilmiş ve süpernatantlar da potasyum karbonat ile nötralize edilerek -80°C'de depolanmıştır. ATP biyoluminesans yöntemiyle ATP'nin intraselüler konsantrasyonları ölçülmüştür.

SONUÇ

Lipemik Tam Kan Toplama: Lipemik ve lipemik olmayan kontrol grupları için cinsiyet, yaş ve BMI gibi bağıışçı özellikleri Tablo1'de gösterilmiştir. Lipemik kan bağıışçılarınin ortalama BMI'i kontrol bağıışçılarından anlamlı olarak farklı bulunmamıştır (29.2±4.1 kg/m² ve 28.6±6.7 kg/m²

p:0,6746). Lipemik bağışların sadece üçü saat:12'den önce alınmışken kalan 51'i öğleden sonra alınmıştır. Ortalama bağış saati 14:00-16:00 arasındadır. 20 kontrol bağışın 4'ü saat:12'den önce, 10'u 12:00-16:00 arası ve 6'sı da 16:00'dan sonra alınmıştır.

Plazma: Lipemik ve kontrol plazmalar arasında koagülasyon parametreleri açısından anlamlı farklılıklar yoktur (Tablo 2). Lipemik grupta Faktör VIII konsantrasyonu kontrol grubuna göre daha düşüktür. Ancak bu da istatistiksel olarak anlamlı değildir (p:0.738). Lipemik gruptaki bağışçılardan 20'sinin kan grubu O, 30'unun O dışı gruplar iken 4'ünün kan grubu tespit edilememiştir. Kontrol grubundaki tüm bağışçılar A grubundadır. İki grup arasında kolesterol konsantrasyonu açısından farklılık görülmezken, lipemik gruptaki ortalama trigliserid konsantrasyonu kontrol gruptan dört kat daha yüksek bulunmuştur (Şekil 1a,b). 54 lipemik bağışın 36 'ında (%67) şilomikronlar mevcutken kontrol plazma örneklerinin hiçbirinde mevcut değildir. Şilomikron oranı trigliserid konsantrasyonu ya da eritrosit hemolizi ile korele değildir (Şekil 2). Lipemik plazmadaki turbidite skorları, trigliserid konsantrasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili iken kolesterol veya şilomikron tabakası yüksekliği ile ilişkili değildir (Şekil 3). 20 kontrol plazmanın 15'inde analizatörün tespit sınırının altında turbidite mevcuttur.

Eritrositler: Eritrosit depolama sürecinde ölçülen eritrosit indikatörleri ve kalite göstergeleri Tablo 3'de gösterilmiştir. Lipemik tam kandan elde edilen eritrositlerdeki RBCC değeri kontrol eritrositlerdekinden belirgin olarak yüksek iken RDW değeri daha düşüktür. Gruplar arasında glikoz konsantrasyonu açısından fark yok iken laktat konsantrasyonu lipemik grupta daha yüksek bulunmuştur (Tablo 3). RBCC'deki farklılığı hesaplamak için glikoz tüketimi ve laktat üretim oranları ölçülmüştür (Şekil 4a,b). 7 ve 21. günlerdeki laktat üretimi lipemik grupta belirgin olarak yüksek iken 21-42. günlerde yüksek bulunmamıştır. İki grup arasındaki hemolizde anlamlı bir yükseklik farkı yoktur (Şekil 4c). Depolamanın 21. gününde lipemik gruptaki LDH konsantrasyonu kontrol gruba göre anlamlı olarak yüksektir (Şekil 4d). Son kullanma tarihine kadar LDH'daki fark anlamlı değildir. Lipemik ve kontrol kanlar arasında potasyum salınımı, ATP ve MP (mikropartikül) sayılarında anlamlı farklılıklar yoktur (Tablo 3). Son kullanım tarihinde eritrosit hemoliz oranı ile BMI korele değildir (Şekil 5a). Ancak karşılık gelen plazmalardaki trigliserid konsantrasyonu ile zayıf ama anlamlı bir ilişki varken (Şekil 5b) plazma kolesterol konsantrasyonu ile zayıf ama anlamlı olmayan bir korelasyon vardır (Şekil 5c).

TARTIŞMA

Son dönem araştırmaların bir kısmı lipemik ve yüksek hemoliz arasında ilişki olduğunu öne sürmektedir. Bu çalışma hemoliz ile plazma trigliserid, kolesterol ve plazma turbiditesi arasında SAGM'de depolanan eritrositler açısından sadece zayıf bir ilişki olduğunu göstermektedir. Şilomikronların yüksek hemolizle ilişkili olduğu öne sürülse de plazmada şilomikron olup olmamasına bağlı olarak eritrosit hemolizinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu çalışmada 54 lipemik eritrositin sadece 10'unda hemoliz %0.4'ün üzerinde iken kontrol grubun da sadece 2'inde %0.4'ün üzerinde tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı değildir. Eritrosit hemolizinin BMI, bağışçı yaşı ve bağış sıklığı gibi faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Batılı ülkelerde bağışçılar genel olarak sağlıklı iken obezite varlığında artış görülmekte olup bağışçıların ortalama BMI'sinde de artış vardır. Obezitenin eritrosit metabolizmasını değiştirdiği ve hasarlanmaya karşı duyarlı hale getirdiği düşünülmektedir. Obezite artmış eritrosit agregasyonu ile ilişkili olup kan akımı ve oksijenizasyonu etkileyerek RDW ve inflamatuvar göstergelerin artışına neden olmaktadır. Ancak bu çalışmada kontrol bağışçıların RDW düzeyinin lipemik bağışçılardan daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın verileri lipemik bağışlardan elde edilen eritrositlerdeki hemolizin daha fazla olduğu eğilimini gösterse de bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu nedenle lipemik kan bağışlarından elde edilen eritrositler zorunlu enfeksiyon hastalıkları testleri tamamlandığı sürece transfüze edilmek için uygun görülmektedir.

TABLE 1 Donor sex, age and body mass index (BMI)

Parameter	Lipaemic (n = 54)	Control (n = 20)
Sex		
Male	47 (87%)	14 (70%)
Female	7 (13%)	6 (30%)
Age (years)		
Mean \pm SD	39 \pm 12	42 \pm 15
18-34	24 (44%)	8 (40%)
36-54	26 (48%)	8 (40%)
Over 55	4 (8%)	4 (20%)
BMI (kg/m ²)		
Mean \pm SD	29.2 \pm 4.1	28.6 \pm 6.7
Healthy: 18.5-24.5	4 (7%)	5 (25%)
Overweight: 25-29.5	33 (61%)	12 (60%)
Obese: Over 30	17 (32%)	3 (15%)

Note: BMI classifications as per World Health Organization for the general population [33].

TABLE 2 Coagulation factors in lipaemic and control fresh frozen plasma (mean \pm SD)

Parameter	Lipaemic (n = 54)	Control (n = 20)	p-value ^a
Antithrombin III (%)	100.9 \pm 10.7	102.6 \pm 14.6	0.5910
Factor II (%)	98.2 \pm 13.2	94.7 \pm 12.2	0.3029
Factor V (%)	101.0 \pm 15.9	98.7 \pm 18.2	0.5893
Factor VIII (%)	108.0 \pm 28.5	121.6 \pm 29.3	0.0738
Factor IX (%)	117.2 \pm 25.4	124.6 \pm 28.3	0.2848
Factor X (%)	100.6 \pm 16.4	102.4 \pm 14.0	0.6791
Fibrinogen (g/L)	2.8 \pm 0.5	2.8 \pm 0.8	0.9963
von Willebrand factor (%)	99.1 \pm 32.0	109.1 \pm 26.6	0.2154
Total protein (g/L)	57.7 \pm 3.7	58.1 \pm 2.9	0.5926

^ap-value determined using unpaired t-tests.

TABLE 3 Red cell indices and quality markers during storage (mean \pm SD)

Parameter	Lipaemic (n = 54)			Control (n = 20)			p-value ^a
Volume (ml)	260 \pm 15			260 \pm 13			0.9172
RBCC (10^{12} /L)	6.79 \pm 0.37			6.55 \pm 0.32			0.0100
Haemoglobin (g/unit)	52.2 \pm 5.3			51.0 \pm 5.0			0.3656
Haematocrit (L/L)	0.601 \pm 0.019			0.580 \pm 0.023			0.0815
Day	7	21	42	7	21	42	p-value ^b
MCV (fL)	88.8 \pm 5.1	89.8 \pm 5.3	90.2 \pm 5.5	88.8 \pm 3.7	89.2 \pm 3.8	89.7 \pm 3.9	0.7730
RDW (%CV)	12.4 \pm 0.9	12.3 \pm 0.9	12.3 \pm 0.9	12.9 \pm 0.8	12.9 \pm 0.8	12.6 \pm 0.8	0.0447
Glucose (mmol/L)	24.2 \pm 1.5	20.0 \pm 1.4	16.3 \pm 1.8	24.0 \pm 1.1	20.5 \pm 1.2	17.0 \pm 1.5	0.3590
Lactate (mmol/L)	11.1 \pm 1.4	20.2 \pm 2.5	26.4 \pm 3.1	10.7 \pm 1.3	18.6 \pm 2.2	24.4 \pm 2.9	0.0157
Potassium (mmol/unit)	5.1 \pm 1.2	9.8 \pm 1.5	13.5 \pm 1.7	4.5 \pm 1.1	9.5 \pm 1.7	13.5 \pm 1.8	0.5047
pH at 22°C	7.0 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	6.6 \pm 0.1	7.0 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	6.7 \pm 0.1	0.8366
ATP (μ mol/g Hb)	4.8 \pm 0.6	4.6 \pm 1.2	2.5 \pm 0.5	5.1 \pm 0.6	4.4 \pm 0.5	2.6 \pm 0.5	0.7570
Microparticles (10^4 /unit)	46 \pm 25	106 \pm 114	486 \pm 406	122 \pm 153	307 \pm 791	511 \pm 620	0.1859

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; Hb, haemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; RBCC, red blood cell count; RDW, red cell distribution width.

^ap-value determined using an unpaired t-test.

^bp-value determined using a repeated measures analysis of variance.

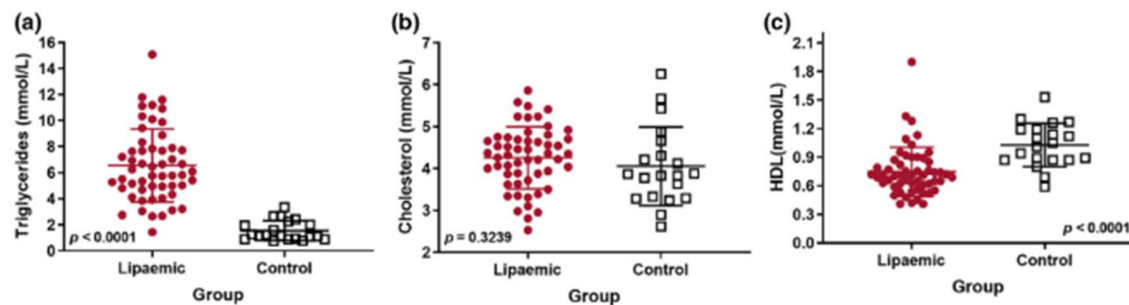


FIGURE 1 Triglyceride and cholesterol concentrations in lipaemic and control plasma. (a) Triglyceride, (b) cholesterol and (c) high-density lipoprotein (HDL) concentrations in lipaemic and control plasma. Triglyceride, cholesterol and HDL concentrations in plasma were measured using a biochemistry analyser. Dots represent individual units; lipaemic, n = 54; control, n = 20. Horizontal lines are the mean \pm SD. The p-value was determined using an unpaired t-test.

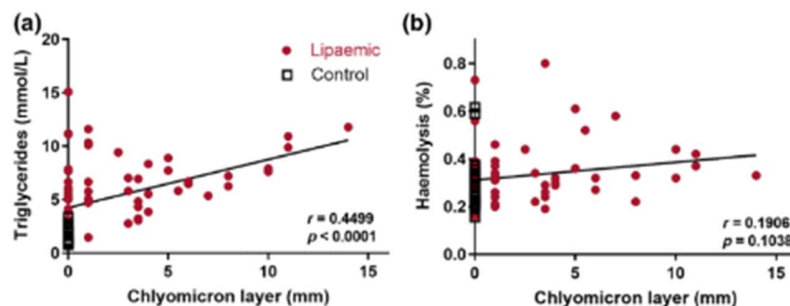


FIGURE 2 Correlation between chylomicrons layer, plasma triglycerides and red cell haemolysis. Correlation between chylomicron height and (a) triglyceride concentration and (b) red cell haemolysis at expiry. The presence of chylomicron was determined after overnight refrigeration, and the height of the layer was measured. Triglyceride concentrations in plasma were measured using a biochemistry analyser. Dots are individual units; lipaemic, n = 54; control, n = 20. The solid line represents a simple linear regression line of best fit, and a Pearson's correlation was used to calculate r- and p-values.

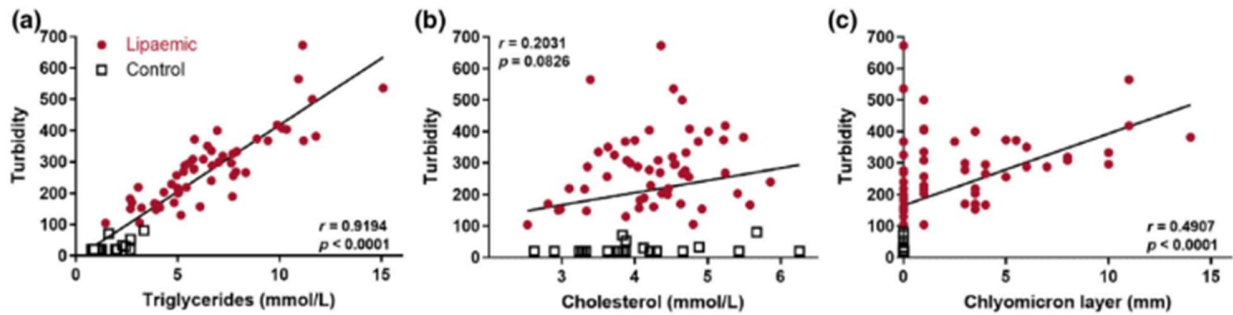


FIGURE 3 Turbidity score of lipaemic plasma, and correlations with triglycerides, cholesterol and chylomicrons. Correlation between lipaemic plasma turbidity score and (a) triglyceride concentration, (b) cholesterol concentration and (c) chylomicron layer. Turbidity score, triglyceride and cholesterol concentrations in plasma were measured using a biochemistry analyser. Chylomicron presence was determined after overnight refrigeration, and the layer was measured. Dots represent individual components; lipaemic, $n = 54$; control, $n = 20$. The solid line represents a simple linear regression line of best fit, and a Pearson's correlation was used to calculate r - and p -values.

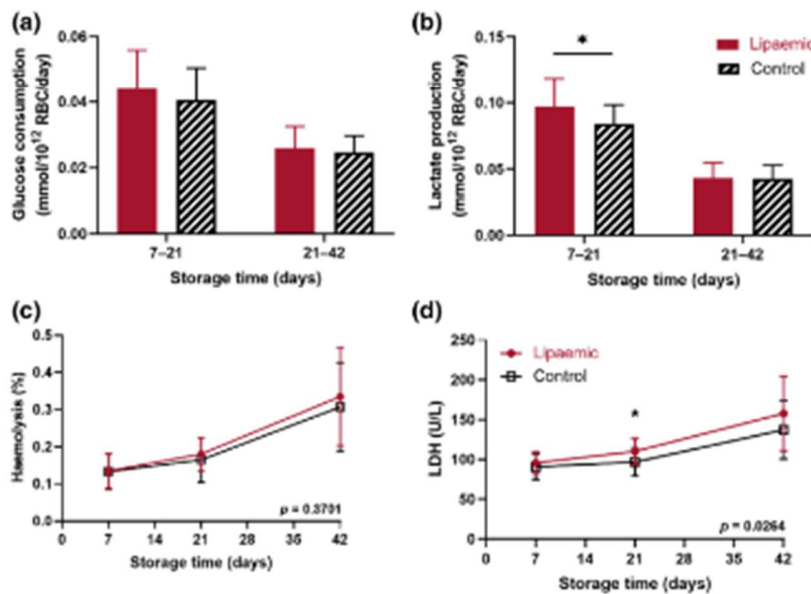


FIGURE 4 Metabolism and cell damage of lipaemic and control red cells over storage. (a) Glucose consumption and (b) lactate production in lipaemic and control RBC over storage. (c) Haemolysis and (d) lactate dehydrogenase (LDH) concentrations in lipaemic and control RBC over storage. Glucose, lactate and LDH concentrations in RBC supernatants were measured using a biochemistry analyser. Data are the mean \pm SD; lipaemic, $n = 54$; control, $n = 20$. * $p < 0.05$ as determined using a two-way repeated measures analysis of variance.

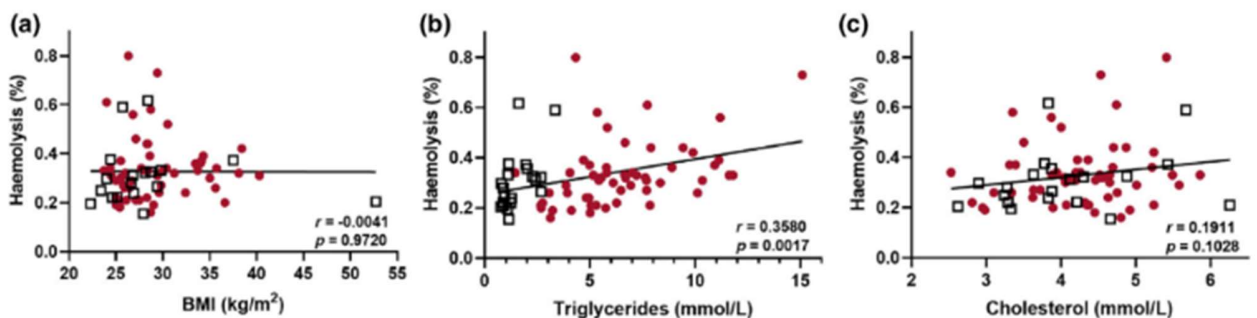


FIGURE 5 Correlations of haemolysis with donor body mass index (BMI), triglyceride and cholesterol. Correlation between red cell haemolysis at expiry (Day 42) and (a) donor BMI, (b) triglyceride concentration and (c) cholesterol concentration. Triglyceride and cholesterol concentrations in plasma were measured using a biochemistry analyser. Dots represent individual components; lipaemic, $n = 54$; control, $n = 20$. The solid line represents a simple linear regression line of best fit, and a Pearson's correlation was used to calculate r - and p -values.