

METABOLIC REJUVENATION UPGRADES CIRCULATORY FUNCTIONS OF RED BLOOD CELLS STORED UNDER BLOOD BANK CONDITIONS

METABOLİK YENİLENME KAN BANKASI KOŞULLARINDA SAKLANAN ERİTROSİTLERİN DOLAŞIMDAKİ FONKSİYONLARINI İYİLEŞTİRİR

ALINTI: doi: <https://doi.org/10.1111/trf.16245>

YAZARLAR: Mickaël Marin, Camille Roussel, Michael Dussiot, Papa A. Ndour, Olivier Hermine, Yves Colin, Alan Gray, Matt Landrigan, Caroline Le Van Kim, Pierre A. Buffet, Pascal Amireault

ÖZETLEYEN: Dr. S. Başak KOÇ ŞENOL

GİRİŞ:

Eritrosit süspansiyonu en çok uygulanan kan ürünü transfüzyonu olup 4-6 hafta kullanım süresi vardır. Saklama süresince eritrosit süspansiyonunun etkinliği azalmakla birlikte bunun nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır. Hipotermik saklama koşulları eritrositlerin morfolojisi, metabolizması ve protein ekspresyonunu etkilemektedir. Saklama sırasında hücre içi adenosin trifosfat (ATP) ve 2,3 difosfogliserat (2,3-DPG) konsantrasyonunun azalması esas rol oynayan reaksiyonlardır. Bu aşamada geri dönüşümsüz reaksiyonlar arasında protein ve lipid oksidasyon değişiklikleri, proteinlerin bozulması ve membran vezikülasyonu yer almaktadır. Geri dönüşümü olabilecek reaksiyonlar transfüzyon öncesi yenilenme prosesleri ile azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Yenilenme, pürin nükleotid kurtarma yolağının metabolik aktivasyonu ve bunun sonucunda ATP ve 2,3-DPG sentezi artışı ile sağlanabilir. Eritrosit deformibilitesinin azalması ise dalakta yıkımını arttırmaktadır. Eritrosit deformibilitesi ektositometri ve mikrofiltrasyon ile belirlenebilir. Yüzey-hacim oranı eritrosit deformibilitesinde temel belirteçtir.

Çalışmada, SAGM solüsyonuyla saklanan eritrositlerde hipotermik depolamanın ve yenilenmenin etkisi değerlendirilmiştir. Eritrosit saklama belirteçleri olan hemoliz, fosfatidilserin (PS) maruziyeti, intraselüler ATP konsantrasyonuna; eritrosit morfolojisine (flowsitometri [IFC] ve kontrastlanma farklılıkları mikroskopuyla [differential interference contrast-DIC microscopy] ile saklama ilişkili mikroeritrosit miktarının belirlenmesi [storage-induced microerythrocytes-SME]) ve osmotik gradient altında uzama kapasitesinin ölçülmesine (elongation capacity under an osmotic gradient-LORRCA) bakılmıştır. Ayrıca, transfüzyon sonrası eritrosit dolaşım kapasitesini değerlendirmek için hücre volümü, adhezyon özellikleri ve filtrelenebilirlik değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM:

SAGM solüsyonunda saklanmış olan 6 ünite eritrosit süspansiyonu (ES) 3, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42. günler ve 42. günde yenilenme (solüsyon: REJUVESOL, Zimmer Biomet) sonrasında değerlendirilmiştir. Değerlendirmede uygulananlar aşağıda sıralanmıştır:

1. ATP konsantrasyon tayini
2. Eritrosit yüzeyinde fosfotidil serin maruziyetinin tespiti
3. Hemoliz ölçümü
4. IFC ile SME ölçümü
5. DIC mikroskobu ile morfolojik analiz (diskosit (D), ekinosit 1-2-3 (E1-E2-E3), sferoekinosit (SE), sferosit (Sp), stomatosit (Sto), sferostomatosit (Ssto))
6. Eritrosit uzama indeksi ölçümü
7. Floresan dışlama ile hacim belirleme
8. Mikrosüzme plaklarının hazırlanması
9. Seyreltici karboksifloresein diasetat süksinil ester ile boyanmış eritrositler için dondurma ve çözme prosedürü
10. Mikrofiltrasyon
11. Endotel hücrelerinde dinamik eritrosit yapışması

SONUÇ ve TARTIŞMA:

Sonuçlar 4 başlık altında incelenmiştir.

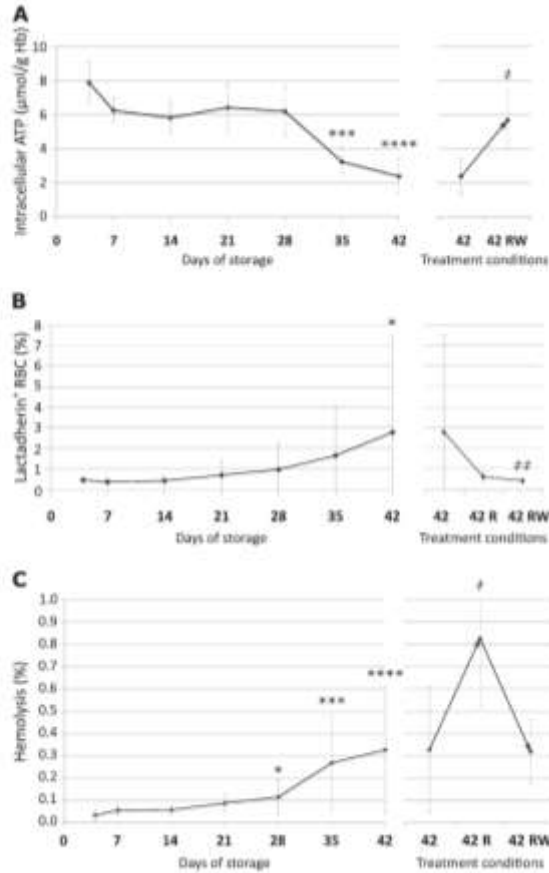
1. Yenilenme ile saklama sonucu meydana gelen değişikliklerde kısmen düzelmeye sağlanmıştır (Figür 1):
Saklama sırasında ve yenilenme işlemi sonrasında intraselüler ATP, eritrositlerin PS maruziyeti ve hemoliz ölçümü yapılmıştır. ATP seviyesinde 35 ve 42. günlerde belirgin düşüş saptanmış ve yenilenme sonrasında anlamlı artış saptanmıştır ($p=0.0313$).
Eritrosit süspansiyonları arasında belirgin farklılıklar olmakla birlikte PS pozitif eritrosit sayısı 42. günde anlamlı olarak artmış ve yenilenme sonrasında anlamlı olarak azalmıştır ($P=0.0018$).
Eritrosit süspansiyonları arasında belirgin farklılıklar olmakla hemoliz 4. günde düşük iken 28. günde anlamlı olarak artmış ve 42. günde maksimum seviyesine ulaşmıştır. Yenilenme sonrasında hemolizde artış saptanmış ($P=0.0187$) ve yıkama sonrasında tekrar azalma görülmüştür. Ancak tüm zamanlarda hemoliz $>1\%$ olmamıştır.

- IFC ve DIC verileri sonuçlarına bakıldığında, yenilenme sonrasında SME oranında azalma ve normal şekilli eritrositlerin oluşması gözlenmiştir. Ayrıca her iki yöntemde de yenilenme sonrasında stomatosit ve sferostomatositlerin ortaya çıktığı görülmüştür (Figür 2 ve 3).
- Yenilenme, depolanan RBC'lerin uzama kapasitesini değiştirmez ve hücre hacminde azalmaya neden olmuştur (Figür4).
- Yenilenme ile depolanan eritrositlerin mikrofiltrelerden geçebilme özelliği artmıştır.
- Eritrosit saklanmasına bağlı olarak gelişen sferoekinosit ve sferositlerin endotele bağlılığı yenilenme ile belirgin olarak azalmıştır (Figür5).

Sonuç olarak tüm veriler değerlendirildiğinde bağışçılar arasında belirgin farklılıklar mevcuttur. Bu çalışmada çalışılan eritrosit süspansiyonu sayısının az olması çalışmada bir sınırlılık olup daha büyük gruplarda yenilenmenin etkisi değerlendirilmelidir. Eğer bu patofizyolojik mekanizmalar doğru ise ve klinik araştırmalar ile valide edilirse transfüzyon bağımlı kişilerde transfüzyonun etkinliği artacaktır.

Şekil 1

FIGURE 1 Impact of storage and rejuvenation on conventional markers of the storage lesion. Intracellular ATP concentration (A), PS exposure (B), and hemolysis (C) were evaluated weekly on 4 RBC units on Days 4, 7, 14, 21, 28, 35, and 42 of storage, after rejuvenation (42R) and after a complete rejuvenation process including washes by an automatic cell processor (42RW). Data are presented as mean \pm SD. A Friedman ANOVA test completed by a Dunn's *post hoc* test was used to compare data collected along storage to data from Day 4 ($^*P \leq .05$; $^{**}P \leq .01$; $^{***}P \leq .001$; $^{****}P < .0001$). Rejuvenation impact was compared to the untreated condition at Day 42 ($! P \leq .05$; $!! P \leq .01$; $!!! P \leq .001$; $!!!! P < .0001$). For panel A, comparison after rejuvenation was performed by a paired test of Wilcoxon.



Şekil2 ve 3

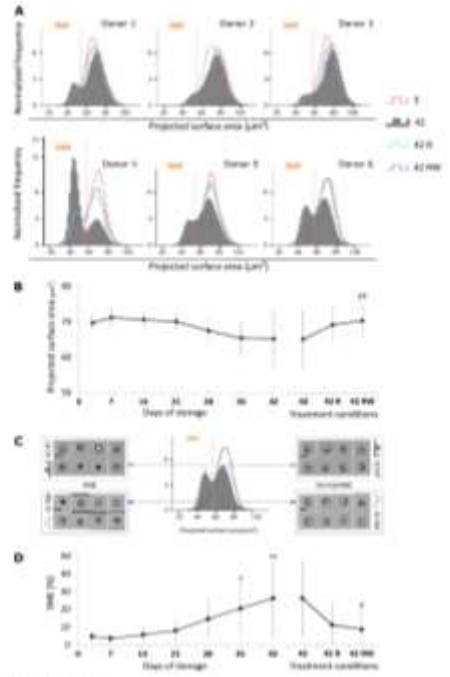


FIGURE 2 Impact on storage

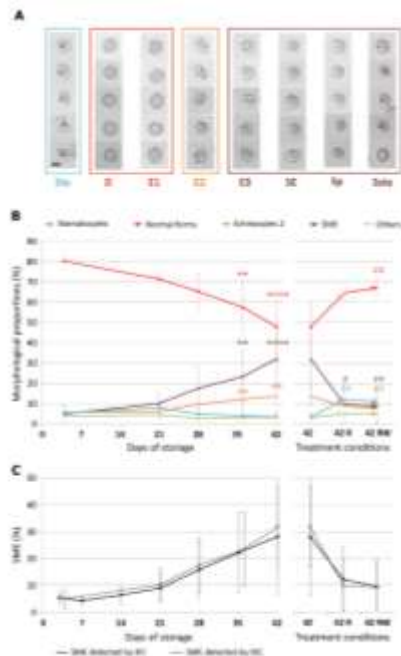


FIGURE 3 Impact on morphology

Şekil 4 ve 5

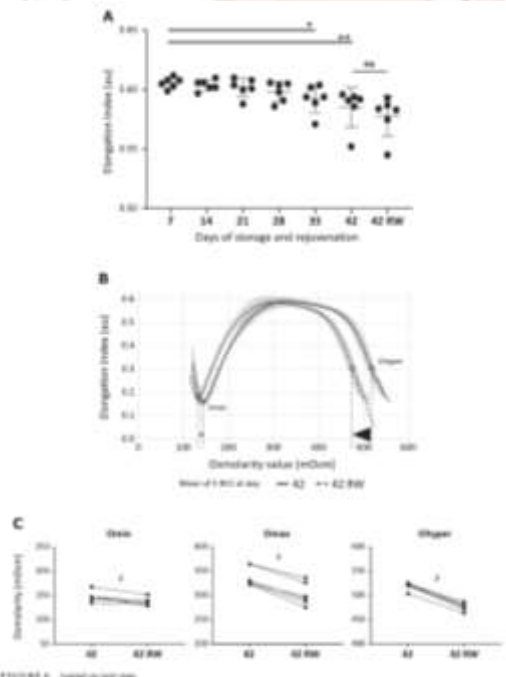


FIGURE 4 Impact on storage

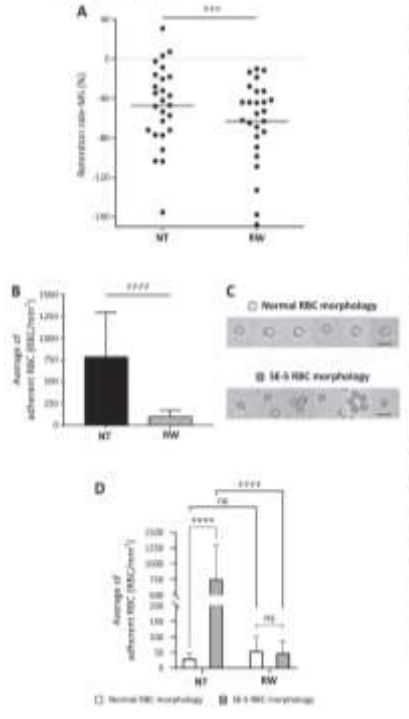


FIGURE 5 Impact of reperfusion on RBC flexibility and adhesion to endothelial cells. A. Adhesion rate of 20 RBC under normal between 15 and 45 days (NT) and after a complete reperfusion process including standard heparin (RW) were performed by microphotometry. Comparisons between the proportions of stored or reperfusion RBCs against adherent RBCs before and after storage conducted in negative control representing on combination of the model RBCs. Black horizontal lines represent mean values. B. Expressions adhesion experiments on endothelial cells show an important decrease in the average adherent RBCs after 42 RBC were stored 42 days after a complete reperfusion process including standard heparin. C. Representative images of adherent RBCs were classified in two morphologic categories normal RBCs (green oval) and SE-RBCs with a SE-RBC shape (grey oval). Scale bars represent 10 µm. D. Distribution of adherent RBCs among each morphologic category before and after a complete reperfusion process including standard heparin. Adherent RBCs were enumerated under flow conditions (1 dyn/cm²) data in A and C are presented as mean ± SD. In panel A, a paired Wilcoxon tests were performed. Reperfusion impact was compared in the associated conditions on Day 42 (***P < 0.01), 35 and 21, a paired Mann-Whitney tests were employed to compare the reperfusion conditions to the untreated condition on Day 42 (**P = 0.01, ****P < 0.0001) or to compare each morphologic category within a condition (**P < 0.01, ****P < 0.0001).

riive