

## 혈소판농축액 보관 시 교반 중단 및 백혈구의 제거가 혈소판의 품질에 미치는 영향

노상근<sup>1,2</sup> · 정의석<sup>2</sup> · 최원철<sup>1</sup> · 위재호<sup>2</sup>

부산대학교 생명과학부 생물학전공, 대한적십자사 부산혈액원<sup>2</sup>

### Effect of Interrupted Agitation and Removal of Leukocyte on Platelet Quality during the Storage of Platelet Concentrates

Sang Geun Roh, M.T.<sup>1,2</sup>, Ue Suk Joung, M.D.<sup>2</sup>, Won Chul Choi, Ph.D.<sup>1</sup>, and Jai Ho Wee, M.D.<sup>2</sup>

Department of Biology<sup>1</sup>, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan; Busan Blood Center, Korea Red Cross<sup>2</sup>, Busan, Korea

**Background :** This study aimed to analyze the influence of the interruption of agitation and removal of leukocytes on platelet concentrates (PCs), and determine the maximum amount of time the agitation could be interrupted without impairing PCs' effectiveness during the storage period.

**Methods :** Four ABO-identical random donor platelets agitated for 24 hr were pooled, and divided into 4 units, and 2 units of them were leukoreduced. Then 52 pooled units were categorized into 4 groups, non-leukoreduced continuous agitation (Non-LRCA), non-leukoreduced interrupted agitation (Non-LRIA), leukoreduced continuous agitation (LRCA), and leukoreduced interrupted agitation (LRIA), and preserved for 6 days (total 7 days). Mean platelet volume (MPV), pH,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{pO}_2$ ,  $\text{pCO}_2$ , CD62P, CD61, glucose, lactate, ammonia and free fatty acid were measured during the period.

**Results :** Starting from the Day 4, the pH and  $\text{HCO}_3^-$  of Non-LRIA group begun to decrease while the amount of lactate production, glucose consumption, and MPV increased compared to the Non-LRCA group ( $P < 0.01$ ). An increase in  $\text{pO}_2$  level was observed in the interrupted agitation groups as the storage period prolonged ( $P < 0.01$ ). The pH levels of all the units in the agitation groups remained higher than 6.4 up to Day 7, while those of the non-leukoreduction group did so only up to Day 2, but those of leukoreduction in the interrupted agitation groups did so up to Day 4.

**Conclusions :** The interruption of agitation reduced the platelet's capacity to utilize oxygen, increasing lactate amount and reducing pH level. However, the in vitro parameters of the Non-LRIA and Non-LRCA groups on Day 2 were similar to each other and the pH level remained at 6.4 or higher, making one day of agitation interruption possible after 24 hr of agitation. With leukocytes removed, the effective agitation interruption period may become longer. (*Korean J Lab Med* 2008;28:221-9)

**Key Words :** Platelet concentrates, Interruption of agitation, Polyvinylchloride container, Platelet quality

## 서론

접 수 : 2008년 1월 30일      접수번호 : KJLM2114  
수정본접수 : 2008년 5월 13일  
게재승인일 : 2008년 5월 14일  
교신저자 : 위재호  
우 614-043 부산광역시 부산진구 전포3동 362-4  
대한적십자사 부산혈액원  
전화 : 051-810-9020, Fax : 051-819-6930  
E-mail : jhwez@redcross.or.kr.

혈액중양환자, 고형암 환자를 대상으로 한 방사선 요법, 화학요법 및 조혈모세포 이식 등의 적극적인 치료가 보편화되면서 혈소판 수혈의 필요성이 날로 높아지고 있으며 혈소판농축액은 이들 환자를 위한 중요한 혈액제제로 널리 사용되고 있다. 하지

만 혈소판농축액은 수혈효과를 유지하기 위하여 20-24°C의 보관조건에서 지속적인 교반을 실시해야 하므로 타 혈액제제에 비해 보관 시 세심한 주의를 필요로 한다.

혈소판농축액은 해당작용에 의해 생성되는 젖산의 축적으로 인해 보관기간이 경과할수록 pH가 감소되어 혈소판 손상이 발생하며[1] 보관중인 혈소판농축액의 교반을 중단할 경우 젖산의 증가가 가속화되어 결국 혈소판 손상이 더욱 빠르게 유발되는 것으로 알려져 있다[2]. 하지만 혈소판농축액의 교반을 중단할 경우 곧바로 혈소판 손상이 유발되는 것은 아니므로 교반 중단에 의한 혈소판의 성상변화와 혈소판 손상이 유발되지 않는 최대 교반 중단기간을 파악하는 것은 혈소판 농축액의 보존 및 사용과 관련되어 매우 중요하다. 하지만 국내에서는 혈소판 농축액의 허용 가능한 교반 중단기간에 대한 연구가 없었으며 외국의 경우 일부 보고되었으나[2-5] 현재 국내에서 사용하고 있는 혈소판농축액의 조건, 즉 보존백의 재질, 혈액보존액, 포함된 혈소판 수의 차이로 인하여 이들의 결과를 국내 현실에 그대로 적용하기는 어려운 실정이다. 따라서 본 연구는 국내에서 사용되는 Polyvinylchloride (PVC) 보존백 재질의 혈소판농축액을 대상으로 교반 중단기간의 경과 및 백혈구 제거에 따른 생체 외 실험지표를 분석함으로써 국내 현실에 맞는 혈소판농축액의 최대 교반 중단기간을 파악하고 잔여백혈구의 제거가 혈소판농축액의 교반중단에 미치는 효과를 분석하고자 하였다.

## 대상 및 방법

본 연구는 대한적십자사 부산혈액원을 통해 헌혈된 혈액을 대상으로 실시하였으며 대한적십자 혈액관리본부 연구윤리심의 위원회의 승인(안전2007-2451호)을 받았다.

### 1. 대상

건강한 헌혈자로부터 항응고제 CPDA-1을 사용한 녹십자(주)의 PVC 보존백으로 전혈 400 mL를 채혈하였다. 채혈된 전혈은 6시간 이내에 20°C에서 2,370 g로 3분 30초간 원심 분리하여 적혈구농축액과 혈소판풍부혈장으로 분리하였으며 혈소판풍부혈장은 다시 5,290 g로 5분 30초간 원심 분리하여 혈소판농축액을 제조하였다. 분리된 혈소판농축액의 평균 용량은  $50.7 \pm 2.0$  mL였으며 TOTM (tri-2-ethylhexyl trimellitate)을 가소제로 사용한 혈소판농축액 보관용 PVC백으로 옮겨 20-24°C에서 교반을 실시하였다.

24시간 교반 후 이들 혈소판농축액 중에서 ALT 65 IU/L이

상으로 폐기되는 52단위를 본 연구에 사용하였다. 혈소판농축액은 ABO 혈액형이 동일한 4단위씩 구분하여 무균봉합기(TCD B40, Denco, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 1단위로 모아 1시간 동안 교반한 다음 50 mL 용량의 4단위로 재 분주함으로써 용량, 혈소판 수, 백혈구 수 함유 조건을 균일화시켰다. 동일한 조건으로 제조한 4단위의 혈소판농축액 중 2단위는 백혈구제거필터(Sepacell PLX-5B1, Asahi Kasei Medical Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 잔여백혈구를 제거하였다.

실험군은 백혈구미제거 교반군, 백혈구미제거 교반중단군, 백혈구제거 교반군, 백혈구제거 교반중단군으로 구분하여 실험군당 13단위의 혈소판농축액을 6일간 보관(총 보관일 7일)하면서 연구에 사용하였다. 본 연구에서는 교반중단이 혈소판농축액의 보존에 미치는 영향을 파악하기 위해 백혈구미제거 교반군(대조군)과 교반중단군 간 그리고 백혈구제거 교반군(대조군)과 교반중단군 간의 생체의 지표를 비교하였으며 백혈구제거가 교반중단에 미치는 효과는 백혈구미제거 교반중단군(대조군)과 백혈구제거 교반중단군 간의 지표를 비교하여 분석하였다.

### 2. 방법

혈소판농축액은 20-24°C의 혈소판교반기(PC4200h, Helmer lab, Noblesville, IN, USA)에 보관하면서 1일(균일화 직후), 2일, 4일 그리고 7일에 주사기를 이용하여 검체 3 mL를 채취하여 연구에 사용하였으며 교반중단군은 가법제 2-3회 혼합한 후 검체를 채취하였다.

혈소판 수, mean platelet volume (MPV)는 MICROS 60 (ABX Diagnostics, Montpellier, France) 장비로 측정하였으며 잔여백혈구 수는 Nageotte chamber (Ballast-chamber Koch Products, Friedreichsdorf, Germany)를 이용하여 수기로 측정하였다. pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $HCO_3^-$ 는 RAPIDLAB 840 (Bayer HealthCare, Sudbury, UK) 장비를 이용하여 37°C에서 측정하였으며 pH는 Kilkson[6]의 방식에 따라 22°C의 측정값으로 변환하였다.

포도당, 암모니아, 유리지방산은 HITACHI 7170 (Hitachi Science system, Ibaraki, Japan)로 측정하였으며 젖산은 CO-BAS INTEGRA 800 (Roche Diagnostics, Ropkreuz, Switzerland)을 이용하여 측정하였다. 혈소판 활성도는 Hagberg 등[7]의 방법에 따라 paraformaldehyde로 고정한 혈소판에 CD62P, CD61 항체(BDIS, San Jose, CA, USA)로 염색시킨 후 해당 항원을 Epic XL (Beckman, Fullerton, CA, USA) 장비를 이용하여 측정하였다. 혈소판 10,000개를 측정 후 XL SYS-

TEM II™ 프로그램을 이용하여 forward light scatter (FSC)와 side light scatter (SSC)를 log amplification하였다. FSC와 SSC 화면에서 혈소판 위치를 gating하여 분석하였으며 결과는 CD61 양성인 혈소판 중에서 CD62P 양성으로 나타난 비율로 표시하였다.

연구에 사용된 모든 단위는 보관 7일째에 45 mL의 thioglycollate 및 trypticasein soy 액상배지(Micromedia Co, Busan, Korea)에 각각 5 mL씩 접종하여 37°C와 22°C에 7일간 배양한 후 음성과 양성대조군의 비교를 통해 육안으로 세균오염 여부를 확인하였다.

한편, 본 연구에서는 혈소판농축액의 pH가 6.4 이상인 경우를 교반중단이 가능한 기준으로 정의하였다. 현재 혈소판 생존력의 보존을 위해 허용되는 pH 범위는 미국[8]이 6.2 이상, 유럽연합[9]이 6.4–7.4로 규정하고 있으며 본 연구에서는 보다 상위기준을 제시한 유럽연합의 규정을 적용하였다.

### 3. 통계처리

보관기간별로 실험군 간의 생체 외 지표에 대한 비교는 비모수적 검정방법인 Kruskal–Wallis test, Mann–Whitney test, Spearman 상관분석을 사용하였다. 모든 통계분석은 SPSS–WIN, ver. 12.0을 이용하였으며 통계적 유의수준은  $P<0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 1. 실험군별 잔여 세포 수 및 혈액가스의 변화

백혈구미제거군의 평균 혈소판 수는  $1.5 \pm 0.2 \times 10^9/\text{mL}$  ( $7.5 \pm 0.9 \times 10^{10}/\text{unit}$ )로 백혈구제거군의  $1.2 \pm 0.2 \times 10^9/\text{mL}$  ( $5.8 \pm 1.2 \times 10^{10}/\text{unit}$ )에 비해 높았다. 잔여 백혈구 수는 백혈구미제거군이  $7.8 \pm 3.8 \times 10^5/\text{mL}$  ( $3.9 \pm 1.9 \times 10^7/\text{unit}$ ), 백혈구제거군은  $3.0 \pm 1.4 \times 10^2/\text{mL}$  ( $1.5 \pm 0.7 \times 10^4/\text{unit}$ )로 백혈구제거 필터

Table 1. Changes of *in vitro* parameters among groups during storage of platelet concentrates

	MPV (fL) (n=13)	HCO <sub>3</sub> (mmol/L) (n=13)	pO <sub>2</sub> (mmHg) (n=13)	pCO <sub>2</sub> (mmHg) (n=13)	pH (n=13)	CD62P (%) (n=13)
Day 1	6.6±0.31	17.3±1.24	67.6±44.55	61.7±8.24	7.25±0.09	0.47±0.26
Day 2						
Non-LRCA	6.9±0.28	15.0±1.53	21.2±13.17	64.2±8.16	7.2±0.09	0.2±0.11
Non-LRIA	6.9±0.27 <i>P</i> =0.390	13.8±1.74 <i>P</i> =0.057	28.0±22.93* <i>P</i> =0.614	71.6±11.64† <i>P</i> =0.057	7.1±0.12 <i>P</i> =0.050	0.3±0.17 <i>P</i> =0.977
LRCA	6.8±0.22	15.1±1.09	55.8±42.33	51.5±7.37	7.3±0.008	0.3±0.24
LRIA	6.8±0.28 <i>P</i> =0.390	14.2±1.41 <i>P</i> =0.223	54.6±41.32† <i>P</i> =0.920	55.1±10.50† <i>P</i> =0.418	7.2±0.12 <i>P</i> =0.243	0.3±0.15 <i>P</i> =0.932
Day 4						
Non-LRCA	7.0±0.19	10.5±2.47	25.4±18.90	51.8±4.04	7.1±0.13	0.3±0.20
Non-LRIA	7.6±0.44† <i>P</i> =0.000	5.1±2.56§ <i>P</i> =0.000	47.5±24.10* <i>P</i> =0.017	61.5±8.00† <i>P</i> =0.004	6.65±0.25† <i>P</i> =0.000	0.5±0.32 <i>P</i> =0.319
LRCA	7.0±0.25	11.3±1.68	59.8±39.60	42.5±7.10	7.22±0.10	0.4±0.19
LRIA	7.1±0.33† <i>P</i> =0.479	8.1±3.08§ <i>P</i> =0.003	65.9±33.26† <i>P</i> =0.579	50.0±9.60† <i>P</i> =0.016	7.00±0.26† <i>P</i> =0.004	0.4±0.25 <i>P</i> =0.630
Day 7						
Non-LRCA	7.1±0.23	5.7±1.72	24.3±18.05	44.0±3.95	6.89±0.17	1.0±0.87
Non-LRIA	7.9±0.33 <i>P</i> =0.000	0.3±0.54§ <i>P</i> =0.000	149.5±34.18*§ <i>P</i> =0.000	14.4±8.91§ <i>P</i> =0.000	5.95±0.30† <i>P</i> =0.000	7.8±4.94 <i>P</i> =0.000
LRCA	7.1±0.20	6.8±1.15	60.2±40.56	36.7±7.39	7.07±0.14	1.4±1.23
LRIA	7.6±0.37 <i>P</i> =0.000	2.5±2.36§ <i>P</i> =0.000	107.2±45.65†§ <i>P</i> =0.007	24.8±10.51§ <i>P</i> =0.001	6.51±0.51† <i>P</i> =0.001	4.0±5.75 <i>P</i> =0.525

Day 1, right after pooling; Day 2, one day after pooling; Day 4, three day after pooling; Day 7, 6 day after pooling.

*P* values were calculated by Mann–Whitney test and compared between groups in the same storage period.

\*† $P<0.05$ ; calculated by Kruskal–Wallis test and compared within the same group on Day 2, Day 4 and Day 7. † $P<0.01$ , § $P<0.05$ ; calculated by Mann–Whitney test and compared between groups in the same storage period.

Abbreviations: MPV, mean platelet volume; Non-LRCA, non-leukoreduced/continuous agitation (control); Non-LRIA, non-leukoreduced/interrupted agitation; LRCA, leukoreduced/continuous agitation; LRIA, leukoreduced/interrupted agitation.

에 의해 99.9%의 백혈구가 제거되는 반면 혈소판 또한 22.7%가 감소하는 것으로 나타났다. MPV는(Table 1) 모든 단위에서 보관기간 동안 점차 증가하였다. 보관 2일에 백혈구미제거군 내 교반군과 교반중단군 간의 MPV는 유의한 차이가 없었으나 보관 4일에는 교반중단군이 교반군에 비해 0.6 fL 그리고 보관 7일에는 0.8 fL 더 높게 나타나 교반을 중단한 혈소판농축액 단위들이 교반을 실시한 단위에 비해 빠른 MPV 증가를 보였다( $P<0.01$ ). 백혈구제거군은 보관 4일까지 교반군에 비해 교반중단군의 MPV가 그다지 높지 않았으나 보관 7일에는 0.5 fL 더 높았다. 한편 보관 4일에 백혈구제거 교반중단군의 MPV가 백혈구미제거 교반중단군에 비해 유의하게 낮아( $P<0.01$ ) 교반 중단에 따른 MPV 증가는 잔여백혈구 수가 적은 백혈구제거 교반중단군이 백혈구미제거 교반중단군에 비해 더욱 낮은 것으로 나타났다.

보관 1일(균일화 직후)과 비교한  $\text{HCO}_3^-$  농도는(Table 1) 보관 4일째 백혈구미제거군 내 교반중단군이 교반군에 비해 5.4 mmol/L 더 낮았고 백혈구제거군 내 교반중단군은 교반군에 비

해 3.2 mmol/L 더 감소하여 유의한 차이를 보였다( $P<0.01$ ). 또한 백혈구제거 교반중단군은 백혈구미제거 교반중단군에 비해 보관 4일 및 7일에 더 높은  $\text{HCO}_3^-$  농도를 유지하였다( $P<0.05$ ). 백혈구미제거군 내 교반중단군의  $\text{pO}_2$  level은 보관 4일, 7일에 교반군에 비해 더 높았으나( $P<0.05$ ) 백혈구제거군 내 교반중단군은 보관 7일만 교반군에 비해 유의하게 높았다( $P<0.01$ ). 또한 백혈구제거 교반중단군은 백혈구미제거 교반중단군에 비해 보관 7일에 더 낮은  $\text{pO}_2$  level을 나타내었다( $P<0.05$ ). 한편 보관 4일의  $\text{pCO}_2$  level은 교반중단군들이 교반군들에 비해 유의하게 높았으나( $P<0.05$ ) 보관 7일에는 교반중단군들이 교반군들에 비해 더 낮게 나타났으며( $P<0.01$ ) 백혈구제거 교반중단군의  $\text{pCO}_2$  level은 백혈구미제거 교반중단군에 비해 보관 2일, 4일에는 낮았으나( $P<0.01$ ) 보관 7일에는 더 높게 나타났다( $P<0.05$ ).

## 2. pH 및 혈소판 활성도의 변화

pH는(Table 1) 보관기간 동안 모든 실험군에서 점차 감소하

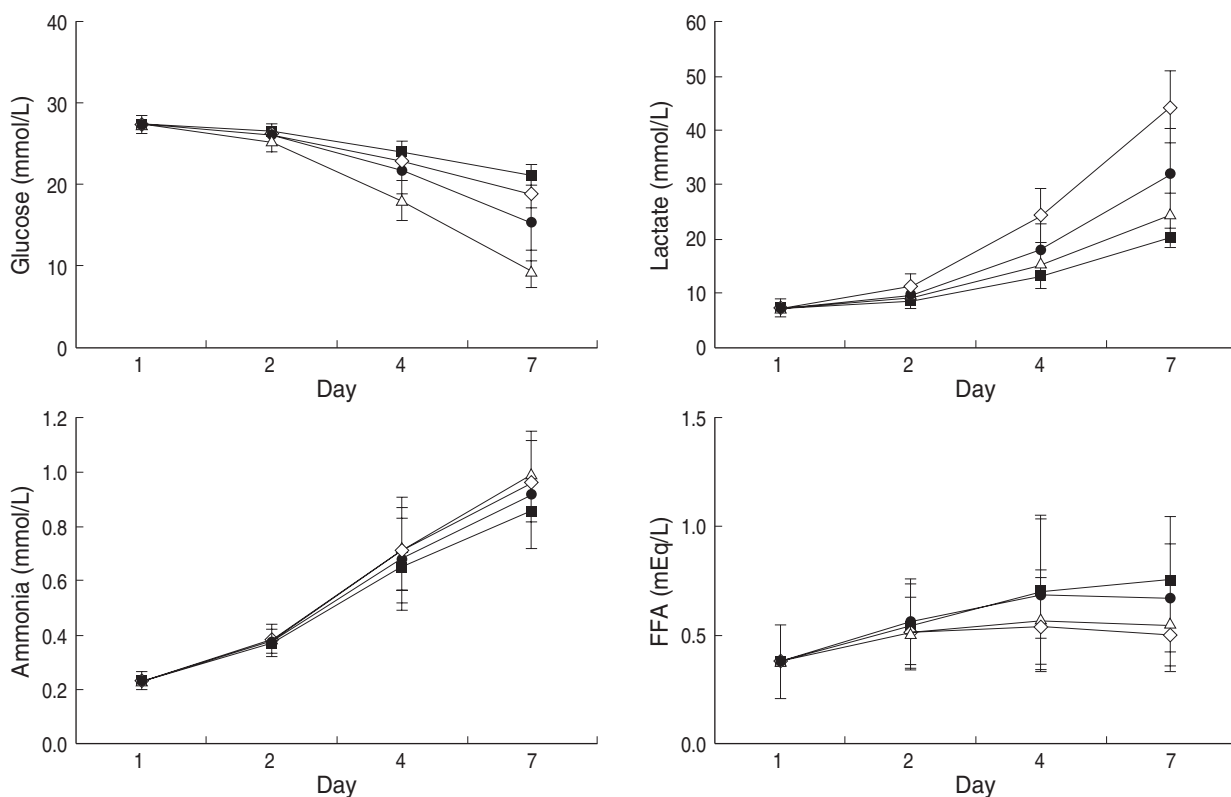


Fig. 1. Metabolic measurements of platelets concentrations with a Non-LRCA (◇), Non-LRIA (△), LRCA (■) and LRIA (●) during the storage period. The results show mean standard deviation (SD) and error bars (n=13). (Glucose and Lactate: Day 4, 7  $P<0.01$ )

P values were calculated by Mann-Whitney test and compared between groups in the same storage period.

Day 1, Day 2, Day 4, Day 7, See Table 1.

Abbreviations: Non-LRCA, Non-LRIA, LRCA, LRIA, See Table 1.

였다. 하지만 백혈구미제거군 내 교반군은 보관 7일에 pH 6.4–6.8인 비율이 23.0%였으며 모든 단위에서 6.4 이상으로 나타난 반면 교반중단군은 이미 보관 4일에 pH 6.4–6.8인 비율이 61.5%, 6.4 이하인 비율이 23.0%로 나타났고 보관 7일에는 6.4 이하인 비율이 92.3%로 나타나 교반군에 비해 높은 pH 감소율을 보였다( $P<0.01$ ). 한편 백혈구제거군 내 교반군은 보관 7일의 pH 측정값이 모든 단위에서 6.8 이상으로 나타난 반면 교반중단군은 30.7%가 6.4 이하로 나타나 교반군에 비해 높은 pH 감소율을 보였으나 백혈구미제거 교반중단군에 비해서는 낮게 감소하였다( $P<0.01$ ). CD62P 표현율은 모든 실험군에서 보관기간이 경과할수록 점차 증가하였다. 보관 7일에 백혈구미제거군 내 교반중단군은 교반군에 비해 6.8% 증가하였으며 백혈구제거군 내 교반중단군은 교반군에 비해 2.6% 높게 나타나 교반중단 실험군의 CD62P 표현율이 더 높았다( $P<0.01$ ). 또한 백혈구제거 교반중단군은 백혈구미제거 교반중단군에 비해 3.8% 낮아 CD62P 표현율의 증가는 잔여백혈구가 적은 백혈구제거군이 더욱 낮은 것으로 나타났다.

### 3. 생화학적 지표의 변화 및 세균배양 결과

포도당의 농도는(Fig. 1) 모든 실험군에서 보관기간이 경과할수록 점차 감소하였으나 완전한 고갈은 나타나지 않았다. 보관 2일, 4일, 7일에 백혈구미제거군 내 교반군의 포도당 소비량은 1.5 mmol/L, 4.8 mmol/L, 8.6 mmol/L인 반면 교반중단군은

2.4 mmol/L, 9.5 mmol/L 18.0 mmol/L이었으며 백혈구제거군 내 교반군의 포도당 소비량은 1.0 mmol/L, 3.5 mmol/L, 6.4 mmol/L인 반면 교반중단군은 1.5 mmol/L, 5.9 mmol/L 12.2 mmol/L로 이미 보관 4일에 교반군의 7일과 유사한 높은 포도당 소비량을 나타내었으며(보관 4일 및 7일:  $P<0.01$ ) 단지 보관 2일만이 교반군과 유사한 포도당 소비량을 보였다. 한편 백혈구제거 교반중단군의 포도당 소비량은 백혈구미제거 교반중단군에 비해 더 낮았다(보관 4일 및 7일:  $P<0.01$ ).

젖산의 농도는(Fig. 1) 보관기간이 경과함에 따라 모든 실험군에서 증가하였다. 보관 2일, 4일, 7일에 백혈구미제거군 내 교반군의 젖산 증가량은 2.5 mmol/L, 8.5 mmol/L, 17.4 mmol/L인 반면 교반중단군은 4.3 mmol/L, 17.3 mmol/L, 37.3 mmol/L이었으며 백혈구제거군 내 교반군의 젖산 증가량은 1.7 mmol/L, 6.3 mmol/L, 13.2 mmol/L인 반면 교반중단군은 2.8 mmol/L, 10.9 mmol/L 25.0 mmol/L로 이미 보관 4일에 교반군의 보관 7일과 유사한 높은 증가량을 나타내(보관 4일 및 7일:  $P<0.01$ ) 포도당 소비량과 동일하게 단지 보관 2일만이 교반군과 유사한 젖산 증가량을 보였다. 또한 백혈구제거 교반중단군의 젖산 증가량은 백혈구미제거 교반중단군에 비해 더 낮아(보관 4일 및 7일:  $P<0.01$ ) 앞서 언급한 포도당 증가와 유사한 형태를 보였다. 암모니아 및 유리지방산의 농도는 보관기간이 경과할수록 모든 단위에서 점차 증가하였으나 실험군들 간에는 유의한 차이가 없었다.

한편, 본 연구에 사용된 혈소판농축액의 모든 단위는 세균배

Table 2. Correlation analysis of *in vitro* parameters according to pH change

	HCO <sub>3</sub> (mmol/L)		Glucose (mmol/L)		Lactate (mmol/L)		CD62P (%)	
	$\gamma_{sp}$	P-value	$\gamma_{sp}$	P-value	$\gamma_{sp}$	P-value	$\gamma_{sp}$	P-value
Day 2								
Non-LRCA	0.898	0.000	0.382	0.197	-0.918	0.000	0.161	0.618
Non-LRIA	0.941	0.000	0.572	0.041	-0.791	0.001	0.140	0.664
LRCA	0.630	0.020	0.454	0.119	-0.830	0.000	0.042	0.897
LRIA	0.779	0.002	0.455	0.119	-0.868	0.000	0.119	0.713
Day 4								
Non-LRCA	0.975	0.000	0.762	0.004	-0.923	0.000	-0.291	0.385
Non-LRIA	0.995	0.000	0.923	0.000	-0.909	0.000	-0.519	0.102
LRCA	0.683	0.010	0.715	0.006	-0.923	0.000	-0.231	0.470
LRIA	0.988	0.000	0.907	0.000	-0.967	0.000	-0.263	0.409
Day 7								
Non-LRCA	0.946	0.000	0.654	0.015	-0.610	0.027	-0.091	0.779
Non-LRIA	0.818	0.001	0.862	0.000	-0.682	0.010	-0.716	0.009
LRCA	0.824	0.001	0.718	0.006	-0.495	0.086	0.168	0.601
LRIA	0.979	0.000	0.989	0.000	-0.934	0.000	-0.618	0.043

P values were calculated by Spearman correlation analysis test and compared with the pH level within the same group in the same storage period.

Day 2, Day 4, Day 7, See Table 1.

Abbreviations:  $\gamma_{sp}$ , Spearman correlation coefficient; Non-LRCA, Non-LRIA, LRCA, LRIA, See Table 1.



양 검사결과 모두 음성으로 나타났다.

#### 4. pH와 검사항목 간의 상관관계

pH와  $\text{HCO}_3^-$  간의 상관관계를 분석한 결과(Table 2) 밀접한 상관성을 보여( $P<0.01$ )  $\text{HCO}_3^-$ 가 pH 감소에 대한 상보적인 기능을 담당하는 것으로 나타났다. 또한 pH는 보관기간 동안 교반 중단군의 포도당 농도와는 양의 상관관계를 그리고 젖산의 농도와는 음의 상관관계를 보여( $P<0.01$ ) 교반중단군의 pH 감소가 포도당 농도의 감소와 젖산 농도의 증가와 밀접한 관계를 갖는 것으로 나타났다. 한편 pH와 CD62P 표현을 간의 상관관계는 백혈구미제거 교반중단군의 보관 7일에서 높은 상관성을 보여( $P<0.05$ ) pH가 6.4 이하로 감소된 경우에 한해 CD62P 표현의 증가가 밀접한 관계를 갖는 것으로 나타났다.

### 고 찰

연구에 사용된 혈소판농축액의 평균 혈소판 수는  $7.5 \pm 0.9 \times 10^{10}/\text{unit}$ 로 2006년 본원에서 품질관리를 위해 측정한 251단위의 평균인  $7.6 \pm 1.8 \times 10^{10}/\text{unit}$ 와 유사하여 실제 의료기관에 공급되는 혈소판농축액의 특성을 반영하였다.

MPV는 보관기간 동안에 발생하는 혈소판 구조의 변화를 반영하는 지표로 Wildt-Eggen[10]는 pH 감소가 MPV 증가와 밀접한 관계를 가진다고 보고하였다. 본 연구에서도 보관기간 동안 모든 단위의 MPV는 점차 증가하여 pH 감소에 따른 혈소판 구조의 변화를 반영하였다. 하지만 백혈구미제거 교반중단군은 보관 4일, 그리고 백혈구제거 교반중단군은 보관 7일에 대조군인 교반군들에 비해 MPV가 유의하게 증가함에 따라 교반중단은 혈소판 구조의 부적합한 변화를 더욱 가속화하는 것으로 나타났다. 한편 백혈구제거 교반중단군의 MPV는 백혈구미제거 교반중단군과 비교하여 보관 4일에 유의하게 낮게 나타나 혈소판 농축액의 잔여 백혈구 제거는 교반중단으로 인해 유발되는 혈소판 구조의 부적합한 변화를 감소시키는 것으로 나타났다.

Moroff 등[11]과 Murphy 등[2]은 이전 연구를 통해 교반이 혈소판농축액의 보존백을 통한 산소공급을 증가시키며 교반을 중단할 경우 보존백 내로의 산소 이동이 감소된다고 주장하였다. 하지만 Wallvik 등[12]은 교반을 중단한 혈소판농축액 내의  $\text{pO}_2$ 가 점차 증가하는 점을 들어 교반 중단이 보존백 내로의 산소 이동을 감소하는 것이 아니라 혈소판의 산소 활용능력을 감소시킨다고 주장하였다. 본 연구 결과 교반을 중단한 혈소판농축액에서 보관기간이 경과할수록  $\text{pO}_2$ 의 지속적인 증가가 나타나

교반 중단이 보존백 내로의 산소이동을 차단하는 것이 아니라 혈소판의 산소활용을 감소시킨다는 Wallvik의 주장과 일치하였다. 또한 교반중단군들의  $\text{pCO}_2$ 가 교반군들에 비해 보관 7일에는 오히려 감소하는 것으로 나타나 교반중단은 혈소판의 호기성 대사작용을 감소하고 혐기성 대사작용을 증가시키는 것으로 나타났다.

본 연구 결과 보관기간 동안 모든 단위의  $\text{HCO}_3^-$  농도는 점차 감소하였다. 하지만 교반중단군의  $\text{HCO}_3^-$  농도는 교반군에 비해 보관 4일부터 유의하게 감소함에 따라 교반중단은  $\text{HCO}_3^-$  농도의 급격한 감소를 유발하는 것으로 나타났다. 또한 백혈구제거 교반중단군의  $\text{HCO}_3^-$  농도는 백혈구미제거 교반중단에 비해 보관 4일, 7일에 유의하게 높아 잔여백혈구의 제거가 교반중단으로 발생하는  $\text{HCO}_3^-$  농도의 감소를 지연하는 것으로 확인되었다.

한편 본 연구에서 pH는  $\text{HCO}_3^-$ 와는 높은 양의 상관관계를 보인 반면 젖산 농도와는 음의 상관관계를 나타내었다. 실제  $\text{HCO}_3^-$  농도가 2.0 mmol/L일 때 pH는 6.5, 젖산 농도는 30.0 mmol/L이었고  $\text{HCO}_3^-$  농도가 0.0 mmol/L일 때 pH는 6.0, 젖산 농도는 40.0 mmol/L로 나타나  $\text{HCO}_3^-$ 는 lactate 농도의 증가에 의해 유발되는 pH 감소에 대한 완충물질로 작용하였으며 pH가 6.0인 경우는 이미 고갈되어 작용하지 못하는 것으로 나타났다.

혈소판 활성화는 혈소판의 보관 시 발생하는 손상에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며[13, 14] 혈소판 활성화를 측정하기 위해 가장 많이 사용되는 CD62P는 세포성 결합분자인 selectin family의 한 요소로서 활성화된 혈소판과 호중구, 단핵구, 내피세포 간의 결합을 중재한다[13, 15]. 따라서 그들의 표면에 CD62P를 표현한 혈소판은 세망내피계의 대식세포와 단핵세포에 의해 순환과정에서 제거된다[16].

본 연구 결과 CD62P의 표현율은 보관 1일에 모든 실험군에서 높게 증가한 후 보관 2일에 감소하였으며 이후 점차 증가하였다. 보관 1일(균일화 직후)에 유발된 CD62P의 표현율 증가는 연구 대상 혈소판농축액의 준비를 위한 혼합과정에서 발생한 것이며 보관 2일부터 곧바로 안정화되어 실제 보존환경을 반영하였다. 한편 CD62P의 표현율은 백혈구미제거 교반중단군의 보관 7일에서 가장 높았으며 pH와 CD62P 간의 상관관계 또한 백혈구미제거 교반중단군과 백혈구제거 교반중단군의 보관 7일에서 가장 높은 음의 상관성을 보여 pH의 감소가 혈소판 활성화의 주요 원인인 것으로 나타났다.

1984년 Kilkson 등[6]은 포도당, 유리지방산, 아미노산이 혈소판농축액의 보관기간 동안 혈소판의 호기성 대사를 위한 잠재적 에너지원으로 활용된다고 보고하였으며 Cesar 등[17]의 이전 연구 결과에서는 보관기간 동안 혈소판농축액 내의 유리지방산

이 점차 증가하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 포도당의 농도는 모든 실험군에서 점차 감소하였으나 보관 7일까지 완전히 고갈되지 않아 에너지원의 부족으로 인해 혈소판의 부적합한 구조 변화가 발생하는 것은 아닌 것으로 나타났다. 하지만 암모니아 및 유리지방산의 농도는 보관기간 동안 실험군별로 유의한 차이를 나타내지 않아 교반중단이나 백혈구의 제거는 이들의 물질 대사에 그다지 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

교반의 중단은 혐기성 해당작용을 가속화시키며[2, 18-20] 따라서 보관기간이 경과할수록 혈소판농축액 내의 pH는 혐기성 해당작용의 증가에 의해 축적된 젖산으로 인해 감소된다[1, 6]. 본 연구에서도 보관기간 동안의 젖산 농도는 점차 증가하였다. 하지만 보관 2일까지는 백혈구미제거군 내 교반군과 교반중단군간의 젖산 생산량의 차이가 1.8 mmol/L로 매우 작은 반면 보관 4일, 7일에는 8.8 mmol/L, 20.0 mmol/L로 크게 나타났고 백혈구제거군 내 교반군과 교반중단 간의 비교에서도 보관 2일에는 1.1 mmol/L로 유사한 반면 보관 4일, 7일에는 4.6 mmol/L, 11.8 mmol/L로 높았다. 따라서 본 연구 결과 교반의 중단이 혐기성 해당작용의 증가를 통한 젖산의 축적을 유발하지만 보관 2일까지는 교반군과 유사하게 혐기성 해당작용이 진행되었음을 반영하였다. 한편 교반중단군들의 포도당 소모량 또한 보관 2일까지는 이들 대조군인 교반군들과 유사하게 나타나 앞의 사실을 뒷받침하였다.

보관기간 동안에 혈소판 생존력을 보존하기 위해서는 혈소판 농축액의 pH를 적절하게 유지하는 것이 필수적이다. 만약 혈소판농축액의 pH가 6.8 이하로 감소할 경우 혈소판의 모양이 원반형에서 구형으로 변형되고 이들의 수혈 후 생존율은 감소한다[21-24]. 따라서 혈소판농축액의 pH 허용범위는 오랫동안 혈소판 보존과 관련된 중요한 요인으로 인식되어왔는데 현재 미국[8]은 6.2 이상, 유럽연합[9]은 6.4-7.4를 pH의 기능적 범위로 규정하고 있다.

Hunter 등[4]은 보관 매질로 혈장을 이용한 연구를 통해 pH 6.5 이상을 유지할 경우 비록 혈소판농축액에 대한 교반을 중단할지라도 혈소판의 hypotonic shock response의 악화는 발생되지 않으며 pH 6.5 이상이 유지되는 교반 중단기간은 혈소판농축액 내의 혈소판 수가  $1.2 \times 10^9$ - $2.5 \times 10^9$ /mL는 48시간 그리고 혈소판 수가  $1.2 \times 10^9$  이하는 72시간임을 보고하였다. Moroff and Georgel[9]는 혈소판 수가  $1.0 \times 10^9$ /mL인 혈소판농축액을 보관 2일째 24시간 교반을 중단한 후 7일 동안 교반을 실시하여 보관한 결과 인식 가능한 혈소판 손상이 없었음을 확인하였으며 Meer 등[5]은 PASⅢM 보존액을 사용한 백혈구제거 성분채혈 혈소판과 백혈구제거 buffy-coat 유래 혈소판 농축액을 대상

으로 실시한 연구를 통해 혈소판 수가  $1.0 \times 10^9$ /mL인 경우 보관 7일 동안 적어도 4일간 교반을 중단하는 것이 가능하다고 보고하였다.

본 연구 결과 백혈구미제거 교반군은 보관 7일 동안 모든 단위들이 pH 6.4 이상으로 양호한 반면 백혈구미제거 교반중단군은 보관 4일에 23.0%가 pH 6.4 이하로 기능적 범위를 벗어난 것으로 나타났다. 따라서 혈소판농축액 내의 혈소판 및 백혈구 수가 각각  $7.5 \pm 0.9 \times 10^{10}$ /unit 및  $3.9 \pm 1.9 \times 10^7$ /unit이며 PVC 보존액을 이용한 본 연구에서는 백혈구미제거군 내 교반중단군의 MPV 증가, 포도당 소모량, 젖산 생산량, CD62P 표현율이 보관 2일까지 교반군과 유사하였으며 pH 또한 6.4 이상을 유지함에 따라 1일 동안의 교반 중단은 교반군에 비해 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 혈소판의 에너지 대사에 백혈구가 미치는 영향을 파악하기 위하여 병실용 백혈구제거 필터를 이용하여 일부 실험군에 대한 백혈구를 제거하였다. 물론 병실용 백혈구제거 필터를 사용할 경우 해당 혈소판농축액은 4시간 이내에 사용하도록 규정되어 있으나[8] 국내에서는 저장 전 백혈구제거 혈소판농축액을 제조하지 않아 부득이하게 병실용 백혈구제거 필터를 연구에 사용하였다.

연구 결과 백혈구제거군 내 교반군은 보관 7일에 모든 단위들이 pH 6.8 이상으로 높게 유지된 반면 교반중단군은 30.7%가 pH 6.4 이하로 기능적 범위를 벗어났다. 하지만 백혈구제거군 내 교반중단군의 MPV 증가, 포도당 소모량, 젖산 생산량, CD62P 표현율이 보관 4일까지 교반군과 유사하였으며 pH 또한 6.4 이상을 유지함에 따라 3일 동안의 교반중단이 가능할 것으로 여겨졌으며 백혈구미제거 교반중단군에 비해서도 양호한 보존상태를 나타내었다. 따라서 혈소판농축액의 백혈구 제거는 수혈관련 부작용의 예방과 더불어 혈소판의 보존에도 유용한 것으로 나타났다.

결론적으로 혈소판농축액의 교반중단은 보존액 표면을 통한 산소 유입을 차단하기보다는 혈소판의 산소 활용능력을 감소시켰으며 그 결과 젖산의 생산이 가속화되어 pH 감소가 유발되는 것으로 나타났다. 하지만 국내의 PVC 보존액을 이용한 백혈구미제거 혈소판농축액은 함유된 혈소판 및 백혈구 수가 각각  $7.5 \pm 0.9 \times 10^{10}$ /unit 및  $3.9 \pm 1.9 \times 10^7$ /unit 이하일 때 MPV 증가, 포도당 소모량, 젖산 생산량 그리고 CD62P 표현율이 교반중단 후 24시간까지는 정상 교반군과 유사하였고 pH 또한 6.4 이상을 유지함에 따라 24시간 교반 후 1일 동안의 교반중단은 가능한 것으로 나타났으며 동일한 조건에서 잔여백혈구를 제거했을 때는 3일 동안 교반중단이 가능하였다. 하지만 이는 4단위씩의

균일화를 위해 혼합된 혈소판 농축액을 대상으로 실시한 연구임으로 혼합하지 않은 혈소판 농축액에서는 다를 수 있으며 또한 일부 생체 외 실험지표에 근거한 판단임으로 교반 중단기간이 실제 업무에 적용되기 위해서는 혈소판의 기능과 생존력을 보다 정확하게 측정할 수 있는 방안을 도입하여 검증하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

**배경 :** 본 연구는 교반중단 및 잔여백혈구제거가 혈소판 농축액에 미치는 영향을 분석하고 혈소판농축액의 최대 교반 중단기간을 파악하기 위해 실시하였다.

**방법 :** ABO 혈액형이 동일하며 24시간 교반한 4단위의 혈소판 농축액을 혼합 후 다시 4단위로 분리하고 이중 2단위는 백혈구를 제거하였다. 이들 52단위는 백혈구미제거 교반군, 백혈구미제거 교반중단군, 백혈구제거 교반군, 백혈구제거 교반중단군으로 구분하여 6일간 보관(총 보관일 7일)하면서 MPV, pH,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{pO}_2$ ,  $\text{pCO}_2$ , CD62P, CD61, 포도당, 젖산, 암모니아, 유리지방산을 측정하였다.

**결과 :** 보관 4일부터 백혈구미제거 교반중단군은 교반군에 비해 MPV, 젖산 생산량 그리고 포도당 소비량이 증가하였고 pH와  $\text{HCO}_3^-$ 은 감소하였다( $P<0.01$ ). 교반중단군의  $\text{pO}_2$ 는 보관기간이 경과할수록 증가하였고( $P<0.01$ ) 교반군의 경우에 7일간 모든 단위에서 pH가 6.4 이상을 유지하였으나, 교반중단군의 백혈구미제거군은 보관 2일까지, 그리고 백혈구제거군은 보관 4일까지 유지하였다.

**결론 :** 교반중단은 혈소판의 산소 활용능력을 감소시켜 젖산 생산의 증가와 pH 감소를 유발하였다. 하지만 보관 2일까지는 백혈구미제거군 내 교반중단군의 생체 외 지표가 교반군과 유사하고 모든 단위에서 pH가 6.4 이상을 유지하므로 24시간 교반 후 1일간의 교반중단이 가능하며 백혈구를 제거할 경우 교반중단 기간이 좀 더 연장될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Simon TL, Nelson EJ, Carmen R, Murphy S. Extension of platelet concentrate storage. *Transfusion* 1983;23:207-12.
2. Murphy S and Gardner FH. Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood* 1975;46:209-18.
3. Murphy S, Sayar SN, Gardner FH. Storage of platelet concentrates

- at 22 degrees C. *Blood* 1970;35:549-57.
4. Hunter S, Nixon J, Murphy S. The effect of interruption of agitation on platelet quality during storage for transfusion. *Transfusion* 2001;41:809-14.
5. van der Meer PF, Gulliksson H, Aubuchon JP, Prowse C, Richter E, de Wildt-Eggen J. Interruption of agitation of platelet concentrates: effects on *in vitro* parameters. *Vox Sang* 2005;88:227-34.
6. Kilkson H, Holme S, Murphy S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood* 1984;64:406-14.
7. Hagberg IA, Akkøk CA, Lyberg T, Kjeldsen-Kragh J. Apheresis-induced platelet activation: comparison of three types of cell separators. *Transfusion* 2000;40:182-92.
8. Brecher ME, ed. Technical manual. 15th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2005:189-99.
9. Guide to the preparation use and quality assurance of blood components. Recommendation No. R(95)15. 12th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2006:121-31.
10. de Wildt-Eggen J, Schrijver JG, Bouter-Valk HJ, Fijnheer R, Bins M, van Prooijen HC. Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. *Transfusion* 1997;37:476-81.
11. Moroff G and George VM. The maintenance of platelet properties upon limited discontinuation of agitation during storage. *Transfusion* 1990;30:427-30.
12. Wallvik J, Stenke L, Akerblom O. The effect of different agitation modes on platelet metabolism, thromboxane formation, and alpha-granular release during platelet storage. *Transfusion* 1990;30:639-43.
13. Rinder HM, Murphy M, Mitchell JG, Stocks J, Ault KA, Hillman RS. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion* 1991;31:409-14.
14. Fijnheer R, Modderman PW, Veldman H, Ouwehand WH, Nieuwenhuis HK, Roos D, et al. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. Changes during platelet storage. *Transfusion* 1990;30:20-5.
15. Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJ, Rozemuller E, van Iwaarden F, Sixma JJ. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood* 1987;70:838-45.
16. Kutlay S, Ilhan O, Arslan O, Beksac M. Influence of storage time on activation of platelets collected with CS 3000 Plus and Cobe Spec-



- tra using platelet storage containers. *Ther Apher* 2002;6:82-5.
17. Cesar J, DiMinno G, Alam I, Silver M, Murphy S. Plasma free fatty acid metabolism during storage of platelet concentrates for transfusion. *Transfusion* 1987;27:434-7.
  18. Holme S, Heaton A, Momoda G. Evaluation of a new, more oxygen-permeable, polyvinylchloride container. *Transfusion* 1989;29:159-64.
  19. Snyder EL, Ezekowitz M, Aster R, Murphy S, Ferri P, Smith E, et al. Extended storage of platelets in a new plastic container. II. In vivo response to infusion of platelets stored for 5 day. *Transfusion* 1985;25:209-14.
  20. Kakaiya RM and Katz AJ. Platelet preservation in large containers. *Vox Sang* 1984;46:111-8.
  21. Holme S and Murphy S. Platelet storage at 22 degrees C for transfusion: interrelationship of platelet density and size, medium pH, and viability after in vivo infusion. *J Lab Clin Med* 1983;101:161-74.
  22. Fijnheer R, Pietersz RN, de Korte D, Roos D. Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates. *Transfusion* 1989;29:36-40.
  23. Slichter SJ and Harker LA. Preparation and storage of platelet concentrates. II. Storage variables influencing platelet viability and function. *Br J Haematol* 1976;34:403-19.
  24. Kunicki TJ, Tucelli M, Becker GA, Aster RH. A study of variables affecting the quality of platelets stored at "room temperature". *Transfusion* 1975;15:414-21.