

Trombocyty on demand - kryokonzervace

Hana Lejdarová

Transfuzní a tkáňové oddělení FN Brno

22. Colours of Sepsis, 27.1.-31.1.2020, Ostrava

Produkce trombocytů ve FN Brno

TTO FN Brno – nejvyšší produkce klinických TP v ČR

– 7 000 T.D. trombocytů ročně

- 5 000 T.D. FN Brno
- 2 000 T.D. externě

– největší spádová oblast (JM kraj + část kraje Vysočina)

– FN Brno = největší nemocnice v ČR s vlastním transfuzním oddělením

Proč mrazit trombocyty?

- 1. Zvýšení dostupnosti v urgentních situacích**
(traumacentrum, transplantační centrum)
- 2. Povinnosti KTC podle nové metodiky MZ ČR**
 - v případě mimořádné události dodat *ihned* 50 T.D. trombocytů

Vox Sanguinis International Forum on platelet cryopreservation *VoxSang (2017), 112, e69-e85*

- Austrálie **ano** (v armádě + klin. studie)
- Belgie ne
- Brazílie ne
- Česká republika **ano**
- Francie sporadicky (zejména HLA shoda)
- Kanada ne (výhledově v armádě)
- Polsko **ano**
- Španělsko sporadicky
- Švýcarsko sporadicky (autologní trombocyty)
- Nizozemí **ano**

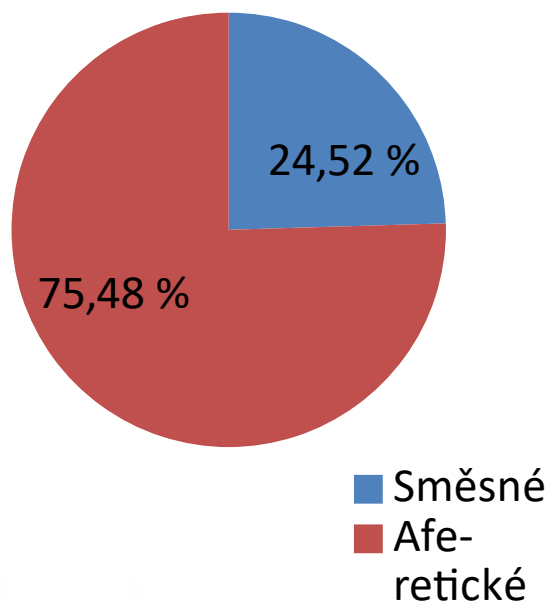
Kryokonzervované trombocyty

- Připravují se zmrazením při teplotě – **80°C** za použití kryoprotektivních látek, které brání poškození buněk.
- **Doba skladování je 2 roky.**
- Po rozmražení nutno aplikovat co nejdříve.

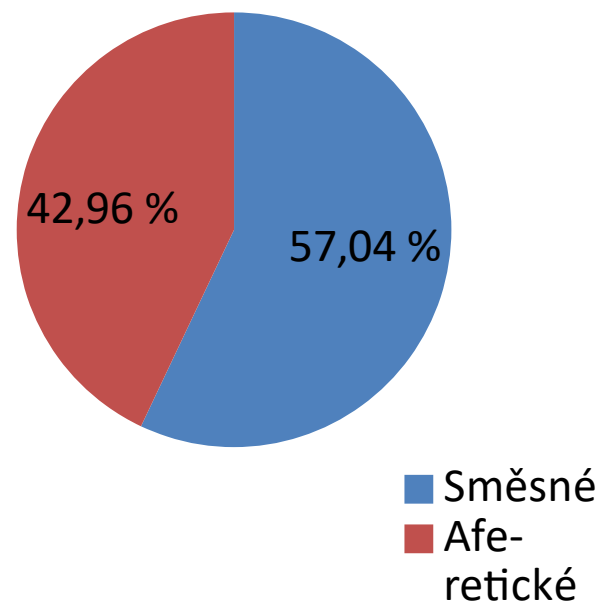


Dilema 1: aferetické nebo směšné?

Česká republika



FN Brno



	Aferetické trombocyty	Směsné trombocyty z BC
Nežádoucí reakce u dárce	↑	↓
Obsah trombocytů	bez rozdílu	bez rozdílu
Obsah leukocytů	bez rozdílu	bez rozdílu
Obsah plazmy od 1 dárce	↑	↓
Obsah erytrocytů	↓	↑
FNHTR	bez rozdílu	bez rozdílu
Alergická reakce	bez rozdílu	bez rozdílu
Bakteriální kontaminace	bez rozdílu	bez rozdílu
Aloimunizace/refrakterita	bez rozdílu	bez rozdílu
Vzestup trombocytů u příjemce	bez rozdílu	bez rozdílu
Cena	↑	↓

Studie ADAPT

The Anti-D Alloimmunization after D-incompatible Platelet Transfusions study

Aferetické	0,00043 ml ery
Směsné	0,036 ml ery



➤ *Nebyl doložen průkazný rozdíl ve schopnosti aferetických a směsných trombocytů imunizovat příjemce.*

Minimální objem erytrocytů schopný způsobit vznik imunizační odpovědi je **0,03 ml** erytrocytů v 1 T.D.

Cid J, Lozano M, Ziman A, et al. Low frequency of anti-D alloimmunization following D+ platelet transfusion: the Anti-D Alloimmunization after D-incompatible Platelet Transfusions (ADAPT) study. British Journal of Hematology 2015; 168: 598-603
transfusion – Art and Science if Compromise. Trans Med Hemother 2013; 105(10): 4106-4114

➤ *Ke kryokonzervaci byly zvoleny směsné trombocyty.*

- Jsou srovnatelné s aferetickými destičkami z hlediska kvality i bezpečnosti.
- Ekonomicky příznivější varianta.

Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang* 2010; 99: 1-15

Katus MC, Szczepiorkowski ZM, Dumont LJ, Dunbar NM. Safety of platelet transfusion: past, present and future. *Vox Sang* 2014;107: 103-113

Pietersz RNI. Pooled platelet concentrates: An alternative to single donor apheresis platelets? *Transfusion and apheresis science* 2009; 41: 115-119

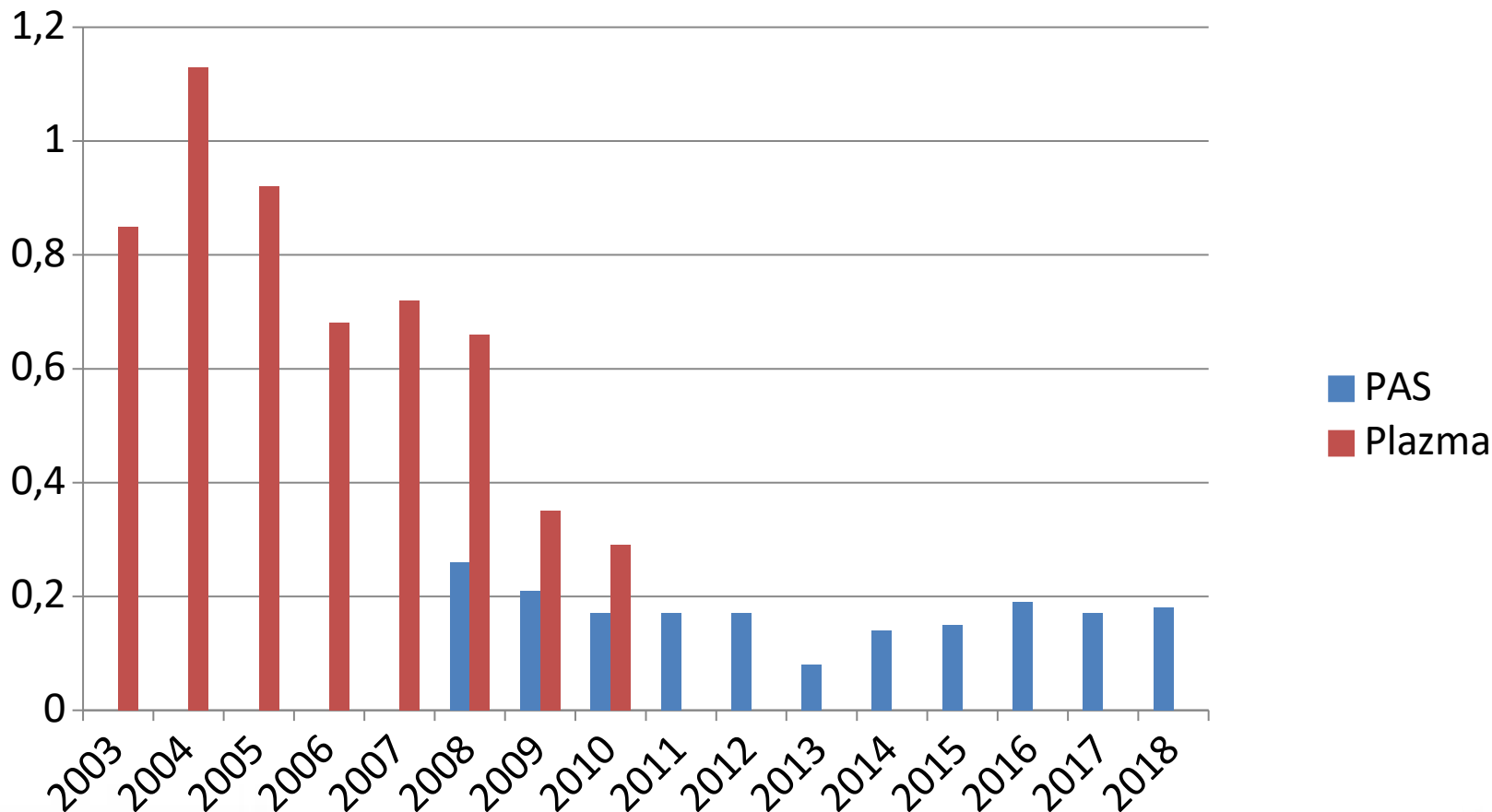
Van der Meer PF. Platelet concentrates, from whole blood or collected by apheresis? *Transfusion and apheresis science* 2013; 48: 129-131

Lozano M, Cid J. Recent advances in platelet processing and storage. *ISBT Science series* 2016; 11(Suppl. 1): 34-38

Schrezenmeier H, Walthers-Wenke G, Müller TH, et al. Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospective g pooled whole blood-derived platelets and apheresis platelets. *Transfusion* 2007; 47: 644-652

Dilema 2: plazma nebo náhradní roztok?

Potransfuzní reakce po podání trombocytů ve FN Brno



Protiargument

- Pacient v urgentní situaci obvykle potřebuje kromě trombocytů i transfuzi plazmy.
- Rekonstituce trombocytů pomocí plazmy je variantou 2 v 1.



➤ *K rekonstituci trombocytů používáme náhradní roztok.*

- **Použití plazmy prodlouží rekonstituci kryokonzervovaných destiček o 20 minut!**
- Přítomnost plazmy v TP je jednou z nejčastějších příčin komplikací transfuze.
- V situacích, kde je to možné, mají přednost koncentráty koagulačních faktorů.

Lozano M, Cid J. Recent advances in platelet processing and storage. ISBT Science series 2016; 11(Suppl. 1): 34-38

Gulliksson H. Platelet storage media. Vox Sang 2014; 107: 205-2012

The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition (2016)

Mražení

Johnson LN, Winter KM, Reid S, Hartkopf-Theis T, Marks DC. Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxid and platelet additive solution, Cryobiology 2011,62, 100-106

Ke kryokonzervaci jsou používány **směsné deleukotizované trombocyty krevní skupiny 0**.

1. Do kryovaku s odebranými trombocyty je kryoprotektivní látka - **30 % DMSO** je 5 %).



2. Obsah kryovaku je centrifugován při **2522 ot./min.** supernatant následně oddělen pomocí manuálního lisu.



3. Suspenze trombocytů o objemu cca 25 ml je v hliníkových kazetách při **-80°C** a ch obalů.



Rekonstituce

K rekonstituci je používán náhradní roztok **SSP+** a její délka **nepřesahuje 5 minut.**

1. rozmražení obsahu kryovaku v rozmrazovací vodní lázni temperované na teplotu $+37^{\circ}\text{C}$
2. přidání náhradního roztoku SSP+ (cca 200 ml) za jemného mnutí



Výhody

- dlouhá doba použitelnosti
- rychlá rekonstituce
- vyšší prokoagulační aktivita ve srovnání s nativními produkty
- zanedbatelný obsah reziduální plazmy – kvalitativně splněno kritérium promytých trombocytů (selektivní IgA deficit, alergie)

***KRYOKONZERVACE TROMBOCYTŮ:
VÝSLEDKY SROVNÁVACÍ STUDIE “IN VITRO”
(2018 – 2019)***

Povinné parametry kvality

Parametr	Trombocyty nativní N=12		Trombocyty kryokonzervované N=12	
	průměr	SD	průměr	SD
Objem (ml)	266	16,05	266	15,93
Obsah trombocytů (x10 ⁹ / jednotku)	248	38,26	194	20,29
Koncentrace trombocytů (x10 ⁹ / ml)	0,93	0,12	0,73	0,08
Ztráta PLT k původnímu produktu (%)	---	---	24	11,71
pH (korekce na +22°C)	7,13	0,06	7,14	0,12
Víření trombocytů	ano +++		ano +/ ++	

Obsah DMSO a reziduální plazmy

Trombocyty kryokonzervované po rekonstituci , N= 12		
Parametr	průměr	SD
Koncentrace DMSO (%)	0,50	0,07
Obsah plazmy (%)	3,22	1,73

Imunohematologické vyšetření: titry anti-A, anti-B (IgM)

Trombocyty nativní, N=14

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Anti-A	8	4	8	4	8	16	8	4	4	4	8	16	8	4
Anti-B	4	4	4	2	8	4	16	4	4	4	8	8	4	2

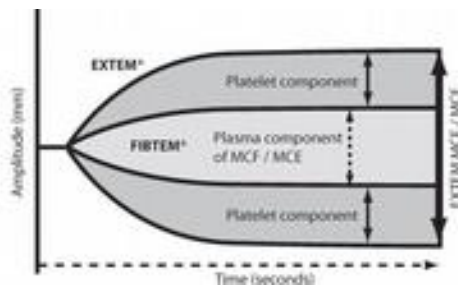
Trombocyty kryokonzervované, N=14

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Anti-A	2	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0
Anti-B	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0

Tromboelastometrie - ROTEM®

Trombocyty nativní, N=10			
	Plazma + trombocyty		
	CT s	MCF mm	Aktivita PLT
Průměr	68,1	59,4	54,7
Trombocyty kryokonzervované , N=10			
Průměr	52,4	40,9	36,4

aktivita PLT = A10 EXTEM – A10 FIBTEM





Co jsou mikrotrombocyty?

- heterogenní populace malých fragmentů, které vznikají při manipulaci s destičkami
- **velikost 100-1000 nm** (vs. trombocyt 2-4 μm)
- exprese specifických znaků CD41, CD42b, CD61 a fosfatidylserinu (marker apoptózy)
- **aktivní role v procesu koagulace**, zánětu, aterosklerózy, kancerogeneze, vliv na funkci cév
- **50-100x vyšší prokoagulační aktivita** ve srovnání s trombocyty

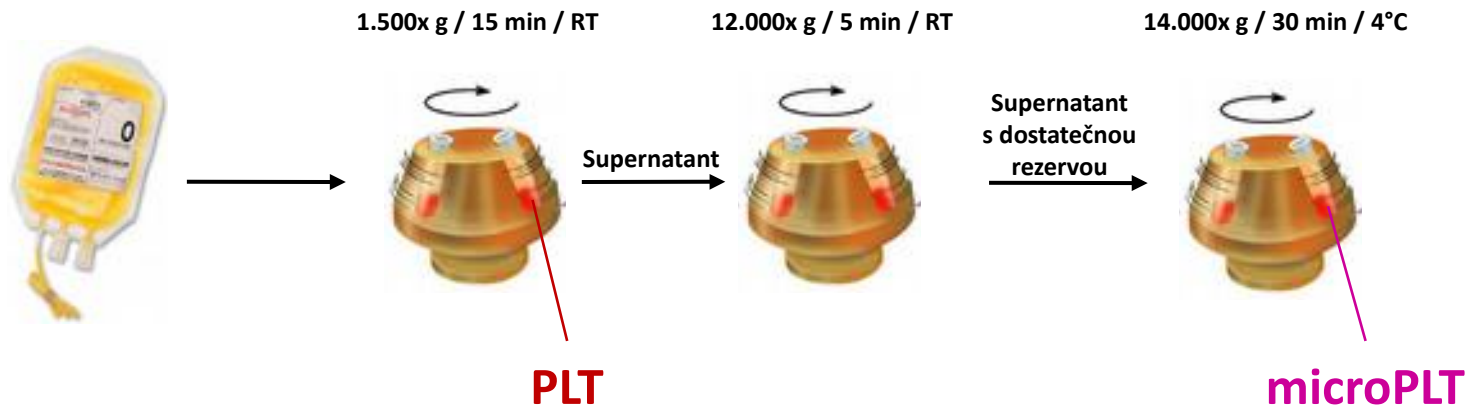
Johnson L, Raynel S, Seghatchian J, Marks DC. Platelet microparticles in cryopreserved platelets: Potential mediators of haemostasis. *Transfusion and Apheresis Science* 53 ; 2015, 146-152

Mikrotrombocyty v kryotrombocytech

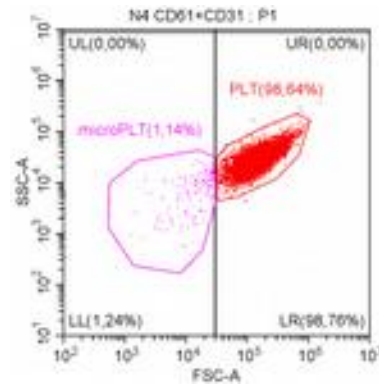
- Kryotrombocyty obsahují signifikantně více mikropartikulí než nativní trombocyty (přibližně 10 x).

- Kryotrombocyty vedou k rychlejší tvorbě trombinu.

- Obava z vyššího trombogenního rizika – předmětem výzkumu, zatím bez závěru.

Johnson L, Raynel S, Seghatchian J, Marks DC. Platelet microparticles in cryopreserved platelets: Potential mediators of haemostasis, Transfusion and Apheresis Science 53 ; 2015, 146-152

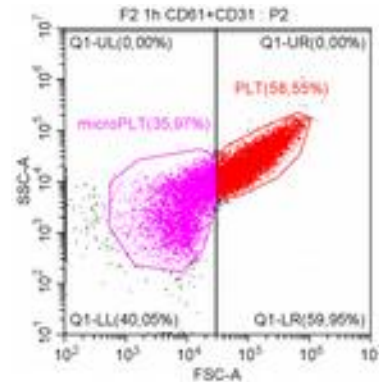
Johnson L, Reade MC, Hyland RA, Tan S, Marks DC. In vitro comparison of cryopreserved and liquid platelets: potential clinical implications. Transfusion 2015 55:838-47



**Nativní
trombocyty**



**Kryokonzervované
trombocyty**



Shrnutí výsledků studie

- **Splňují předepsané parametry kvality** pro nativní produkty.
- **Nízký obsah DMSO** umožňuje přímé použití bez nutnosti jeho časově náročného odmývání.
- **Nízký obsah reziduální plazmy** umožňuje použití v indikacích pro promyté trombocyty.
- **Nízký obsah přirozených protilátek** garantuje univerzálnost použití trombocytů krevní skupiny 0.
- **Rychlejší tvorba koagula** byla ověřena tromboelastometrickým měřením (ROTEM).
- Byl prokázán **zvýšený obsah mikrotrombocytů (FC)**, které mají schopnost účastnit se primární hemostázy.

Indikace

- **Urgentní medicína**
- **Transplantační medicína**
- Těžké alergické reakce a selektivní IgA deficit
- HLA specifické trombocyty
- Autologní trombocyty

Perspektiva

- Kryokonzervace umožní skladovat trombocyty nemocnicím, které mají malou spotřebu a jsou závislé na akutním dovozu.
- Předpokladem je vybavení mrazícím boxem na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Objem 60 litrů



Závěr

- *Kryokonzervace a rekonstituce trombocytů představuje bezpečný způsob zvýšení jejich dostupnosti.*
- *Vyšší prokoagulační aktivita nabízí využití zejména v urgentních stavech.*
- *Díky kryokonzervaci se zvýšil zájem o studium mikrotrombocytů, které mají významnou roli v primární hemostáze.*

Poděkování

- *doc. RNDr. Ireně Koutné, Ph.D (ICRC FNUSA)*
- *Mgr. Ivě Tesařové, Ph.D (ICRC FNUSA)*
- *Prim. MUDr. Martinovi Dolečkovi, Ph.D (OÚP KARIM FN Brno)*
- *Prim. MUDr. Igoru Sasovi (KARIM FN Brno) a kolektivu ORIM IV*

Děkuji za pozornost.

