

Trombocyty v transfúznej medicíne: kvalitatívna analýza kryotrombocytov

Nemocnica Sv. Lukáša Galanta, a.s.
Hematologicko-transfúziologické oddelenie

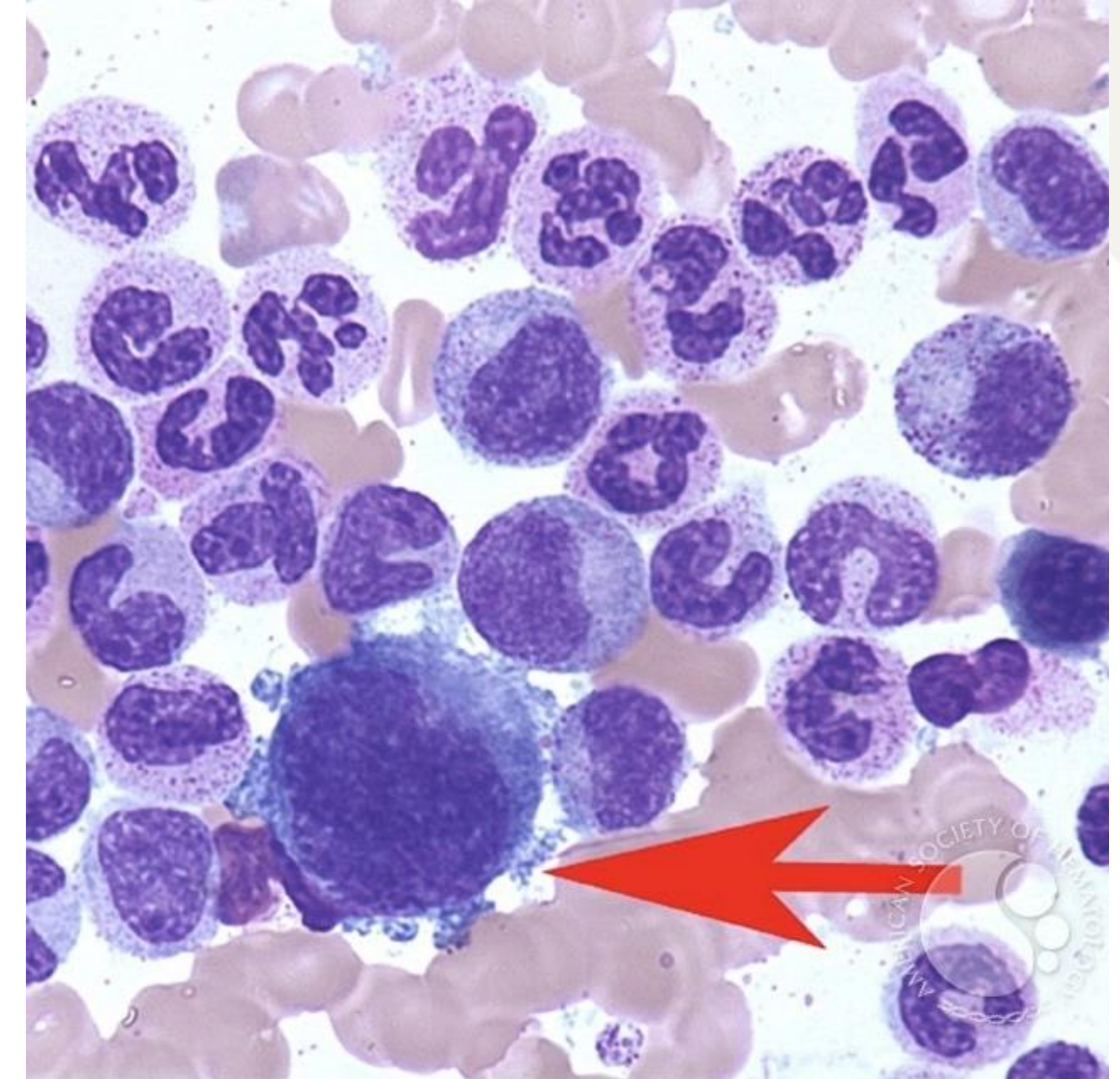
Bc. Matúš Brosch



Trombocyty

Trombocyty a trombopoéza

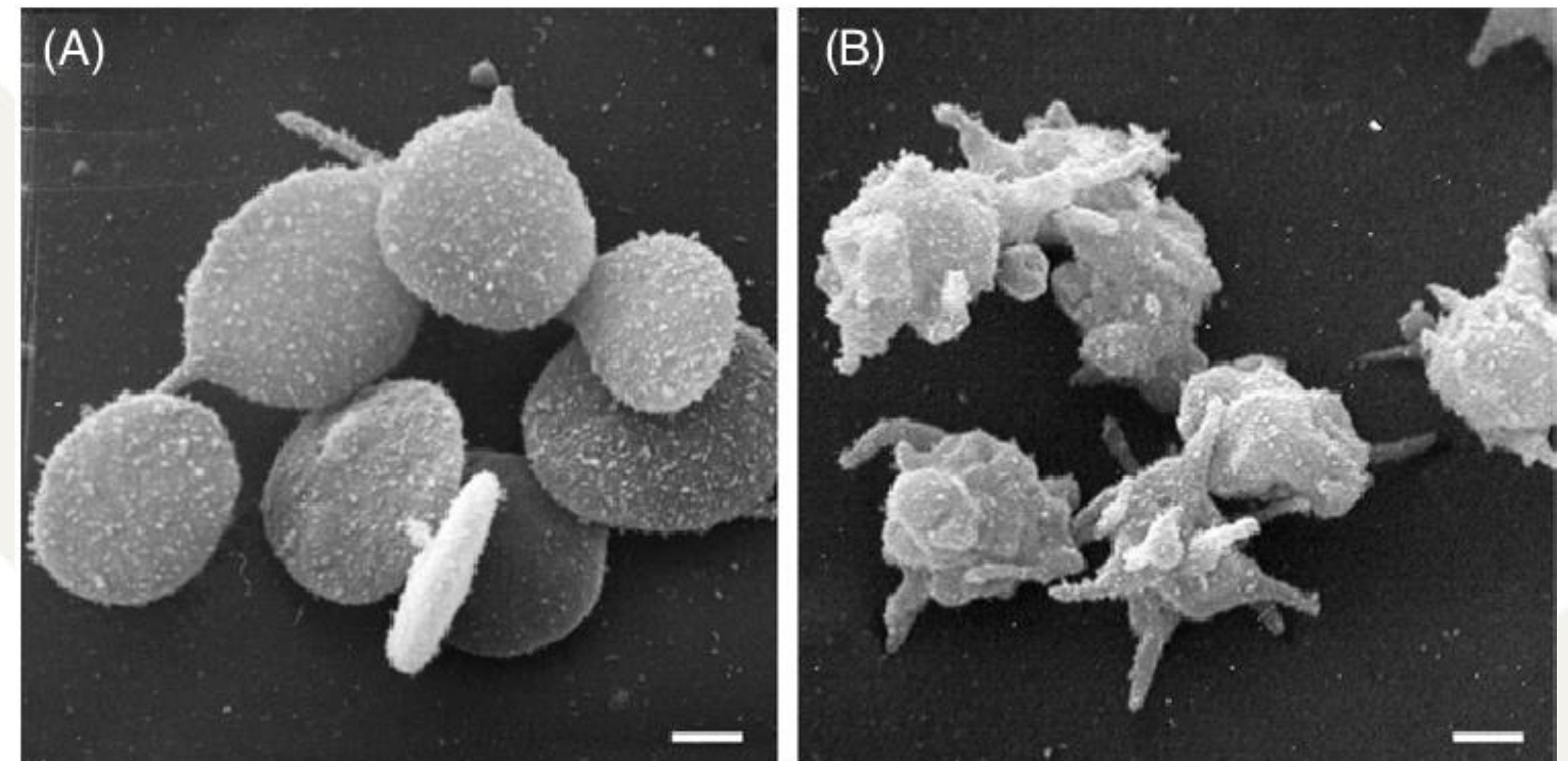
- Malé **anukleárne diskovité** krvné elementy (2 až 3 μm).
- Životnosť → **7 až 10 dní** v periférnej krvi.
- Referenčné hodnoty:
 - Dospelý → **150 až 350 $\times 10^9/\text{l}$** .
 - Dieťa → **130 až 440 $\times 10^9/\text{l}$** .
- Trombopoéza → v **kostnej dreni** a v **pľúcach** (50%).
- **Megakaryocyty** → **proplatelety** → **trombocyty** v krvnom obehu.
- Regulovaná: **TPO**, IL-6, IL-11, GATA-1, RUNX1.



Maturácia trombocytov.

Štruktúra a morfológia trombocytov

- **Lipidová membrána** s povrchovými **receptormi** (GPIb, GPVI, $\alpha\text{IIb}\beta 3$).
- **OCS** → otvorený kanálový systém.
- **DTS** → hustý tubulárny systém.
- **α -granuly**: fibrinogén, vWF, PDGF, VEGF.
- **δ -granuly**: ADP, ATP, serotonin, Ca^{2+} .
- **Lyzozómy**: enzýmy, proteázy.
- Neaktivované trombocyty → **diskovitý tvar**.
- Aktivované trombocyty → **guľovitý tvar, pseudopódiá**.



Neaktivované trombocyty.

Aktivované trombocyty.

Funkcie trombocytov

Primárna hemostáza

1. **Adhézia** → priľnutie na poškodený endotel cez **vWF**.
2. **Aktivácia** → zmena tvaru, uvoľnenie obsahu granúl.
3. **Agregácia** → spojenie cez **$\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$** .

Imunitná odpoveď

- TLR2, TLR4, Fc receptory.
- Detekcia **patogénov**, aktivácia **leukocytov**.
- Uvoľnenie **cytokínov** a mikročastíc.

Regenerácia tkanív

- Rastové faktory VEGF, PDGF, TGF- β .
- Podpora **hojenia** a **angiogenézy**.
- Klinické využitie → **PRP**.

Trombocytové přípravky

Charakteristika a typy prípravkov

- Transfúzne prípravky s obsahom **trombocytov** → pri **krvácaní** a **trombocytopénii**.
- **Klasifikácia** → spôsobu odberu, uskladnenia, modifikácií a pod.:
 1. **Poolované trombocyty,**
 2. **Aferetické trombocyty,**
 3. **Kryokonzervované trombocyty.**
- Rôzne **modifikácie** → úpravy podľa **špecifických potrieb** pacienta.

Poolované prípravky

- Získané z **viacerých** jednotiek.
- Výroba z plnej krvi pomocou **buffy coat** alebo **PRP metódy** → spájanie **4 až 6** jednotiek.
- Trvanlivosť **5 až 7 dní** pri **20 až 24°C**.
- Indikácia → **štandardé** podávanie.
- Výhody → jednoduchšia **príprava** a široká **dostupnosť**.
- Nevýhody → vyššia **antigénová diverzita**.



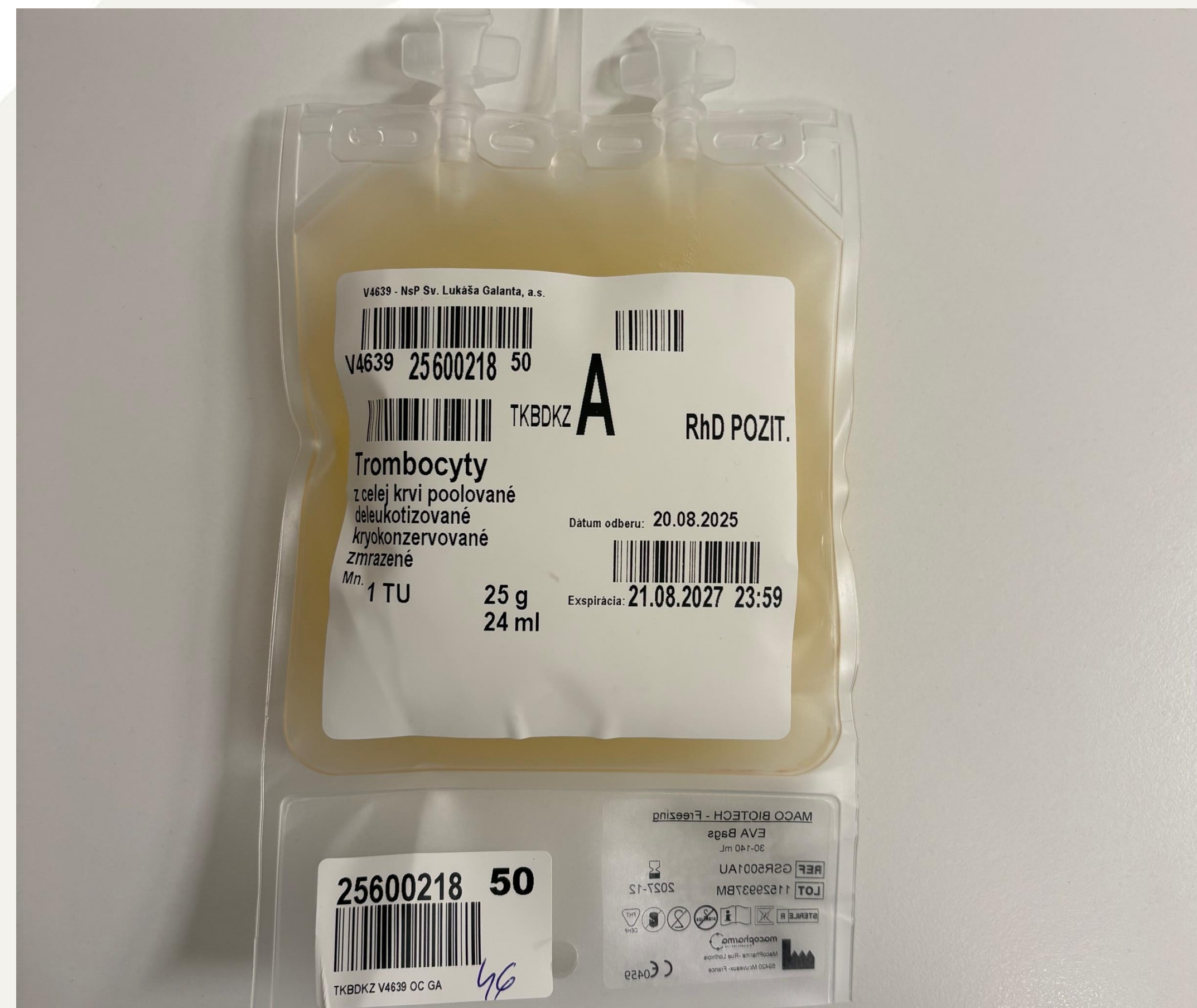
Aferetické prípravky



- Získané **priamym odberom** od jedného darcu → **separačný prístroj**.
- Trvanlivosť **5 až 7 dní** pri **20 až 24°C**.
- Indikácia → **refraktérni a imunokompromitovaní** pacienti.
- Výhody → nižšia **antigénová diverzita** a možnosť **HLA/HPA compatibility**.
- Nevýhody → dlhší **odberový čas** a vyššie **finančné a personálne náklady**.

Kryokonzervované prípravky

- Výroba z **aferetických** alebo **poolovaných** jednotiek.
- Uchovávanie pri **-80°C 2 roky** → kryoprotektant **DMSO**.
- Indikácia → **vojna, odľahlé oblasti, urgentné situácie**.
- Výhody → dlhšia **trvanlivosť** a **dostupnosť** v extrémnych podmienkach.
- Nevýhody → **morfologické** a **funkčné zmeny**, kratšia **životnosť** po rozmrazení, technicky náročné **spracovanie**.

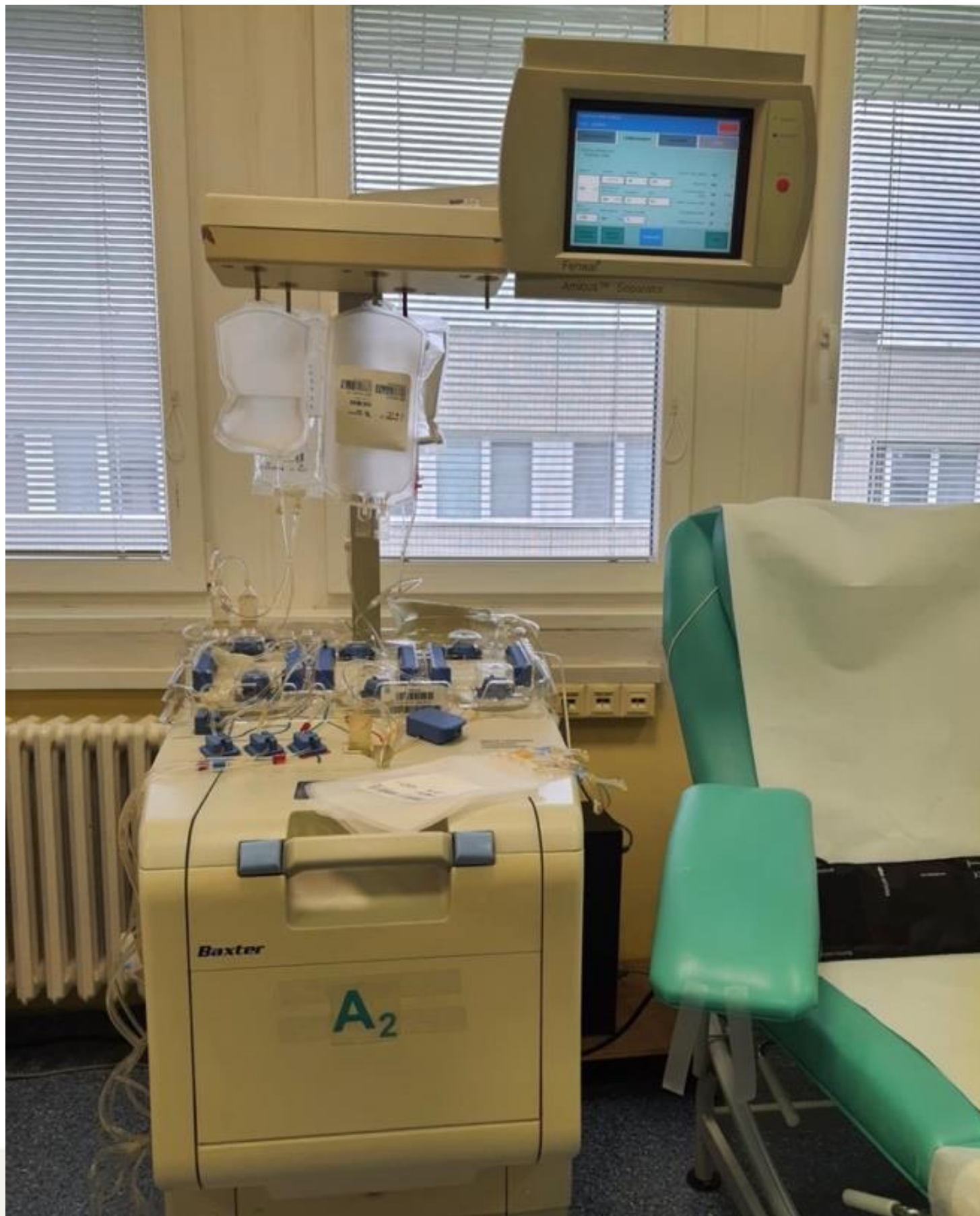


Indikácie podávania

Situácia	Indikácia	Hodnota PLT
Život ohrozujúce krvácanie	Terapeutická	< 75 až 100
Závažné krvácanie	Terapeutická	30 až 75
Mierne krvácanie	Terapeutická	< 30
Útlm kostnej drene	Profylaktická	< 5 až 10
Rizikové faktory	Profylaktická	> 20
Menšie chirurgické výkony	Profylaktická	< 20
Väčšie chirurgické výkony	Profylaktická	< 50
Oftalmo. a kardio. výkony	Profylaktická	80 až 100

Výrobný proces

Spôsoby odberu



Aferetický separátor.

Odber plnej krvi

- **Manuálny** odber v objeme **450 ml** plnej krvi.
- Antikoagulant → **CPD** (citrát-fosfát-dextróza).
- Odber trvá **5 až 15 minút**.

Aferetický odber

- **Automatizovaný** odber pomocou separátora v objeme **200 až 300 ml**.
- Antikoagulant → **ACD-A** (kyselina citrónová, citrát, dextróza, typ A).
- Odber trvá **60 až 90 minút**.

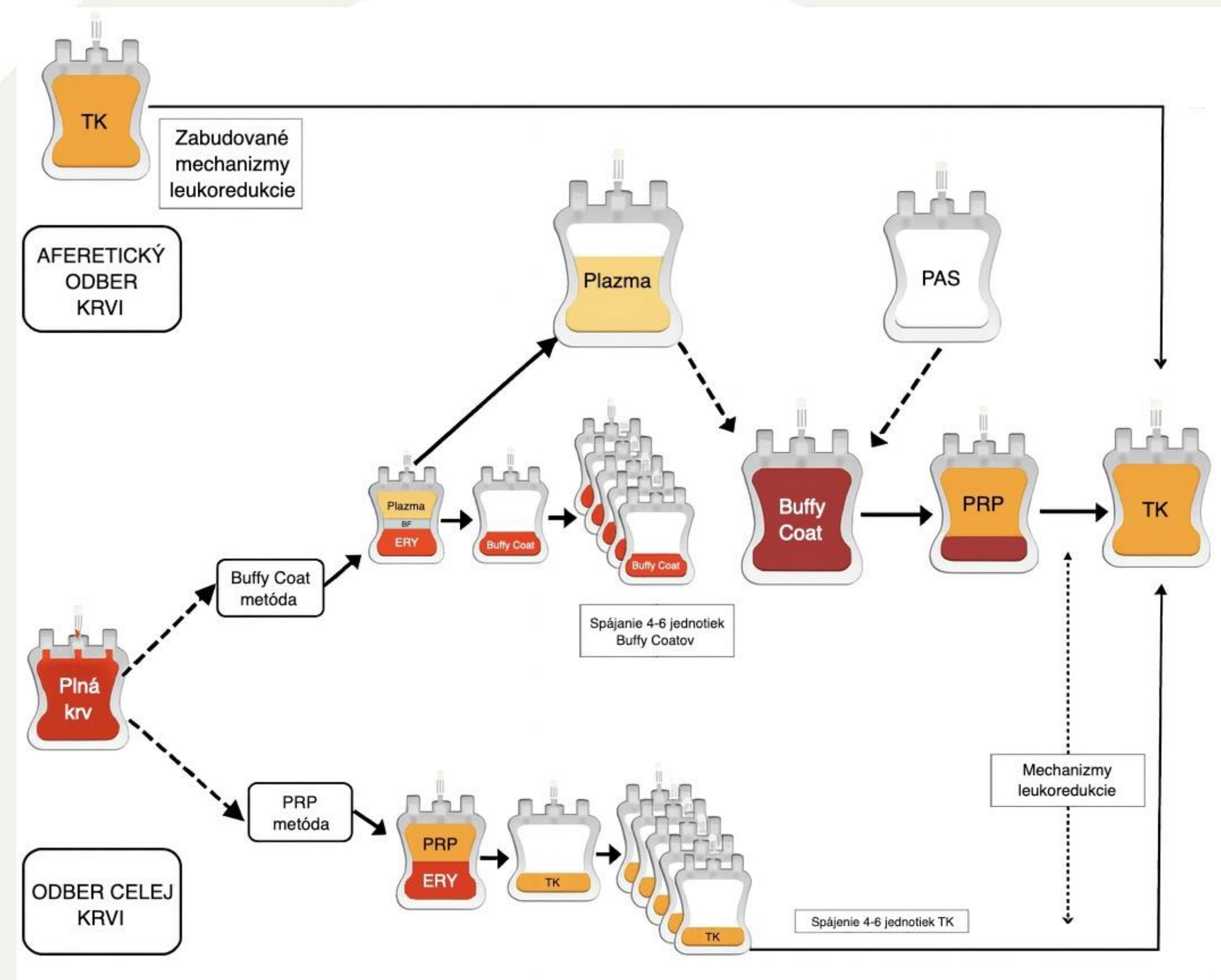
Spôsoby spracovania

Buffy coat metóda

1. **Vysokootáčková centrifugácia** → erytrocyty, plazmu, *buffy coat* (80% PLT a 60% WBC).
2. **Separácia** jednotlivých zložiek → *top-bottom* systém.
3. **Poolovanie** 4 až 6 jednotiek *buffy coat* → resuspenzácia v PAS roztoku.
4. **Nízkokotáčková centrifugácia** *buffy coat*.
5. **Separácia** trombocytov.

Aferetický odber

- Krv prechádza cyklami **centrifugácie** a **separácie**.
- **Resuspenzácia** v roztoku PAS.



Spôsoby spracovania

Poolovanie *buffy coat*ov.



Centrifugácia.



Separácia trombocytov.



Kritériá kvality

Parameter	Trombocyty deleukotizované kryokonzervované
Objem	50 až 200 ml
Hodnota PLT	> 50% z pôvodného počtu trombocytov pred zmrazením
Sterilita	Sterilné

Kryokonzervácia

Proces kryokonzervácie

- Proces zahŕňa **prípravu** trombokoncentrátu, rýchle **zmrazenie** a **skladovanie** pri **-80°C**.
- **DMSO 6 až 7%** → **ochrana** trombocytov pred poškodením.
- **Dodáva sa 100% roztok DMSO** v sterilných striekačkách, ktorý **riedime** s **roztokom SSP+** na **30% roztok DMSO**.
- Špeciálne vaky → **kryovaky** z EVA (etylén-vinylacetát) **odolné voči nízkym teplotám**.

- Do kryovaku **navážime** potrebné množstvo zriedeného **roztoku DMSO**. Pomocou sterilnej zväračky **pridáme** celý objem do **jednotky trombocytov**.



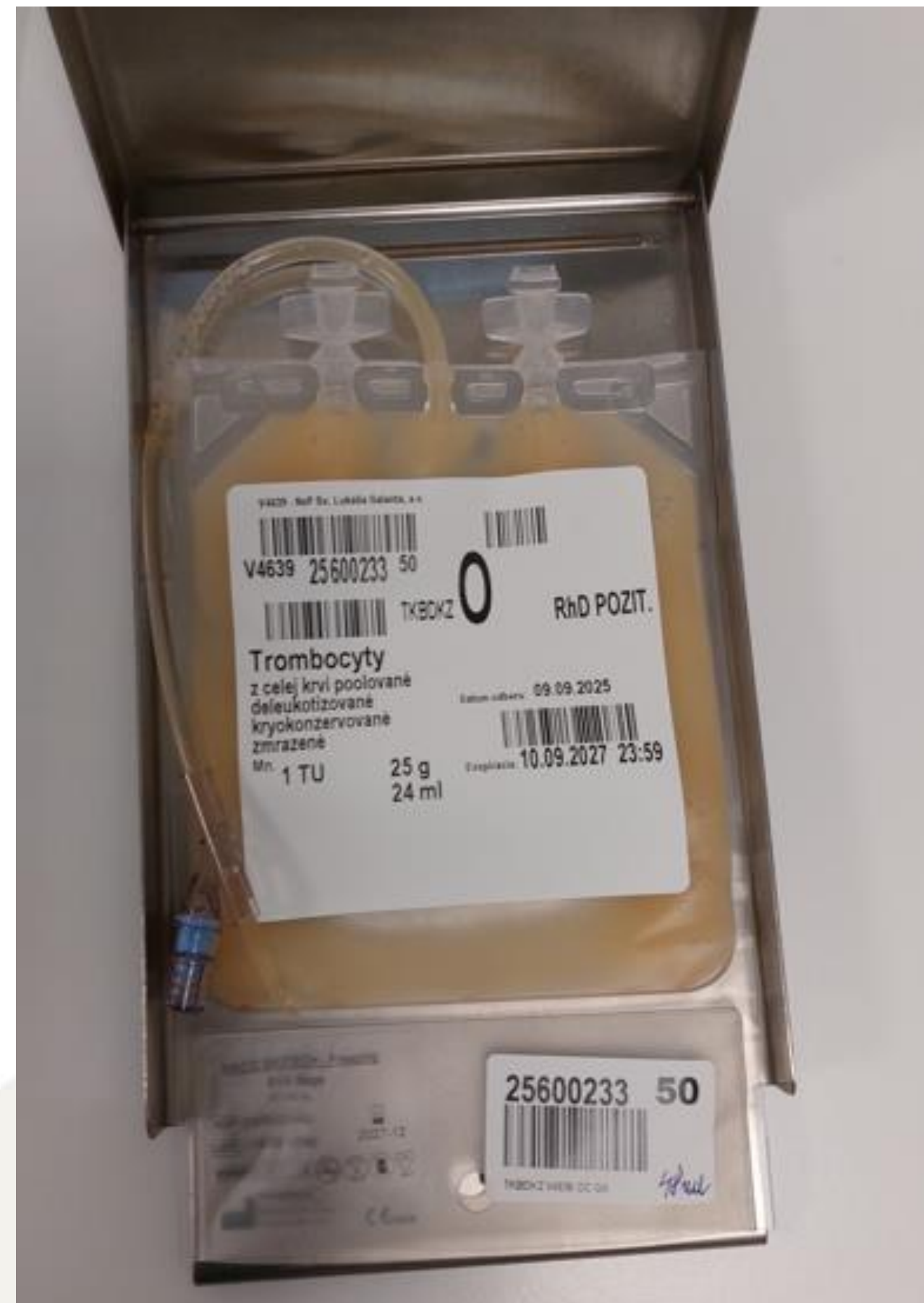
- Opatrne vložíme do kyviet a centrifugujeme.



- Po centrifugácii pomocou ručného lisu **separujeme supernatant** do pôvodného vaku. V kryovaku nám **zostane suspenzia trombocytov** o objeme cca **25 ml**.



- Vložíme do kyvety a **mrazíme** pri **-80°C**. Na druhý deň vyberieme z kyvety a **vložíme** do označenej bublinkovej obálky.



Rozmrazenie a dôsledky kryokonzervácie

- **Rozmrazenie** pri izbovej teplote alebo v špecializovaných zariadeniach → Sahara.
- **Resuspenzácia** v roztoku PAS, **regenerácia** pri 22°C → **použitie do 6 hodín**.
- Typické zmeny → **zníženie exprese** povrchových **receptorov**, **aktivácia** trombocytov, **uvolňovanie** obsahu **granúl**, **cytokínov** a pod.
- Napriek zmenám → **zachovaný hemostatický účinok** v akútnych stavoch (meléna, hemateméza, DIC).
- *In vitro* štúdie → **rýchlejšia tvorba trombínu** a **stabilnejšie koagulá**.

Hodnotenie kvality kryokonzervovaných trombocytov

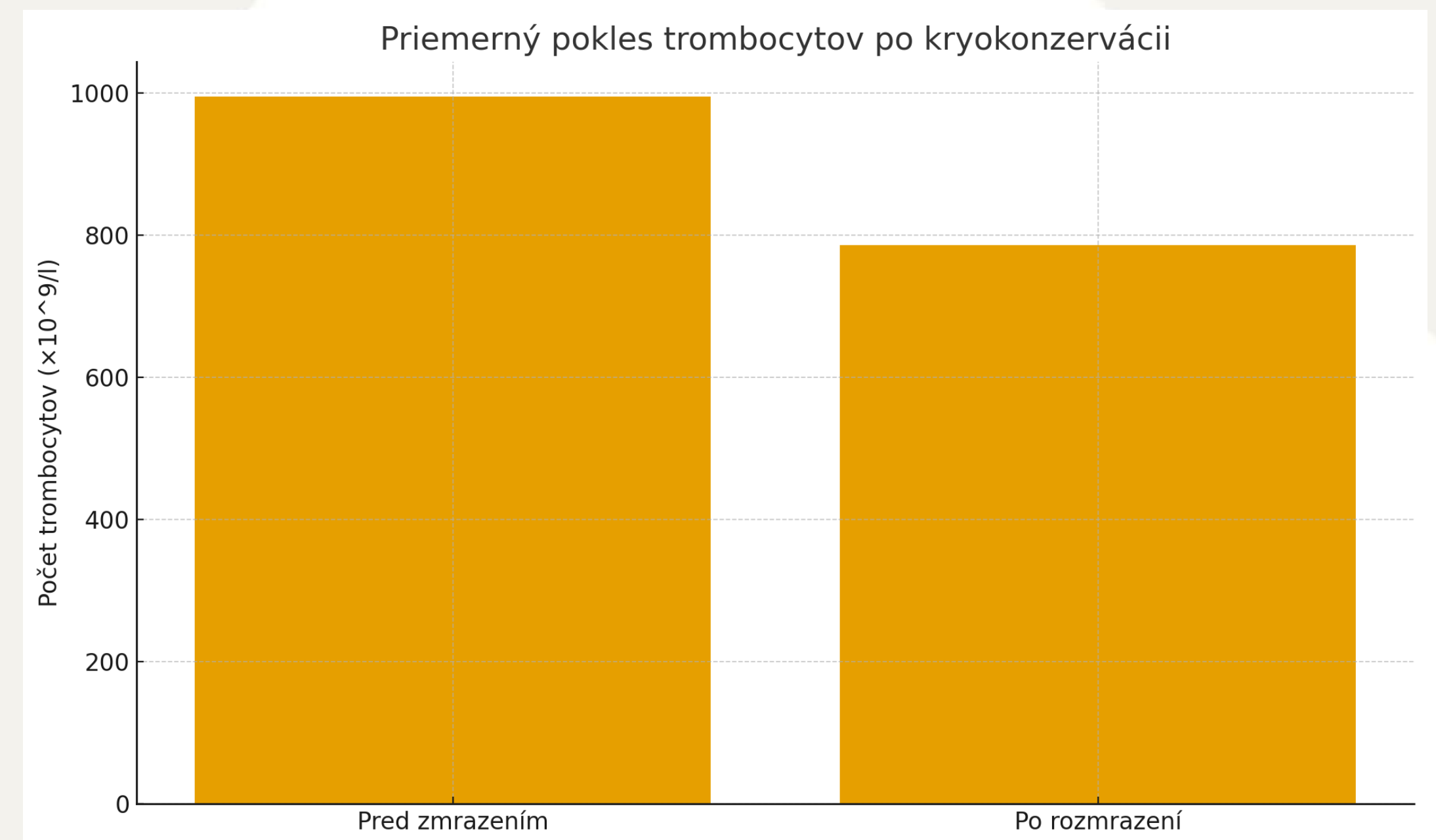
Ciele a metodika

- Zhodnotiť **PLT pred a po kryokonzervácii**.
- Sledovať hodnotu **PLT počas 6 hodín** po rozmrazení.
- Vyhodnotiť **pH a sterilitu po uplynutí 6 hodín** po rozmrazení.

- **3 jednotky** z *poolu* → priemery.
- Merania → **pred zmrazením a po rozmrazení**, v jednotlivých **časových intervaloch**.
- Sledované parametre: **PLT, pH, sterilita**.
- Použité zariadenia → **hematologický a biochemický analyzátor, kultivácia**.

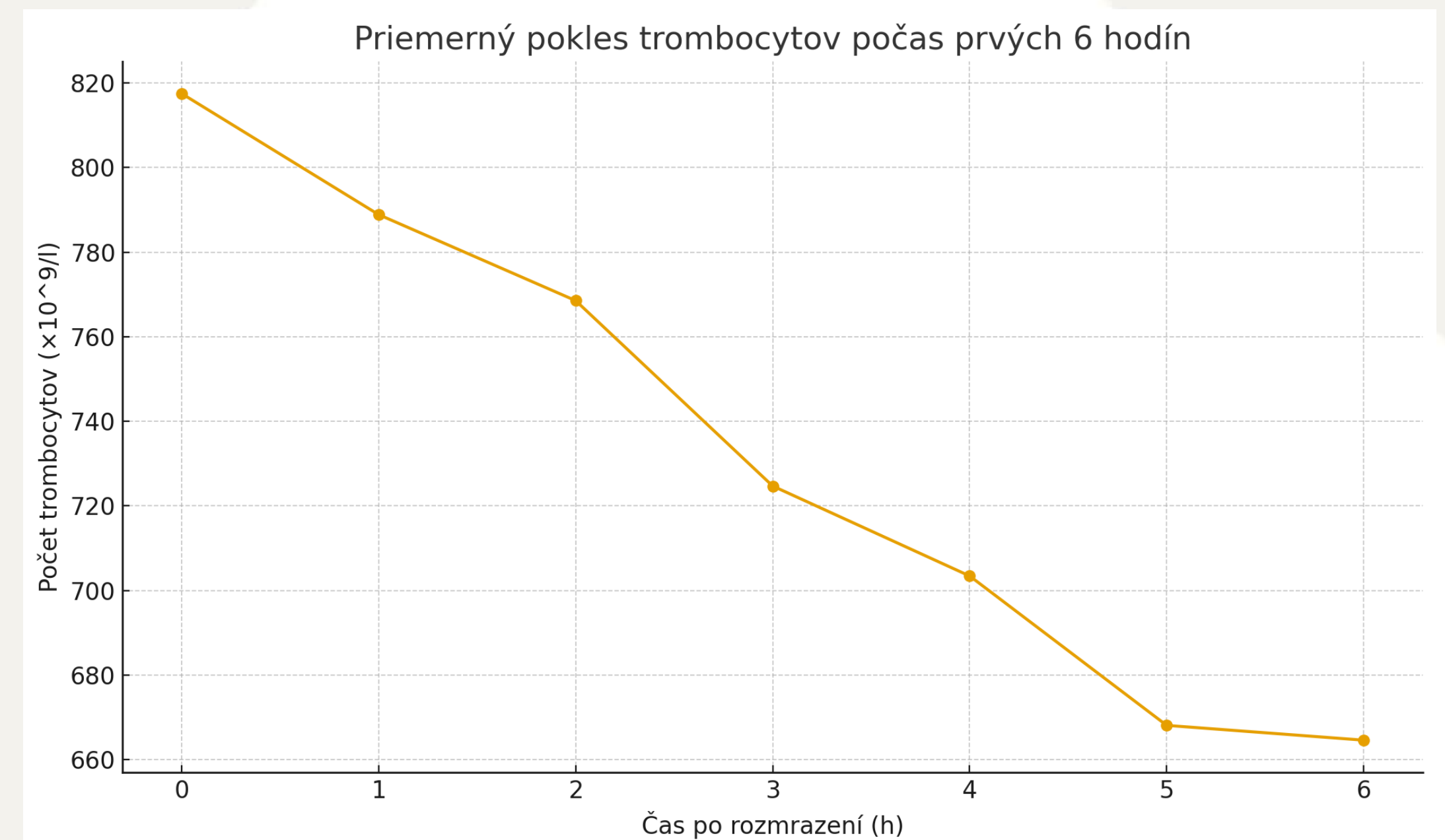
PLT pred a po kryokonzervácii

- Priemer pred zmrazením → **$995 \times 10^9/\text{L}$** .
- Priemer po rozmrazení → **$786 \times 10^9/\text{L}$** .
- Absolútny pokles → **$210 \times 10^9/\text{L}$** .
- Relatívny pokles → **21%**.
- Interpretácia → kryokonzervácia spôsobí **pokles hodnoty PLT** približne o **21% z pôvodnej hodnoty PLT**.



PLT počas šiestich hodín po rozmrazení

- Priemer 0 hod. → **$818 \times 10^9/\text{l}$** .
- Priemer 6 hod. → **$665 \times 10^9/\text{l}$** .
- Celkový pokles → **18 až 20%**.
- Postupný pokles → **3%/hod.**
- Interpretácia → po rozmrazení **hodnota PLT klesá** približne o **3% každú hodinu**.



pH a sterilita po šiestich hodinách

- Priemer pH → **7,15**.
- Interpretácia → **pH zostáva stabilné** v akceptovateľnom rozmedzí $\geq 6,4$.
- Sterilita po rozmrazení → všetky jednotky **negatívne**.
- Interpretácia → **sterilita zachovaná**.

Záver hodnotenia

Kryokonzervácia → **pokles hodnoty PLT o 21%.**



Po rozmrazení → **ďalší pokles hodnoty PLT o 3%/hod.**



pH stabilné, sterilita zachovaná po 6 hodinách.



Odporúčanie → podať kryokonzervované trombocyty čo najskôr po rozmrazení!

Ďakujem za pozornosť