ÚVN
MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

16. Střešovický transfuzní den ÚVN Praha

Kryokonzervované erytrocyty ošetřené PRT před zmražením

pplk. MUDr. Dominik Kutáč, Ph.D.
Oddělení hematologie a krevní transfuze ÚVN Praha

Disclosure

Žádné relevantní finanční nebo jiné vztahy k zveřejnění

Tento výzkum byl podpořen US Army pro sety, nastavení a zaškolení US DoD Grat W81XWH-12-0135

Úvod

Při náhle vzniklé potřebě krve je žádoucí mít zásobu erytrocytárních jednotek (RBC) krevní skupiny O a také jednotek s antigeny s nízkou, respektive vysokou frekvencí výskytu, které by měly být k dispozici okamžitě.

Tuto potřebu lze uspokojit vybudováním zásob kryokonzervovaných erytrocytů (CRBC).

S nově se objevujícími infekčními hrozbami představuje redukce patogenů další úroveň bezpečnosti v civilní a vojenské transfuzní medicíně.

Cryopreservation of human blood products. C. Robert Valeri, Gina Ragno. Transfusion and Apheresis Science 34 (2006) 271–287
In vitro parameters of cryopreserved leucodepleted and non-leucodepleted red blood cells collected by apheresis or from whole blood and stored in AS-3 for 21 days after thawing. Bohonek M.,Petras M., Turek I., Urbanova J., Hradek T., Staroprazska V., Kostirova J., Horcickova J., Duchkova S.
Blood Transfus. 2014 Jan;12 Suppl 1:s199-203. doi: 10.2450/2013.0106-12. Epub 2013 Feb 6.

Hypotéza

Patogen redukční technologie (PRT) jsou úspěšně používány k ošetření plazmy, čerstvých destiček a čerstvé plné krve (WB).

PRT mohou být úspěšně použity k ošetření transfuzních přípravků před jejich kryokonzervací.

Dle naší teorie CRBC vyrobené z PRT ošetřené WB by mohly být bezpečné ke klinickému užití…

Component pathogen inactivation: a critical review. C. V. Prowse. Vox Sanguinis (2013) 104, 183–199

Nynější stav

Bylo publikováno mnoho studií pro hodnocení parametrů kvality CRBC

Ale žádná studie dosud nezkoumala dopad moderní PRT na CRBC

Cíl

- srovnání in vitro kvalitativních parametrů mezi PRT ošetřenými a neošetřenými **kryokonzervovanými erytrocyty**, vyrobernými z PRT ošetřených nebo neošetřených čerstvých plných krví (WB).

Mirasol® Pathogen Reduction Technology System

- Systém, který užívá Riboflavin (vitamín B2), přírodně se vyskytující substanci, a UV světlo k vyvolání poškození nukleových kyselin, které obsahují patogeny.
- Mirasol je jednoduchá metoda, která může být použita k ošetření čerstvé plné krve, trombocytů a plazmy.
- Způsobuje efektivní patogenredukci a současně i inaktivaci leukocytů, stejně efektivně jako gamma ozáření.
- Jednoduchá a bezpečná technologie.

Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light.
Marschner S, Goodrich R. Transfus Med Hemother. 2011;38(1):8-18. Epub 2011 Jan 31.

Metodika - RBC

WB
(43 TU, nepárovány)

PRT

Post-PRT ošetření WB zpracována na **RBC** 23 TU
- PRT- ošetřeny – **T-CRBC** (Mirasol, Terumo BCT)
- in-line deleukotizovány před zamražením
- zamraženy v 40% glycerolu při -80°C, alespoň 120 dní
- promyty a rekonstituovány v Nutricelu (AS-3)

WB zpracována na **RBC** 20 TU
- PRT- neošetřeny – **C-CRBC**
- in-line deleukotizovány před zamražením
- zamraženy v 40% glycerolu při -80°C, alespoň 120 dní
- promyty a rekonstituovány v Nutricelu (AS-3)

Den 0 T-WB (plná krev před PRT), den 0 T-PRWB (plná krev po PRT) a po rozmražení (T-CRBC vs C-CRBC) den 0, 7, 14 a 21 měřeny následující parametry:

Leukocyty, hematokrit, objem, HB/TU, pH,% hemolýzy, hemoglobin (HB) v supernatantu, K, P, NH3, osmolalita, ATP a 2,3-difosfoglycerát.

Výsledky T-CRBC vs C-CRBC

Tabulka 1. Laboratorní hodnocení PRT neošetřených a ošetřených kryokonzervovaných erytrocytů: testovaná plná krev před patogen redukcí (T-WB) a kontrolní kryokonzervované erytrocyty po rozmražení (C-CRBC); testovaná PRT ošetřená plná krev (T-PRWB) a PRT ošetřené kryokonzervované erytrocyty po rozmrazení (T-CRBC).

Druh RBC →	Po odběru	Po PRT	Po rekonstituci D0		Po rekonstituci D7		Po rekonstituci D14		Po rekonstituci D21	
Testy ↓	T-WB	T-PRWB	C-CRBC	T-CRBC	C-CRBC	T-CRBC	C-CRBC	T-CRBC	C-CRBC	T-CRBC
Le (10^9/l)	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0.±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0	0±0.0
HCT (%)	38.5±2.2	35.9±1.9	43.3±3.5*	50.7±5.1*	41.9±2.7†	49.8±2.6†	42.8±2.9‡	51.7±2.5‡	43±3¶	53.6±2.5¶
Objem (ml)	487.9±23.5	498.8±23.3	288±7.4	291±8	288±7.4	291±8.2	288±7.4	291±8.2	288±7.4	289±8.2
Hb/TU (g/TU)	63.6±4.2	60.6±3.7	38.8±3.8*	45.3±2.6*	37.3±3.3†	45.5±2.4†	37.3±3.4‡	45.2±2.5‡	37.2±3.3¶	45.1±2.6¶
Hemolýza (%)	_	_	0.2±0.1	0.2±0.1	0.4±0.1	0.5±0.2	0.6±0.2	0.8±0.4	0.8±0.2	0.9±0.3
Recovery (%)	_	_	61.6±3.9*	71.2±3.8*	_	_	_	_	_	_
Hb v supernat. (g/TU)	_	_	0.1±0.1	0.1±0.5	_	_	_	_	_	_

Hodnoty jsou uvedeny jako střední hodnoty ± SD z n = 20 (C-WB, C-CRBCs) a n = 23 (T-WB, T-CRBCs), hodnoty p byly vypočteny pomocí metody Mann-Whitney k srovnání C-CRBC a T-CRBC, Signifikantní rozdíl mezi dvěmi porovnávanými skupinami ($p < 0,05$) označen * (0. den), † (7. den), ‡ (14. den), ¶ (21. den)

Poznámka: Po odběru = ihned po odběru, Po PRT = ihned po PRT, Po rekonstituci = po rozmrazení ihned v den (0, 7, 14 a 21)
T-WB = PRT neošetřená kontrolní čerstvá plná krev, T-PRWB = PRT ošetřená čerstvá plná krev, C-CRBCs = PRT neošetřené kontrolní kryokonzervované erytrocyty, T-CRBC = PRT ošetřené kryokonzervované erytrocyty

Výsledky T-CRBC vs C-CRBC

Tabulka 2. Laboratorní hodnocení PRT neošetřených a ošetřených kryokonzervovaných erytrocytů: testovaná plná krev před patogen redukcí (T-WB) a kontrolní kryokonzervované erytrocyty po rozmražení (C-CRBC); testovaná PRT ošetřená plná krev (T-PRWB) a PRT ošetřené kryokonzervované erytrocyty po rozmrazení (T-CRBC).

Druh RBC →	Po odběru	Po PRT	Po rekonstituci D0		Po rekonstituci D7		Po rekonstituci D14		Po rekonstituci D21	
Testy ↓	T-WB	T-PRWB	C-CRBC	T-CRBC	C-CRBC	T-CRBC	C-CRBC	T-CRBC	C-CRBC	T-CRBC
pH	7.25±0.1	7.3±0.1	6.6±0.1*	6.4±0.1*	6.5±0.1†	6.4±0.1†	6.5±0.1‡	6.4±0.0‡	6.43±0.1¶	6.3±0.0¶
K (mmol/l)	3.5±0.2	3.4±0.2	0.7±0.1*	0.9±0.2*	12.5±2.1†	40.7±3.8†	18.2±3‡	50.7±4.8‡	21.9±3.3¶	54.4±4.7¶
P (mmolo/l)	3.6±0.3	3.1±0.2	12.1±2.1*	14.4±0.1*	11.3±0.4†	11.7±0.3†	11.5±0.4‡	11.9±0.3‡	11.3±0.4¶	12.4±0.3¶
NH3 (umol/l)	42.5±13.8	77.1±16.6	11.1±2.6	13.9±4.7	93±10.6†	164.2±22.1†	195.3±45.6‡	392±46.2‡	302.2±72.2¶	555.9±82.5¶
Osmolalita (mOsm/l)	308.6±5.7	308.5±4.4	296±5*	310±4.5*	299.1±3.4†	315.1±3.4†	299.5±3.2‡	318.61±3.8‡	300±2.8¶	317.2±4.4¶
ATP (umol/gHb)	7.5±2.3	5.3±2.3	5±1.3*	3.9±1.4*	5.45±1.6†	4.7±2.5†	4.7±1.1	4.67±1.2	4.5±1.1	4.2±0.9
2,3-DPG (umol/gHb)	64.6±16.3	58.6±12	47.3±16.4*	61.1±12.3*	3.3±1.6†	1.9±0.8†	1.1±0.6	0.3±0.3	0.2±0.5	0.2±0.3

Hodnoty jsou uvedeny jako střední hodnoty ± SD z n = 20 (C-WB, C-CRBCs) a n = 23 (T-WB, T-CRBCs), hodnoty p byly vypočteny pomocí metody Mann-Whitney k srovnání C-CRBC a T-CRBC, Signifikantní rozdíl mezi dvěmi porovnávanými skupinami ($p < 0,05$) označen * (0. den), † (7. den), ‡ (14. den), ¶ (21. den)

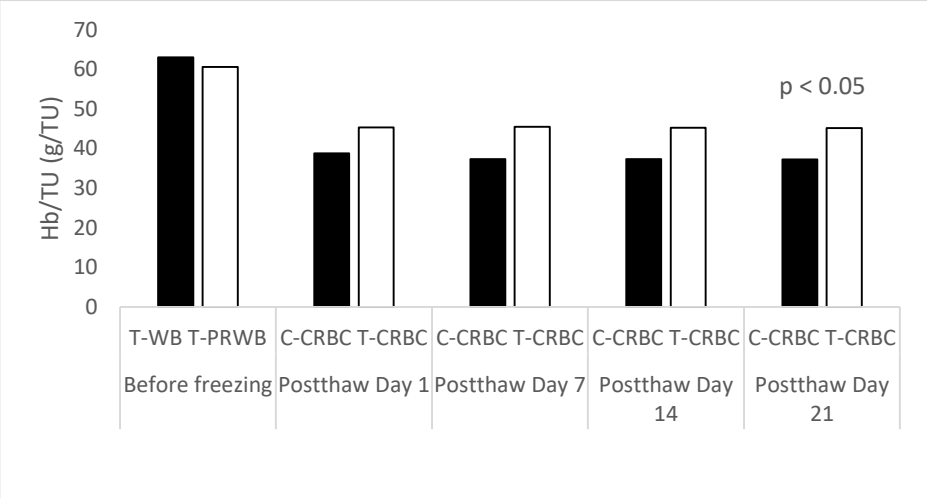
Poznámka: Po odběru = ihned po odběru, Po PRT = ihned po PRT, Po rekonstituci = po rozmrazení ihned v den (0, 7, 14 a 21)
T-WB = PRT neošetřená kontrolní čerstvá plná krev, T-PRWB = PRT ošetřená čerstvá plná krev, C-CRBCs = PRT neošetřené kontrolní kryokonzervované erytrocyty, T-CRBC = PRT ošetřené kryokonzervované erytrocyty

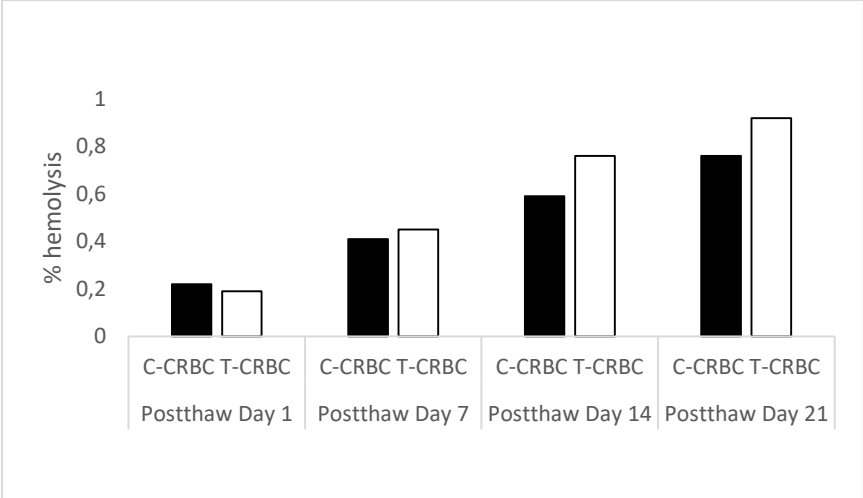
Výsledky T-CRBC vs C-CRBC

- **PRT způsobila 5% ztrátu erytrocytů následovanou 24% ztrátou způsobenou kryokonzervací s následným rozmražením spojenou celkovou 29% ztrátou erytrocytů**

- **ale T-CRBC obsahovaly v průměru 45 g hemoglobinu, což odpovídalo směrnicím Evropské unie pro CRBC**

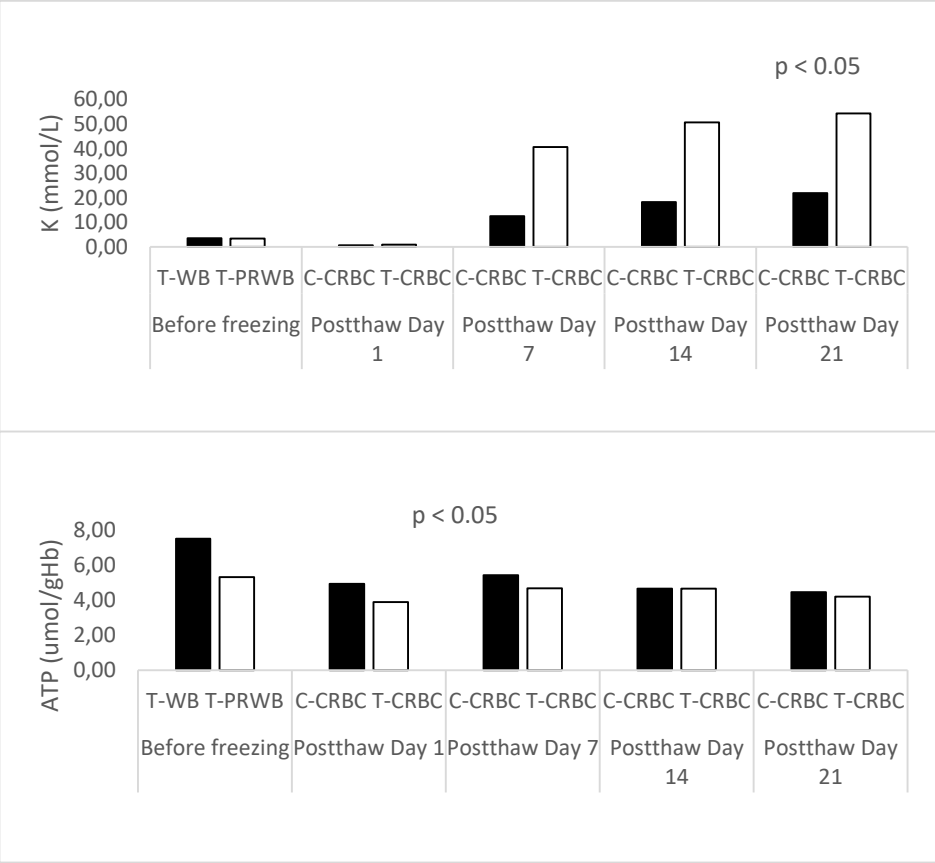
- **T-CRBC vykazovaly vyšší hemolýzu**

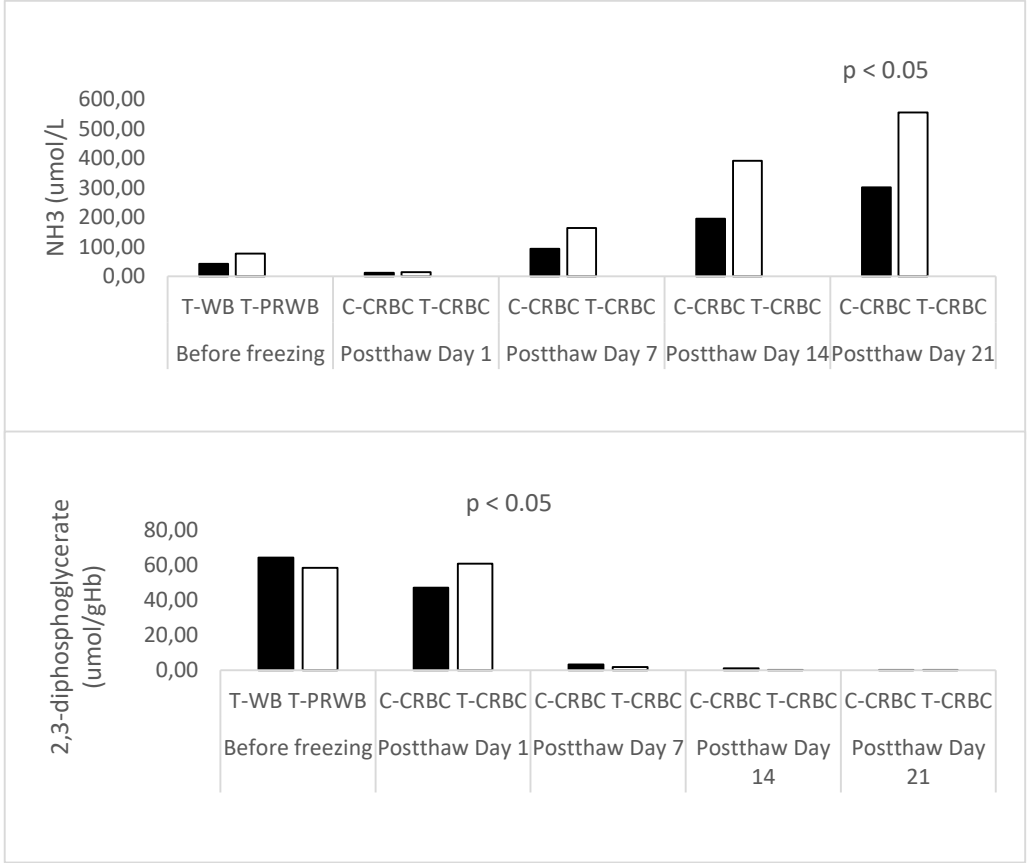




Výsledky T-CRBC vs C-CRBC

- **T-CRBC vykazovaly vyšší koncentrace draslíku a amoniaku a nižší ATP a 2,3-DPG na konci skladování**





Závěr

- **Po 3 týdnech skladování, nepozorujeme pokles hematokritu u T-CRBC a HB/TU, ale vidíme rostoucí % hemolýzy, hladin K a NH3, které limitují dobu skladování v rozmraženém stavu.**

- **Kryokonzervované erytrocyty vyrobené z plné krve PRT ošetřené Riboflavinem a UV světlem splňují kritéria pro klinické použití 7 dní po rekonstituci a poskytují dodatečnou ochranu před infekčními hrozbami pro dlouhodobě skladované erytrocyty.**

Received: 10 October 2022 | Revised: 10 February 2023 | Accepted: 27 February 2023

DOI: 10.1111/trf.17313

BLOOD COMPONENTS

TRANSFUSION

Effects of pre-freeze pathogen reduction with riboflavin and UV light on red cells stored post-thaw in AS-3 additive solution

Dominik Kutac[1,2] | Milos Bohonek[1,3] | Ludmila Landova[1] | Eva Staskova[1] | Marie Blahutova[1] | Juraj Lovecky[4] | Jan M. Horacek[2,5] | Lynn G. Stansbury[6,7] | John R. Hess[6,8]

[1]Department of Hematology and Blood Transfusion, Military University Hospital, Prague, Czech Republic

[2]Department of Military Internal Medicine and Military Hygiene, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic

[3]Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University, Prague, Czech Republic

[4]Department of Biochemistry, St. Sisters of Mercy Hospital Karel Boromejsky, Prague, Czech Republic

[5]Department of Internal Medicine IV – Hematology, University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic

[6]Harborview Injury Prevention and Research Center, Harborview Medical Center, Seattle, Washington, USA

[7]Department of Anesthesia and Pain Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA

[8]Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, Washington, USA

ÚVN MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL PRAGUE

IF 3.337

Poděkování

plk. gšt. MUDr. Miloši Bohoňkovi, Ph.D.

L. Landové, B. Kostrouchové, E. Staškové, M. Blahutové, J. Loveckému, I. Malíkové, J. M. Horáčkovi, L. G. Stansbury a J. R. Hessovi

R. Gonzalesovi
S. Marschner
M. Cardoso

ÚVN
CENTRAL MILITARY HOSPITAL
PRAGUE

Děkuji za pozornost!

Otázky ?

Dominik.kutac@uvn.cz