



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Oddělení hematologie a krevní transfuze



Patogen redukce kryokonzervovaných trombocytů

mjr. MUDr. Dominik Kutáč

15. Střešovický transfuzní den
ÚVN Praha, 23-24. listopadu 2022

Disclosure

Žádné relevantní finanční nebo jiné vztahy k zveřejnění

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

**a dlouhodobým záměrem rozvoje organizace 1011 –
klinické obory (FVZ UO, Česká republika)**



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Úvod

Při náhle vzniklé potřebě je žádoucí mít zásobu **trombocytů (PLT), které by měly být k dispozici okamžitě, toto je limitováno jejich nedostatkem a problematikou skladování**

Tuto potřebu lze uspokojit vybudováním zásob **kryokonzervovaných trombocytů (CP)**

S nově se objevujícími infekčními hrozbami a limitům screeningu krví přenosných infekcí představuje redukce patogenů (PRT) 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

Cryopreserved platelets: are we there yet? Marks DC. Transfusion. 2018 Sep;58(9):2092-2094. doi: 10.1111/trf.14887.

Frozen platelets. Kelly K, Dumont LJ. Transfus Apher Sci. 2019 Feb;58(1):23-29. doi: 10.1016/j.transci.2018.12.013. Epub 2018 Dec 30.

Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets. Slichter SJ, Jones M, Ransom J, Gettinger I, Jones MK, Christoffel T, Pellham E, Bailey SL, Corson J, Bolgiano D. Transfus Med Rev. 2014 Oct;28(4):212-25. doi: 10.1016/j.tmr.2014.09.001.

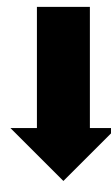


ÚVN

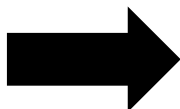
MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Hypotéza

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



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



Dle naší teorie kryokonzervované trombocyty by mohly být bezpečné ke klinickému užití...

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

The clinical and biological impact of new pathogen inactivation technologies on platelet concentrates. Julie Kaiser-Guignard, Giorgia Canellini, Niels Lion, Mélanie Abonnenc Jean-Claude Osselaer, Jean-Daniel Tissot. Blood Reviews, Volume 28, Issue 6, November 2014, Pages 235-241

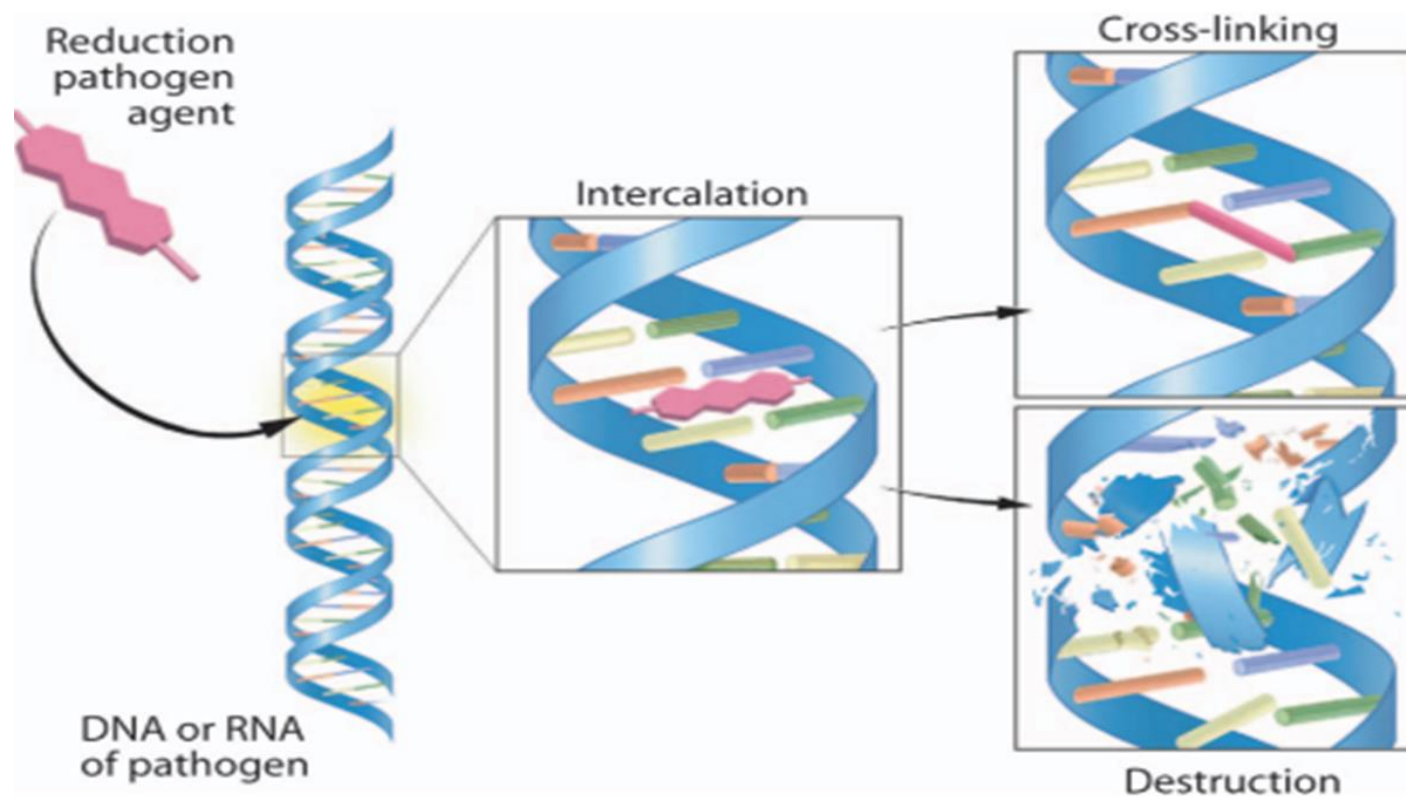


ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE



Co je to patogen redukce ?



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Nynější stav

Jen málo studií popsalo vliv moderních patogen redukčních technologií na **kryokonzervované trombocyty**:

1. Cryopreservation of UVC pathogen-inactivated platelets.

Waters L., Padula MP, Marks DC, Johnson L. Transfusion 2019 Feb 20. doi: 10.1111/trf.15204.

CONCLUSION:

This study demonstrates the feasibility of cryopreserving UVC-PI treated PLT products. UVC-PI treatment may increase the susceptibility of PLTs to damage caused during cryopreservation, but this is more pronounced during post-thaw storage at room temperature.

2. Cryopreservation of buffy coat-derived platelet concentrates photochemically treated with amotosalen and UVA light.

Meinke S, Wikman A Gryfelt G, Hultenby K, Uhlin M, Höglund P, Sandgren P. Transfusion 2018 Nov;58(11):2657-2668. doi: 10.1111/trf.14905.

CONCLUSION:

PCT-CPPs appeared slightly more susceptible to lesion effects by freezing than conventional CPPs, in particular in assays on Day 1 after thawing, but these differences were small relative to the dramatic effects of the freezing process itself.

3. Cryopreservation of platelet treated with riboflavin and UV light and stored at -80°C for 1 year.

Jimenez-Marco T, Ballester-Servera C, Quetglas-Oliver M, Morell-Garcia D, Torres-Reverte N, Bautista-Gili AM, Serra-Ramon N, Girona-Llobera E. Transfusion. 2021 Apr;61(4):1235-1246. doi: 10.1111/trf.16324.

CONCLUSION:

Our cryopreservation and thawing method prevented aggregate formation in cryopreserved riboflavin-UV-light-treated PLTs, which exhibited good recovery, swirling, pH > 6.4, and procoagulant potential, as evidenced by a reduced clotting time after 12 months of storage at -80°C. The clinical relevance of these findings should be further investigated in clinical trials.



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Cíl

- srovnání in vitro kvalitativních parametrů mezi PRT ošetřenými a neošetřenými kryokonzervovanými trombocyty



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Mirasol® Pathogen Reduction Technology System

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



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Metodika - **PLT**

PLT z aferézy
(31 TD, nepárovány)

PRT

PLT z aferézy (Haemonetics MCS+) 16 TD

- PRT - **ošetřené** – **T-CP** (Mirasol, Terumo BCT)
- deleukotizované
- zmraženy v 6% DMSO při -80°C, nejméně 14 dnů
- rozmraženy v FFP

PLT z aferézy (Haemonetics MCS+) 15 TD

- PRT - **neošetřené** – **C-CP**
- deleukotizované
- zmraženy v 6% DMSO při -80°C, nejméně 14 dnů
- rozmraženy v FFP

Den 0 T- AP (PLT před PRT), den 0 T-PRAP (PLT po PRT) a po rozmražení (T-CP vs C-CP) měřeny následující parametry:

Trombocyty, MPV, recovery trombocytů, thromboelastografie, trombin generační čas, glukóza, laktát, pH, pO₂, pCO₂, HCO₃, FACs (CD41, CD42b, CD62, Annexin V), CCL5, CD62P, agregáty > 2 mm a Kunického skóre



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha



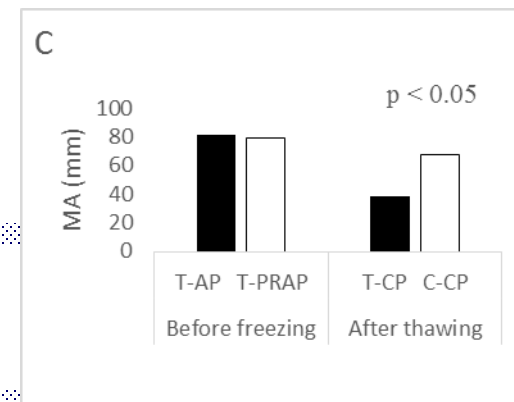
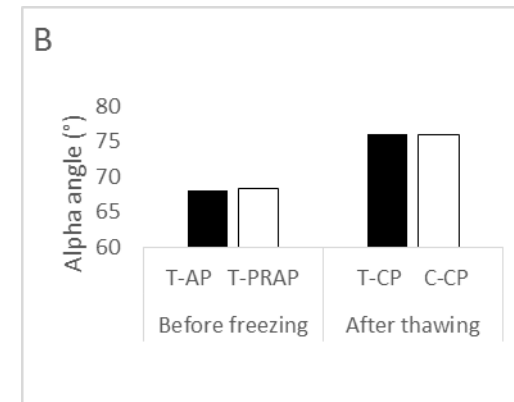
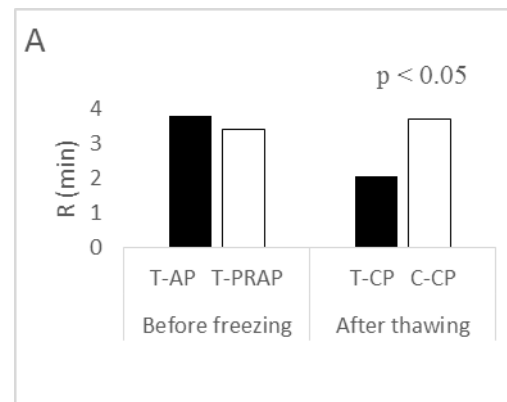
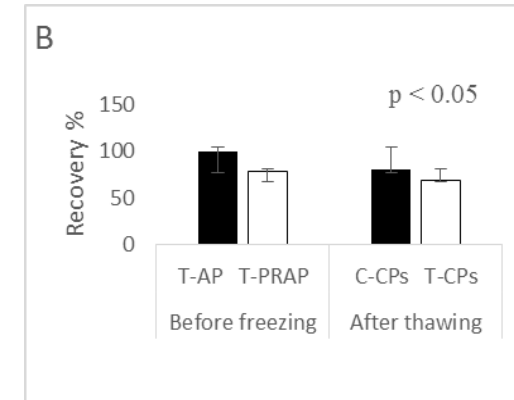
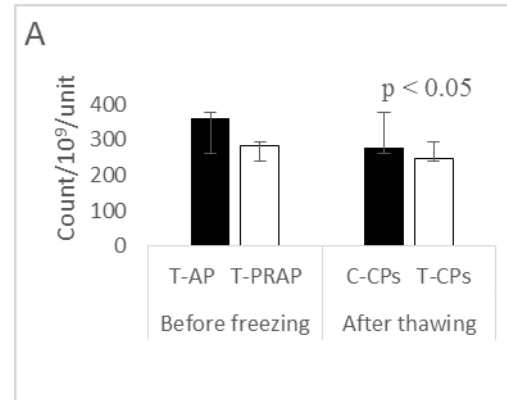
Výsledky T-CPs vs C-CPs

Druh trombocytů → Testy ↓	Po aferéze T-AP	Po PRT T-PRAP	Po rekonstituci T-CP C-CP		p ¹
A: Počty trombocytů:					
Počet/10 ⁹ /TU	359.6±56.5	284.4±82.6	247.1±49.2*	279.2±31.6*	0.0459
Recovery %	-	79±6.3	69±8.6*	80.5±6.2*	0.0009
MPV (fl) ²	9.05±0.5	9.08±0.5	9.12±0.42	9.07±0.46	0.74
B: Morfologie trombocytů					
Kunickiho skóre	276.5±37.0	216±6.3	280.8±18.4	223±18.1	0.0049
Agregáty ano/ne ³	0	0	16	0	
C: Tromboelastografie (TEG)					
R (min)	3.8±0.9	3.4±0.7	2.1±0.4*	3.7±0.5*	<0.0001
Úhel alfa (°)	68.1±5.25	68.4±5.4	76.1±3.1	76.1±4.8	0.1
MA (mm)	81.3±3.7	79.2±4.6	38.1±10.1*	68±17.3*	<0.0001
D: Trombin generační čas (TGT):					
tLag (min)	2.8±0.3	2.5±0.4	2.1±0.4	2.7±1.9	0.2
tPeak (min)	6.6±0.5	6.1±0.6	4.4±0.7	4.8±0.9	0.1
Peak (nmol/L)	228.7±28.3	217.6±60.7	519.3±138.2	450.7±109.9	0.4
Velocity index (nmol/L)	60.6±13.2	65.8±15.4	242.1±57.9*	192.9±74.3*	0.0482
ETP (nmol/min)	2123.2±80	1985.1±64.9	2334.2±116.3*	2214.2±124.0*	0.0094
E: Fenotyp trombocytů:					
CD41-PB (%)	98.9±0.2	98.9±0.2	95.1±2.1*	98.3±1.9*	0.0001
CD42b-APC (%)	99.1±0.4	99.2±0.1	95±1.6	93.4±3.4	0.2
CD62-PE(%)	12.4±6.5	20.2±7.8	33.3±5.1*†	49.9±14.8*†	0.001
Annexin V-APC(%)	2.32±3.26	21±2.2	87.4±5.5	83.5±7.1	0.1
CCL5 (ng/mL)	26.3±14.0	31.6±13.9	233.1±72.8*	141.1±40.1*	0.0002
sCD62P(ng/mL)	52±14.4	39.6±10.1	163.2±40.1†	137.1±40.1†	0.08
F: ostatní laboratorní výsledky					
Glukóza (mmol/L)	19.7±5.1	18.7±0.6	5.0±0.6*	19.3±0.8*	<0.0001
Laktát (mmol/L)	1.4±0.3	1.3±0.3	1.7±0.5	1.5±0.4	0.2
Krevní plyny: pH	7.2±0.1	7.2±0.1	7.5±0.5	6.8±1.6	0.1
pO2 (mmHg)	119.3±14.2	0.58±1.47	89.2±10.7*	134.6±26.1*	<0.0001
pCO2 (mmHg)	29.6±4.9	28.9±8.3	21.2±4.2	36±4.2*	<0.0001
HCO3 ⁻ (mmol/L)	16.2±1.8	14±1.0	23.5±1.7*	16.8±1*	<0.0001
1 – p: Statistické porovnání bylo provedeno jen mezi C-CP a T-CP koncentráty. Signifikantní rozdíl mezi dvěmi porovnávanými skupinami (p < 0,05) označen *					
2 – MPV (fl): střední objem trombocytů (femtolitr)					
3 – Přítomnost agregátů ano/ne hodnocena vizuálně					
† Byly použity Spearmanovy korelace mezi CD62-PE% a sCD62P, ale nebyla pozorována žádná shoda					



Výsledky **T-CPs** vs **C-CPs**

- obsahují nižší počet trombocytů (247 vs 278 ×10⁹/TD)
- redukovanou tromboelastografickou MA (38 vs 62 mm)
- přítomny agregáty ve srovnání s C-CPs
- plazmatické koagulační funkce se z velké části nezměnily



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Závěr

T-CP vs C-CP

- **T-CP** vykazovaly snížený počet trombocytů, ale počty těchto trombocytů jsou dostatečné pro splnění EU Guide pro klinické použití
- snížená funkce trombocytů je větší, než by způsobil snížený počet T-CP a přítomnost agregátů
- výrazná aktivace T-CP se slabou silou sraženiny naznačuje jejich sníženou účinnost



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE



Contents lists available at ScienceDirect

Transfusion and Apheresis Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/transci

Cryopreservation of apheresis platelets treated with riboflavin and UV light

Dominik Kutac^{a,b,*}, Milos Bohonek^{a,c}, Ludmila Landova^a, Eva Staskova^a, Marie Blahutova^a, Ivana Malikova^d, Miroslav Slouf^e, Jan M. Horacek^f, Lynn G. Stansbury^{g,h}, John R. Hess^{g,i}, Jerard Seghatchian^j

^a Department of Hematology and Blood Transfusion, Military University Hospital Prague, Czech Republic

^b Department of Military Internal Medicine and Military Hygiene, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno, Hradec Kralove, Czech Republic

^c Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Czech Republic

^d Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Faculty of Medicine, Charles University of Prague and the General University Hospital in Prague, Czech Republic

^e Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Czech Republic

^f Department of Internal Medicine IV - Hematology, University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

^g Harborview Injury Prevention Research Center, Harborview Medical Center, Seattle, WA, USA

^h Department of Anesthesia and Pain Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA

ⁱ Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Washington, Seattle, WA, USA

^j International Consultancy in Blood Components Quality/Safety, Audit/Inspection and DDR Strategy, London, UK



ÚVN
MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

IF 2.596 (2021)

Poděkování spolupracovníkům

plk. gšt. MUDr. M. Bohoňkovi, Ph.D.

plk. gšt. MUDr. J. M. Horáčkovi, Ph.D.

**L. Landové, B. Kostrouchové, E. Staškové, M. Blahutové, J. Loveckému,
I. Malíkové, M. Šloufovi, L. G. Stansbury, J. R. Hessovi, J. Seghatchianu**

R. Gonzalesovi

S. Marschner

M. Cardoso



ÚVN

MILITARY UNIVERSITY HOSPITAL
PRAGUE

Děkuji za pozornost!



Otázky ?

Dominik.kutac@uvn.cz

