Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 160
proLékaře.cz | 1.1.2026

Zhodnocení markerů apoptózy a aktivace trombocytů u aferetických odběrů trombocytů s plazmou

Procházková R.[1], Andrýs C.[2], Hubáčková L.[1], Řehořová L.[1], Krejsek J.[2]
[1]Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec
[2]Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Souhrn
Cílem přípravy trombocytového koncentrátu je přípravek se zachovanou hemostatickou funkcí. Během procesu přípravy a skladování je ovlivňována struktura a funkce trombocytu, dochází k apoptóze a aktivaci krevní destičky. Byl hodnocen stav buněčného poškození a aktivace trombocytů ze separátorů Haemonetics MCS+ a Trima Accel s odlišnou technologií aferézy. V den přípravy a exspirace byly vyšetřeny parametry buněčného poškození a aktivace trombocytu (pH, LDH, laktát, glukóza, annexin V, solubilní P-selektin). V den přípravy známky nejnižší aktivace vykázaly trombocyty ze separátoru Haemonetics MCS+. Na konci exspirace přípravky z aferézy vykázaly vyšší stupeň aktivace ve srovnání s trombocyty z plné krve, přípravky z obou separátorů byly srovnatelné. Na základě zhodnocení vývoje a vzájemných vztahů uvedených markerů, zejména P-selektinu a annexinu V se autoři domnívají, že počáteční aktivace trombocytů v přípravcích je pravděpodobně reverzibilní. Je způsobena vlivem technologie přípravy a neovlivňuje proces apoptózy trombocytu a jeho viabilitu během skladování.
Klíčová slova: aferéza, aktivace trombocytu, apoptóza

Summary
Procházková R., Andrýs C., Hubáčková L., Řehořová L., Krejsek J.: Evaluation of apoptotic markers and platelet activation in apheretic harvests from plasma

The aim of preparation of the platelet concentrate is a mixture with conserved haemostatic function. During the process of preparation and storage, the platelet structure and function is affected. It undergoes apoptosis and activation. The state of cell damage and platelets activation was evaluated by means of separators Haemonetics MCS+ and Trima Accel with different technology of apheresis. Parameters of cell damage and platelet activation (pH, LDH, lactate, glucose, annexin V, soluble P-selectin) were evaluated at a time of preparation and expiration. The lowest level of activation during the time of preparation was observed in platelets from separator Haemonetics MCS+. Higher levels of platelet activation were demonstrated by apheresis in contrast to the total blood at the time of expiration. Mixtures from both separators showed comparable results. Based on the evaluation of progression and correlation between abovementioned markers, particularly between P-selectin and annexin V, the authors suggest that initial platelet activation in the mixtures is probably reversible. It is a result of technology procedure during the preparation, which does not affect process of apoptosis and its viability during the storage.
Key words: apheresis, platelet activation, apoptosis

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 3, p. 160–166.

Úvod

Trombocyty pro profylaktické či léčebné podání pacientům lze získat klasickými odběry plné krve s následným zpracováním anebo aferetickými technikami (1, 2). Nový trend v přípravě představují multikomponentní odběry krve, které umožňují současný odběr více transfuzních jednotek (TU) krevních složek od jednoho dárce v různých kombinacích (2, 3). V případě trombocytaferézy je cílem přípravy získat přípravek nejen se standardním obsahem trombocytů a s minimální kontaminací leukocyty, ale také se zachovanou funkcí a minimální aktivací destičky (4, 5).

Struktura a funkce trombocytů jsou ovlivněny řadou faktorů během procesu přípravy a skladování, například technikou odběru, složením antikoagulačního roztoku, kontaktem s povrchem odběrového vaku či setu, metodou zpracování a obsahem leukocytů v produktu, či způsobem leukofiltrace (6, 10). Uvedené procesy mají vliv na proces apoptózy a aktivace trombocytu. Metabolické a morfologické alterace trombocytů limitují jejich skladovatelnost a dle některých autorů mohou asociovat se snížením potransfuzní „recovery in vivo“ (5, 11). Dosud však nejsou všechny mechanismy vedoucí k poškození trombocytu během odběru a skladování plně objasněny (11).

Přestože je trombocyt bezjadernou buňkou, podléhá **apoptóze**, procesu programované řízené buněčné smrti (1), ke které dochází přirozeně stárnutím během skladování a může být negativně ovlivněna vysokou senzitivitou destičky na stimuly během procesu přípravy. Při ní dochází k morfologickým změnám. Diskoidní tvar trombocytu se mění ve sférický (6, 12). Metabolické alterace během skladování se odrážejí ve změnách pH, zvýšení LDH v supernatantu (6, 11, 13), v konsumpci glukózy a produkci laktátu. Dochází k uvolnění beta-thromboglobulinu, externalizaci phosphatidylserinu (5, 11) a expresi markerů aktivace trombocytu. Za moderní marker apoptózy je dnes považován annexin V, intracelulární gly-

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 161
proLékaře.cz | 1.1.2026

koprotein, který je v trombocytu fyziologicky obsažen v cytosolu a organelách. Jeho zvýšená plazmatická hladina je v přímé relaci se stupněm buněčného poškození a jeho stanovení je dnes používáno jako vysoce senzitivní parametr monitorování kvality trombocytových koncentrátů (14, 15). Dále se annexin V ukazuje být velmi efektivním inhibitorem koagulace díky své vysoké afinitě k fosfolipidovým membránám (7, 13). Proto také přítomnost annexinu V v trombocytovém koncentrátu dle některých autorů může mít i klinický význam vzhledem k možnému antikoagulačnímu působení a kompetici s vazebnými místy pro faktor VIII a V (13).

Aktivace trombocytu je odezva klidové destičky na specifické stimuly zprostředkovaná receptory různých typů (12). Fyziologická aktivace trombocytu kolagenem je nezbytná pro zástavu krvácení (16). K aktivaci destičky dochází také během procesu přípravy. Je spojena se snížením metabolické aktivity trombocytu během skladování. Podobně jako proces apoptózy je aktivace trombocytu spojena s morfologickými a funkčními změnami, zejména s degranulací vnitřních granulárních struktur trombocytu, které vedou k povrchové expresi makromolekul lokalizovaných původně intracelulárně v granulích destiček. Jednou z nich je P-selektin CD62P, integrální membránový glykoprotein alfa-granulí, který se na povrchu klidové destičky nenalézá a jeho povrchová detekce je průkazem degradace alfa-granulí (12). Exprese P-selektinu na povrchu destičky umožňuje prostřednictvím specifické membránové molekuly PSGL-1 (CD162) její adhezi na granulocyty a monocyty a následné odstranění z cirkulace tkáňovými makrofágy (2). Stanovení exprese CD62P na povrchu trombocytů nebo jeho solubilní formy v supernatantu přípravku je používáno k posouzení aktivace trombocytů v přípravku (5, 11). Při aktivaci trombocytu dochází dále k uvolnění cytokinů z trombocytů (např. IL-6, IL-8, PF-4, RANTES), které jsou častou příčinou nehemolytických potransfuzních reakcí (3, 17).

Při porovnání uvedených změn, nazývaných také tzv. destičkové skladovací leze, literatura uvádí rozdíly nejen mezi aferetickými přípravky a přípravky z plné krve, ale i mezi produkty z různých typů separátorů a také mezi trombocyty připravenými z plné krve odlišnými technikami (12, 18). Ne všechny mechanismy, které vedou k poškození trombocytu jsou plně objasněny a pochopeny. Jsou v současné době předmětem intenzivního studia (11).

Cílem prospektivní studie bylo zhodnotit markery buněčného poškození a aktivace trombocytů získaných ze dvou typů separátorů s odlišnou technologií aferézy.

Materiál a metodika

Práce je součástí projektu IGA MZ ČR, který byl schválen Etickými komisemi KN Liberec, FN a LF UK v Hradci Králové.

Dárci: Odběry byly provedeny u 27 dárců plazmy (22 mužů a 5 žen), na základě informovaného souhlasu a vstupních kritérií uvedených v tabulce 1 (20).

Tab. 1. Výběrová kritéria pro dárce: odběry PLT + PA.

Parametry	**Trima Accel**	**Haemonetics MCS+**
Celkový objem krve (ml)	> 4 300	
Trombocyty (x10^9/l)	> 220	> 260
Hematokrit	muži > 0,40, ženy > 0,38	
Hemoglobin (g/l)	muži > 135, ženy > 125	
Časový limit	75 min	

PLT: trombocyty, PA: plazma

Krevní separátor a protokoly: Na separátorech Haemonetics MCS+ (Haemonetics Corp., Braintree, USA) (dále MCS+) a Trima Accel (Gambro BCT, inc. Lakewood, USA) (dále Trima) byly provedeny kombinované odběry trombocytů o obsahu 3,0 x 10^{11} v transfuzní jednotce (TU) a plazmy. Separátor Haemonetics MCS+ umožňuje provádět odběry intermitentním způsobem, deleukotizace trombocytů (PLT) probíhá kontinuální filtrací. Aferéza na separátoru Trima Accel probíhá kontinuálně, trombocyty jsou připravovány leukoredukčním systémem. Na separátoru Haemonetics MCS+ jsme použili protokol LDP-LP, antikoagulační roztok AB-16 v poměru 1:15. Na přístroji Trima Accel bylo použito antikoagulans ACD-A v poměru 1:10. U obou přístrojů byla použita standardní odběrová a návratová rychlost. Všechny odběry byly prováděny bez objemové náhrady. Jako kontrolní soubor byly použity trombocyty z plné krve, získané odběrem 450 ml ± 10 % plné krve do čtyřvaků JMS Quadruple CPD SAGM-NP, iBSP (kat. č. 811-8435, Japan Medical Supply, Singapur), obsahujících antikoagulant CPD v poměru 1:7, a následnou diferenciální centrifugací.

Odběry vzorků: Pro laboratorní vyšetření přípravků byly odebírány vzorky na začátku a konci exspirace, tj. v den 0 a den 5 resp. 6. V den 0 bylo odebráno bezprostředně po přípravě 10 ml přípravku, centrifugováno 5 min. při 5000 ot. na laboratorní centrifuze Jouan C 3.12 (Jouan S.A., Francie). Supernatant byl rozplněn do alikvotů po 0,75 ml. Vyšetření pH, laktátu, glukózy a LDH

Tab. 2. Charakteristika souboru dárců a základní parametry aferéz.

	Haemonetics MCS+	Trima Accel
Dárci:		
Celkový počet	20	20
Muži	15	16
Ženy	5	4
Věk (roky)*	35 (26–48)	32 (25–48)
Hmotnost (kg)*	79 (64–108)	82 (65–105)
Počet PLT (x 10^9/l)[1]	319 ± 47	296 ± 61
Hematokrit	0,42 ± 0,04	0,42 ± 0,03
Přípravky:		
Čas aferézy (min.)	58 ± 8	44 ±7
Zpracovaný objem krve (ml)	2278 ± 292	2328 ±345
Objem jednotky PLT[2] (ml)	277 ± 37	278 ± 14
Výtěžnost PLT[2] (x 10^9/TU)	389 ± 66	382 ± 74

Legenda: [1]předodběrový počet trombocytů dárce krve, [2]trombocyty,*data uvedena jako medián a rozptyl, ostatní jako průměr ± SD

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 162
proLékaře.cz | 1.1.2026

proběhlo týž den do 4 hodin po odběru vzorků. Materiál pro vyšetření annexinu V a solubilního P-selektinu CD62P byl zamražen a skladován při -30 °C. Pro vyšetření markerů na konci exspirace bylo 10 ml koncentrátu sterilně přemístěno do skladovacího váčku (Grifols transfer vak 150 ml, kat. č. 720430, Laboratorios Grifols, S.A., Španělsko), který byl skladován při teplotě 22 °C ± 2 °C. Následné zpracování bylo identické jako u vzorků v den 0. Pro vyšetření hladiny annexinu V a selektinu CD62-P u dárců krve bylo před aferézou i odběrem plné krve odebráno 7 ml krve do zkumavek s K_3EDTA (kat. č. 367655, Becton-Dickinson Vacutainer Systems, Francie) a zpracováno výše popsaným způsobem.

Laboratorní analýza: Počet trombocytů v přípravcích byl stanoven na přístroji Coulter STKS (Beckman Coulter, Florida, USA). Hodnota LDH byla vyšetřena metodou LDH-L optimized (kat. č. 1876961, Roche Diagnostics), laktát reakcí s LOX (kat. č.1822837, Roche Diagnostics), pH přímou potenciometrií na radiometru ABL 625 GL, stanovení glukózy bylo provedeno glukózooxidázovou reakcí (GOP-POD, Lache-ma).

K stanovení hladiny annexinu V byl použit kit IMUCLONE Annexin ELISA Kit, kat. č. 650 (American Diagnostica Inc., Stamford, USA). Solubilní P-selektin byl stanoven pomocí kitu Human Soluble P-Selectin Immunoassay, kat. č. BBE 6 (R & D Systems Inc., Minneapolis, USA).

Hodnocení: Hodnotili jsme vývoj uvedených parametrů během skladování u jednotlivých typů přípravků a mezi přípravky navzájem. V případě annexinu V a solubilního P-selektinu jsme navíc porovnávali jejich hladinu v přípravku vůči klidové hodnotě u dárce krve. Data byla hodnocena pomocí průměru, mediánu a směrodatné odchylky. K porovnání výběrů jsme použili dvouvýběrový t-test, párový test, Pearsonův a Spearmanův korelační koeficient. Statistická významnost byla posouzena na hladině $p < 0,05$.

Výsledky

Charakteristika souboru a základní parametry jakosti získaných přípravků uvádíme v tabulce 2. Základní hodnocení bylo provedeno u 20 TU trombocytů ze separátoru Haemonetics MCS+, 20 TU trombocytů ze separátoru Trima Accel a 20 TU trombocytů z plné krve (TB). Výsledky stanovení hodnoty pH, hladiny laktátu, LDH a glukózy přehledně uvádí tabulka 3.

Hodnota **pH** v den 0 byla nižší u PLT z plné krve než u aferetických přípravků (TB x MCS: p = 0,004, MCS x Trima: NS), na konci exspirace byly hodnoty pH u PLT z plné krve vyšší než u aferetických PLT (TB x MCS: p < 0,001, MCS x Trima: NS) (graf 1a). U hodnot **glukózy** (mmol/l) byl v den 0 statisticky významný rozdíl u trombocytů z plné krve a separátoru MCS+ (p = 0,002), u PLT ze separátoru Trima byly hodnoty nejnižší (MCS x Trima: p < 0,001) (graf 1b). Celkově nižší hladina u PLT ze separátoru Trima je způsobena nižším obsahem glukózy v antikoagulačním roztoku ACD.

Hladina **laktátu** (mmol/l) byla v den 0 srovnatelná u obou typů PLT z aferézy (MCS x Trima: p = 0,08) a nižší než u PLT z plné krve (TB x Trima: p < 0,001). Na konci exspirace byly hodnoty u aferetických PLT srovnatelné a vyšší, než u PLT z plné krve (TB x MCS: p < 0,001, TB x Trima: p < 0,008, Trima x MCS: p = 0,5) (graf 1c). Hladina **LDH** (μkat/l) byla v den 0 u všech typů PLT srovnatelná (TB x Trima: p = 0,2, TB x MCS: p = 0,07, Trima x MCS: p = 0,2). Na konci exspirace byla nejvyšší u PLT ze separátoru Haemonetics MCS+, střední u PLT z Trimy a nejnižší u PLT z plné krve (Trima x TB: p = 0,007, Trima x MCS: p = 0,02) (graf 1d).

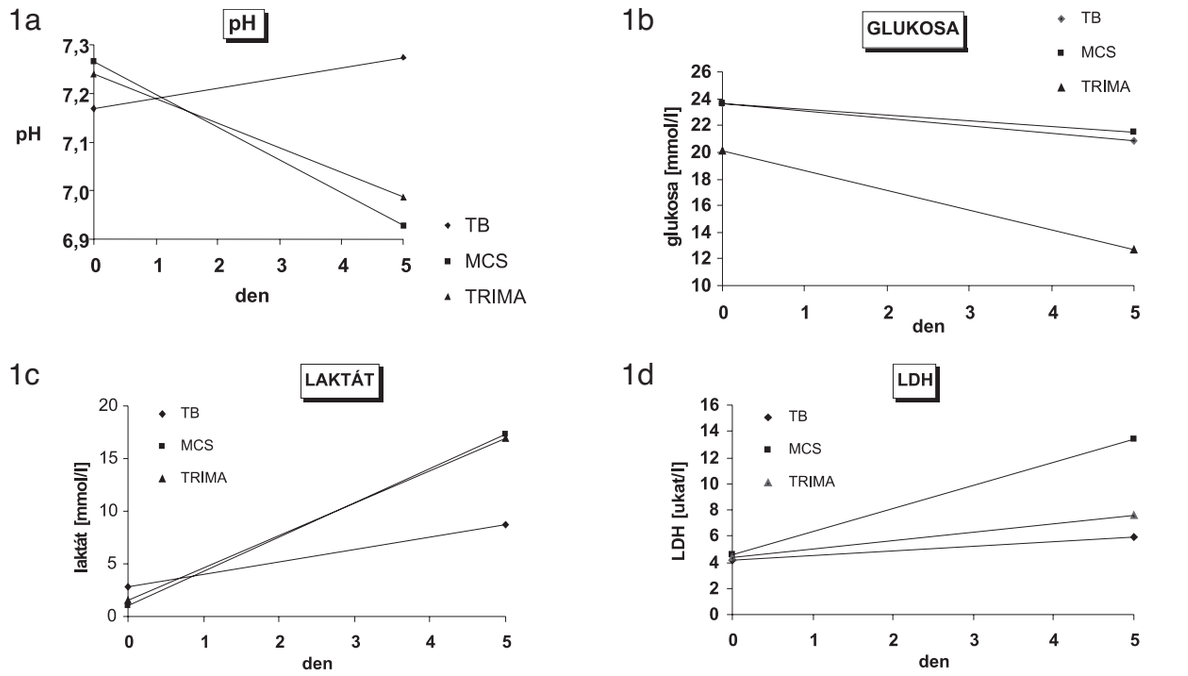
Hodnoty **annexinu V a solubilního P-selektinu** (dále P-selektin) stanovené na začátku i konci exspirace u trombocytů z aferézy z obou separátorů i trombocytů z plné krve uvádíme v tabulce 4. Hodnoty **annexinu V** (ng/ml) na začátku exspirace byly nejnižší u PLT ze separátoru Haemonetics MCS+. U PLT ze separátoru Trima a z plné krve byly hladiny vyšší (Trima x MCS: p = 0,02, MCS x TB: p = 0,002). Na konci skladování byly hodnoty u PLT ze separátoru MCS+ nejvyšší (Trima x MCS: p = 0,19, MCS x TB: p = 0,01). Mezi přípravky ze separátoru Trima a plné krve nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl na začátku (p = 0,44) ani na konci skladování (p = 0,27) (graf 2a). Hodnoty **P-selektinu** (ng/ml) (tab. 4) byly na začátku exspirace nejnižší u přípravků ze separátoru MCS+, vyšší u přípravků z přístroje Trima a nejvyšší u PLT z plné krve, mezi přípravky z Trimy a plné krve nebyl

Tab. 3. Vývoj parametrů poškození trombocytů v přípravku během skladování.

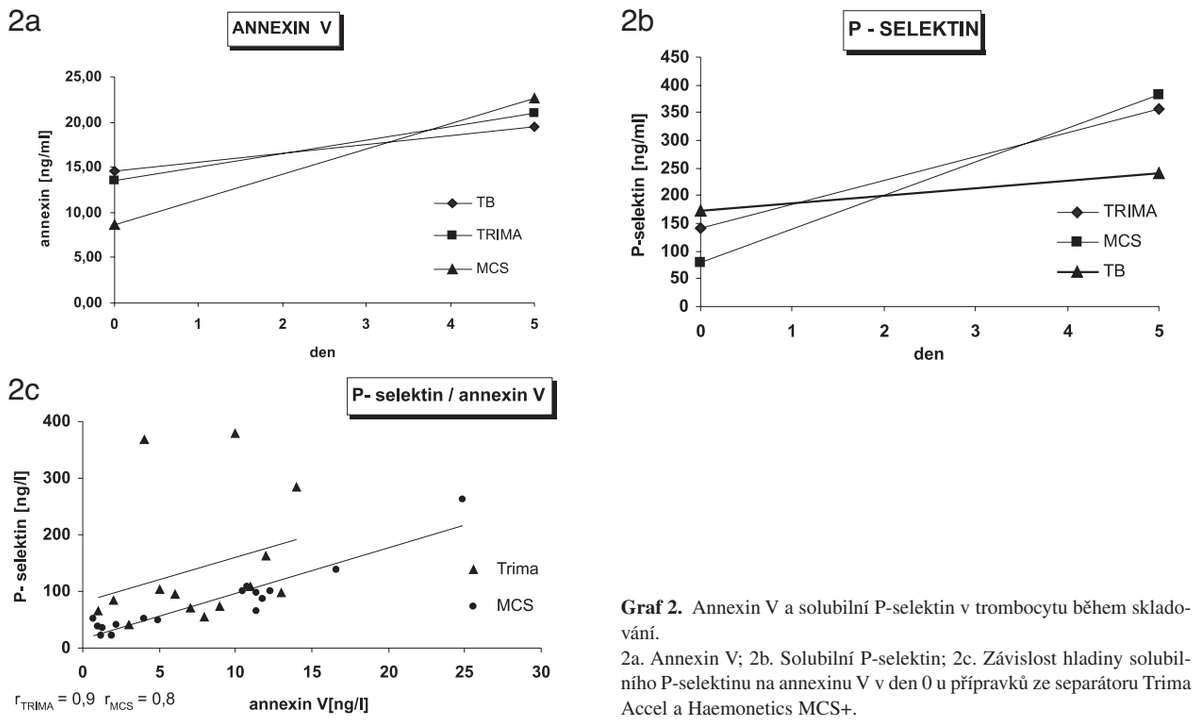
		PLT – Trima Accel		PLT Haemonetics MCS+		PLT z plné krve	
		n = 20		n = 20		n = 20	
		Den 0	Den 5	Den 0	Den 5	Den 0	Den 5
pH	AV/SD	7,2 ± 0,0	7,0 ± 0,2	7,3 ±0,1	6,9 ± 0,2	7,2 ± 0,0	7,3 ± 0,1
	Medián	7,2	7,0	7,2	7,0	7,2	7,3
laktát	AV/SD	1,5 ± 0,5	16,8 ± 3,9	1,3 ± 0,5	16,9 ± 3,2	2,8 ± 0,6	8,7 ± 2,3
(mmol/l)	Medián	1,5	17,0	1,2	17,2	2,7	8,3
LDH	AV/SD	4,3 ± 0,5	7,6 ± 1,6	4,6 ± 1,0	13,4 ± 11,7	4,2 ± 0,51	5,9 ± 2,4
(μkat/l)	Medián	4,4	7,4	4,4	8,5	4,1	5,0
glukóza	AV/SD	20,1 ± 1,7	12,7 ± 2,4	25,8 ± 2,7	21,8 ± 2,0	23,7 ± 1,0	20,8 ± 1,1
(mmol/l)	Medián	19,4	12,7	25,5	21,9	23,7	21,0

Legenda: AV/SD: průměr a směrodatná odchylka, PLT: destičkový koncentrát

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 163
proLékaře.cz | 1.1.2026



Graf 1. Vývoj parametrů poškození trombocytu během skladování. 1a. pH ; 1b. Glukóza; 1c. Laktát; 1d. LDH.



Graf 2. Annexin V a solubilní P-selektin v trombocytu během skladování.
2a. Annexin V; 2b. Solubilní P-selektin; 2c. Závislost hladiny solubilního P-selektinu na annexinu V v den 0 u přípravků ze separátoru Trima Accel a Haemonetics MCS+.

statisticky významný rozdíl (Trima x MCS: p = 0,07, Trima x TB: p = 0,32, MCS x TB: p = 0,002). Na konci exspirace mezi přípravky z aferézy nebyly statisticky významné rozdíly (Trima x MCS: p = 0,6), hladiny P-selektinu byly vyšší u obou aferetických PLT než u přípravků z plné krve (Trima x TB: p< 0,005, MCS x TB <0,002) (graf 2b).

Hodnoty annexinu V a solubilního P-selektinu u dárců krve před odběrem na obou separátorech i u dárců plné krve uvádí tabulka 4.

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 164
proLékaře.cz | 1.1.2026

Tab. 4. Hladiny annexinu V a solubilního P-selektinu u dárců před odběrem a v přípravcích během skladování.

		Trima Accel			Haemonetics MCS+			Trombocyty z plné krve		
		PLT	DK	p	PLT	DK	p	PLT	DK	p
	Počet měření	n = 20			n = 20			n = 20		
annexin V	Den 0	13,5 ± 6,2	9,1 ± 5,9	0,02	8,7 ± 6,9	9, 5 ± 7,2	NS	14,9 ± 5,1	5,5±4,9	<0,001
(ng/ml)	Den 5	20,9 ± 4,2	-		22,7 ± 3,9	-		19,5 ± 3,3	-	
	Počet měření	n = 14			n = 16			n = 20		
P-selektin	Den 0	141,3 ± 115,0	62,9 ± 34,1	0,03	79,1 ± 59,6	85,8 ± 68,5	NS	179,0 ± 102,6	74,7±50,3	<0,001
(ng/ml)	Den 5	357,5 ± 107,4	-		382,0 ± 139,5	-		242,9 ± 108,3	-	

Legenda: PLT: hladiny annexinu V a P-selektinu v přípravcích, DK: hladiny annexinu V a P-selektinu u dárců krve před odběrem. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr a SD.

Diskuse

Pro úspěch transfuze trombocytů je důležitá schopnost transfundovaných destiček setrvat v cirkulaci a plnit hemostatickou funkci, která může být ovlivněna metabolickým stavem trombocytu, tzv. skladovacími lézemi. U trombocytů aplikovaných do 48 hodin od přípravy se předpokládá plně zachovaná funkce a dobré přežití v cirkulaci. Po 7 dnech skladování se trombocyty stávají neviabilní. V praxi je však většina PLT aplikována mezi těmito dvěma mezemi. Předpokládá se, že PLT jsou schopny reverze některých metabolických změn po transfuzi, pravděpodobně proto, že se po transfuzi dostanou do plazmy s optimální hodnotou pH, hladinou glukózy a laktátu (10). PLT aplikované do 5 dnů skladování by tak po aplikaci měly přežívat v cirkulaci cca 5–7 dnů (21). Protože s hemostatickou funkcí trombocytů in vivo nekoreluje žádný jednoduchý test, je hodnocena řadou testů, které zkoumají odlišné části fyziologie destičky (10, 22).

Za kritický pro viabilitu a funkci trombocytu je považován pokles **pH** pod hodnotu 6,2, kdy dle řady autorů dochází k ireverzibilnímu poškození trombocytu, reprezentovanému ireverzibilní expresí P-selektinu (16, 22, 23). Při hodnotách pH mezi 6,2–6,8 dochází také k expresi P-selektinu, která je však po inkubaci trombocytu v plazmě reverzibilní. Hodnoty pH u většiny hodnocených PLT v naší studii se pohybovaly v rozmezí 6,4–7,4 dle Doporučení Rady Evropy (19). Ani v jednom případě jsme nezaznamenali kritický pokles hodnoty pH pod 6,2. U obou typů aferetických PLT byly hodnoty pH na začátku exspirace vyšší než u PLT z plné krve (p = 0,004), avšak během skladování jsme v nich zaznamenali pokles pH, který byl srovnatelný u produktů z obou separátorů (graf 1a) (24). Význam zvýšení hodnoty pH nad limit 7,4 není zatím jednoznačně dořešen. Dle některých autorů zvýšení hodnoty pH nad 7,6 může korelovat se snížením funkce trombocytu in vivo (22). Rozdílné hodnoty pH na počátku exspirace mohou být ovlivněny rozdílným složením a koncentrací antikoagulačních roztoků. Během skladování došlo u všech typů trombocytových koncentrátů k vzestupu **hodnot LDH a laktátu** (graf 1c–d). Na konci exspirace jsme u hodnot **LDH** nalezli statisticky významné rozdíly mezi všemi typy přípravků (Trima x MCS: p = 0,02, Trima x TB: p = 0,01, MCS x TB: p = 0,01), avšak hodnoty **laktátu** byly statisticky významně vyšší u aferetických PLT (Trima x MCS: p = 0,41, Trima x TB: p < 0,001, MCS x TB: p < 0,003). Hodnoty LDH a laktátu u PLT z obou separátorů také v souladu s literaturou negativně korelovaly s hodnotami pH (23).

Hladina **annexinu V** v den 0 byla v naší studii nejnižší u trombocytů ze separátoru MCS+, vyšší u přípravků ze separátoru Trima a nejvyšší u trombocytů z plné krve. Někteří autoři při porovnání hladin annexinu V u PLT vyrobenými různými technologiemi nacházejí v den 0 u různých typů přípravků buď srovnatelné hladiny (22), nebo hladiny podobné našemu zjištění (25).

U všech typů trombocytů došlo během skladování k postupnému zvýšení hladiny annexinu V, bez významného rozdílu mezi jednotlivými typy přípravků. Rozptyl distribuce hodnot byl široký, stejně jako u jiných autorů (18). Nejnižší vzestup hodnot během skladování byl zaznamenán u přípravků z plné krve (med. 1,4x) a ze separátoru Trima (med. 1,8x). U trombocytů ze separátoru MCS byl vzestup nejvyšší (med. 2,8x) (graf 2a). Neprokázali jsme jednoznačné korelace s hodnotami pH, LDH ani laktátu, a to na začátku ani na konci exspirace u žádného typu přípravků.

Stanovení P-selektinu (jeho exprese na povrchu PLT, resp. solubilní formy) je považováno za predikátor viability trombocytu. Přestože jeho definitivní role nebyla zatím jasně stanovena, má se za to, že degranulace CD62P z vnitřních destičkových granulí může znamenat částečnou ztrátu destičkových funkcí (14, 23, 26). Některé studie však prokázaly jen nízkou korelaci mezi expresí CD62P a přežitím destičky in vivo, což může být způsobeno buď odsunem CD62P pozitivních trombocytů z cirkulace (4, 27) nebo CD 62P pozitivní buňky mohou přetrvávat v cirkulaci, ale CD62P je odštěpen z povrchu buněk (5). Lze však najít korelaci zvýšení exprese P-selektinu, resp. jeho hladiny, snížení pH a ztráty vířivého („swirling“) fenoménu (10, 16).

V naší studii byly hladiny P-selektinu v den přípravy v souladu s jinými autory nejnižší u trombocytů ze separátoru MCS+ (8, 23, 25), vyšší u přípravků ze separátoru Trima a nejvyšší u trombocytů z plné krve. Vzestup hladin P-selektinu během skladování jsme pozorovali u všech typů přípravků. I zde jeho hladiny kopírovaly vzestup hladin annexinu V. Na konci exspirace byla hladina P-selektinu nejnižší u trombocytů z plné krve

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 165
proLékaře.cz | 1.1.2026

a vyšší u PLT z obou separátorů. K nejvyššímu vzestupu hodnot došlo u trombocytů ze separátoru MCS+ (6,8x), méně u separátoru Trima (3,4x). Nejnižší vzestup jsme zaznamenali u trombocytů z plné krve (1,8x) (graf 2b).

Při hodnocení hodnot annexinu V a P – selektinu v přípravcích a hodnot u dárce krve před odběrem jsme nalezli statisticky významné zvýšení středních hodnot hladin annexinu V v přípravcích ze separátoru Trima a z plné krve (Trima: p = 0,02, TB: p = 0,0001), nikoli v přípravcích ze separátoru MCS+. Při porovnání hladiny P-selektinu v přípravku v den přípravy vůči jeho hladině u dárce krve před odběrem došlo u trombocytů ze separátoru Trima a u trombocytů z plné krve taktéž ke statisticky významnému vzestupu hodnot (Trima: p = 0,02, TB: p = 0,0003). U trombocytů ze separátoru MCS+ zde nebyl statisticky významný rozdíl (tab. 4). Hladina annexinu V v přípravcích v den 0 nezávisela na jeho hladině u dárce krve před odběrem u trombocytů ze separátoru Trima a z plné krve, u trombocytů ze separátoru Haemonetics MCS+ jsme tuto závislost prokázali (rs = 0,45, p = 0,038). Hladina CD62P v přípravcích nezávisela, podobně jako hladina annexinu V, na jeho hladině v krvi u dárců u přípravků z plné krve a separátoru Trima, u přípravků ze separátoru MCS ano (rs = 0,57, p = 0,018). Znamená to, že zvýšení hladiny annexinu V a P-selektinu v přípravku v den 0 je ovlivněno pouze technologií přípravy, a že vliv jednotlivých způsobů přípravy na trombocyt je odlišný.

Předpokládá se, že produkce kyselin snižuje viabilitu a funkci trombocytu, a že snížení metabolické aktivity trombocytu je spojeno s expresí P-selektinu, resp. zvýšením jeho plazmatické hladiny. Ta je v korelaci s hodnotou pH, hladinou LDH a laktátu (23). V naší studii hladina P-selektinu u aferetických přípravků na konci exspirace korelovala s hodnotami LDH. Korelaci P-selektinu s hladinou laktátu se nám prokázat nepodařilo, pravděpodobně proto, že hodnota pH a odpovídající hladina laktátu v supernatantu se ve většině stanovení pohybovala ve fyziologickém rozmezí či na jeho hranici. To může znamenat, že nedošlo k významné změně viability buněk.

Hladina P-selektinu dle Krailadsiriho těsně reflektuje buněčné poškození stanovené měřením annexinu V (25). Tomuto předpokladu odpovídají i naše výsledky, kdy dynamika vývoje hladin P-selektinu kopíruje vývoj hodnot annexinu V u jednotlivých typů přípravků. Zhodnocením závislosti hladiny P-selektinu na hodnotě annexinu V jsme se pokusili získat informaci o tom, zda stav aktivace trombocytů v přípravku, vyjádřený hladinou P-selektinu, je ovlivněn stavem apoptózy buňky, vyjádřeným hodnotou annexinu V tak, jak uvádí literatura (25). Zjistili jsme, že tato závislost je vysoká na začátku exspirace u přípravků z obou typů separátorů i u trombocytů z plné krve (graf 2c). Na konci exspirace nebyla nalezena u žádného typu přípravku.

Jako nejšetrnější technologie při přípravě trombocytového koncentrátu se jevila aferéza na separátoru MCS+, při které hodnoty annexinu V a P-selektinu v přípravku v den 0 byly totožné s předodběrovými hodnotami dárce a ovlivnění trombocytu aferézou bylo minimální. Naopak dvojnásobná centrifugace při přípravě koncentrátu z plné krve se jevila vůči trombocytu agresivnější, podobně jako aferéza na separátoru Trima Accel. Přestože známky aktivace trombocytu byly v den přípravy nižší u přípravků ze separátoru MCS+, během skladování u přípravků z tohoto přístroje došlo k nejvyššímu vzestupu hladin annexinu V, P-selektinu i LDH. V den exspirace trombocyty z aferézy získané z obou separátorů vykázaly vyšší stupeň aktivace, než trombocyty z plné krve. Vzhledem k tomu, že se hodnoty pH pohybovaly v doporučeném rozmezí, se domníváme, že viabilita buněk nebyla ovlivněna.

Vyšší expresi, resp. hladinu P-selektinu u PLT z přístrojů s kontinuálním průběhem aferézy (např. Cobe Spectra, Amicus), ve srovnání s diskontinuálními separátory, uvádí i další autoři (8, 18, 25). U kontinuálních separátorů probíhá dvoustupňová centrifugace trvající 50–60 min. U diskontinuálních přístrojů trvá jeden centrifugační krok cca 15 minut. Znamená to, že u kontinuálních přístrojů jsou trombocyty vystaveny delšímu působení fyzikálních sil i déletrvajícímu kontaktu s plastem odběrového setu (2, 8). Rozdíly v aktivaci trombocytů během přípravy u různých separátorů jsou způsobeny odlišným mechanismem aferézy a zvýšení exprese P-selektinu v den přípravy je považováno za vliv použité technologie (5). V literatuře se můžeme setkat i s pojmem „apparatus – dependable CD62P“ (16).

Lze tedy konstatovat, že počáteční aktivace trombocytu v přípravcích způsobená technologií přípravy je pravděpodobně reverzibilní a neovlivňuje proces apoptózy a viabilitu buněk během skladování. Vzhledem k dosud neobjasněnému vztahu mezi hladinami P-selektinu v přípravku a funkcí trombocytu in vivo se domníváme, že uvedená zjištění lze aplikovat na posouzení, respektive porovnání vlivu technologií na trombocyt během přípravy. Jejich klinická interpretace zůstává dosud nejasná.

Poděkování: *Autoři děkují RNDr. P. Škrabálkovi za spolupráci při vyšetření laboratorních parametrů.*

Literatura

1. **Bertino AM, Qi XQ, Xia Y, Kuter DJ.** Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37 °C. Transfusion 2003; 43: 857–866.
2. **Perseghin P, Mascarerri L, Speranza, et al.** Platelet activation during plasma – reduced multicomponent PLT collection: a comparsion between COBE Trima and Spectra LRS turbo cell separators. Transfusion 2004; 44: 125–130.
3. **Wadhwa M, et al.** Cytokines in WBC – reduced apheresis PCs during storage: a comparsion of two WBC – reduction methods. Transfusion 2000; 40: 1118–1126.
4. **Gutensohn K, Geidel K, Kroeger N, et al.** Platelet function testing in apheresis products: flow cytometric, resonance thrombographic (rtg) and rotational thrombelastographic (roTEG) analyses. Transfusion Apher Sci 2002; 26: 147–155.
5. **Curvers J, van Pampus ECM, Feijge MAH, et al.** Decreased

Trans zlom 3 30.10.2006 9:44 Stránka 166
proLékaře.cz | 1.1.2026

responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. Transfusion 2004; 44, 49–58.
6. **Seghatchian J, Krailadsiri P.** The Platelet storage lession. Transf Med Rev 1997; 11: 130–144.
7. **Gemmell CH.** Activation of platelets by in vitro whole blood contact with materials: Increases in microparticle, procoagulant activity and soluble P-selectin blood levels. J Biomater Sci Polym Ed 2001; 12 (8): 933–43.
8. **Stohlawetz PO, Hergovich N, Eichler HG, et al.** Differential induction of P selectin on platelets by two cell separators during platepheresis and the effect on the release of soluble P-selectin. Transfusion 1998; 38(1): 24–30.
9. **Hornsey V, Drummond O, MacGregor I, et al.** Leucofiltration, retention/generation of soluble prion and Annexin V and storage of blood components. Transfus Sci 2000; 22 (1–2): 75–76.
10. **Solheim BG, Flesland O, Seghatchian J, et al.** Clinical implications of red blood cell and platelet storage lessions: an overview. Transfus Apher Sci 2004; 31(3): 185–189.
11. **Perrotta PL, Perrotta ChL, Snyder EL.** Apoptotic activity in stored human platelets. Transfusion 2003; 43: 526–535.
12. **Loudová M, Krejsek J, Kopecký O, Malý J.** Cytoimunofluorometrie a její využití v detekci aktivované destičky. Vnitř Lék 2001; 47: 175–180.
13. **Krailadsiri P, Seghatchian J, Zmíral J, Vissac A, Contreras M. Annexin V,** a new marker of platelet storage lession: correlaton with dMPV. Transfus Sci 1997; 18 (2): 223–226.
14. **Gutensohn K, Alisch A, Geidel K, Crespeigne N, Kuehnl P.** Annexin V and platelet antigen expression is not altered during storage of platelet concentrates obtained with AMICUS cell separator. Transf Sci, 1999; 20: 113–119.
15. **Tzima E, Walker JH.** Platelet annexin V: the ins and outs. Platelets 2000; 11: 245–51.
16. **Dijkstra-Tiekstra MJ, Pietersz RNI, Huijgens PC.** Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and in vitro and in vivo parameters. Vox Sanquinis 2004; 87: 257–263.
17. **Seghatchian MJ, et al.** Cytokines in platelet concentrates: A comparsion of apheresis platelet (Haemonetics) and filtered and unfiltered pooled buffy – coat derived platelet concentrates. Transf Sci 1997, 18: 103–107.
18. **Krailadsiri P, Seghatchian J.** Are all platelet concentrates equivalent? Vox Sanq 2000; 78: 171–175.
19. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 11th ed. Strasburg, Council of Europe Publishing, 2005.
20. **Procházková R, Hubáčková L, Řehořová L.** Výběr dárců pro multikomponentní odběry krve. Transfuze a hematologie dnes, 2005; 11: 54–61.
21. **Rinder HM., Smitd BR.** In vitro evaluation of stored platelets: Is there hope for predicting posttransfusion platelet survival and function? Transfusion 2003; 43: 2–6**.**
22. **Krailadsiri P, Seghatchian J, Williamson LM.** Platelet storage lession of WBC-reduced, pooled buffy coat –derived platelet concentrates prepared in three in-proces filter/storage bag combinations. Transfusion 2001; 41: 243–250.
23. **Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, Elfath MD.** The expression of P-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: Relationship to loss in vivo viability. Transfusion 1997; 37(1): 12–17.
24. **Vasconcelos YE, Figueiredo AC, Seghatchian J.** Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plazma, buffy coat and apheresis. Transf Apher Sci 2003; 29: 13–16.
25. **Krailadsiri P, Seghatchian J.** Effect of processing and storage on platelet activation, cellular injury and microvesiculation. Transf Apher Sci 2001; 24: 237–238.
26. **Lai M, Rumi C, D Onofrio G, et al.** Phosphatidylserine exposure in platelet concentrates during the storage period: differences beetween the platelets collected with different cell separators. Transfus Apher Sci 2002; 27: 239–245.
27. **Cardigan R, Turner C, Harrison P.** Current methods of assesing platelet function: relevance to transfusion medicine. Vox Sanq 2005; 88: 153–163.

Práce je podpořena grantem IGA MZČR č. NR/8015-3.

MUDr. Renata Procházková
Transfuzní oddělení
Krajská nemocnice Liberec
Baarova 15
460 63 Liberec

Došlo do redakce: 11. 5. 2006
Přijato: 19. 6. 2006