



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice
Praha

**Trombocytární lyzát a jeho možné použití –
inspirace z 38. mezinárodního kongresu ISBT v Barceloně
2024**

Dominik Kutáč, Miloš Bohoněk

Ústav laboratorní medicíny, hematologie a transfuziologie FBMI ČVUT a ÚVN Praha

Presidential Award session – Novel developments in the use of platelet biomaterials



- **Thierry Burnouf, PhD, profesor a proděkan** na Fakultě **Biomedicínského inženýrství**, Taipei Medical University, **Taiwan**.
- Založil a vede výzkumnou laboratoř se zaměřením na trombocyty a extracelulární vezikula v regenerativní medicíně, buněčné terapii a distribuci léčiv.
- Je také čestným **profesorem University of Lille, France**.
- Specializuje se na **frakcionaci plazmy a virovou bezpečnost**, publikoval přes **300 odborných článků na téma vývoje a klinické aplikaci produktů z krevní plazmy a trombocytů**. Je člen redakční rady **Vox Sanguinis, Platelets, Biologicals, and Transfusion Clinique et Biologique**.

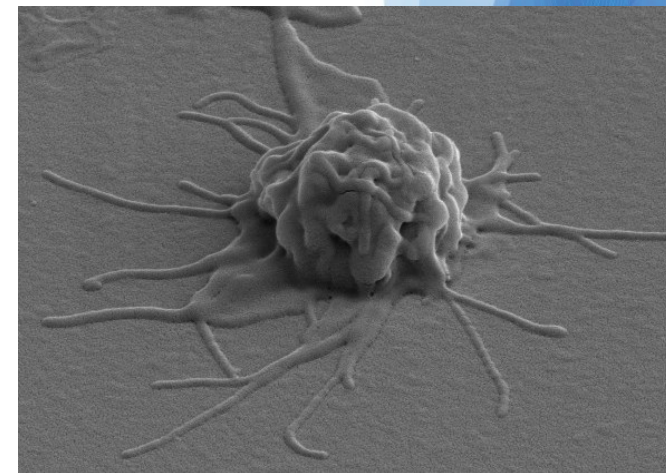
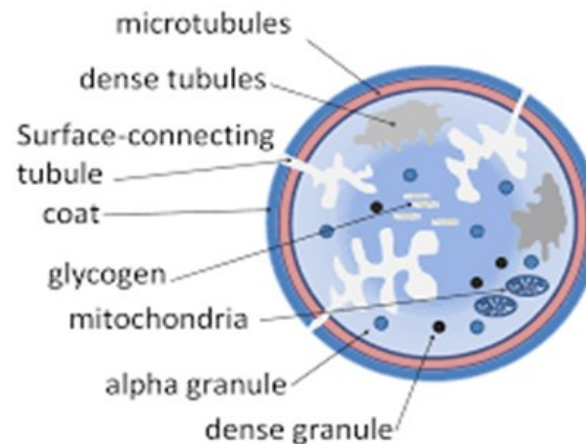
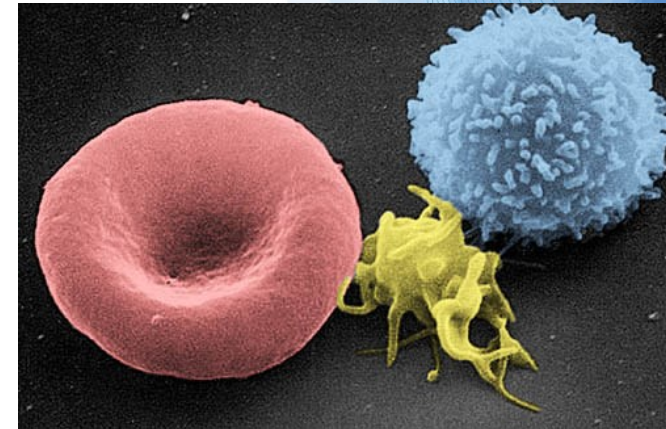


ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Trombocyt a jeho funkce

- bezjaderné krvinka, oválný tvar, 2–4,0 μm
- alfa-granula, delta-granula (denziny) a lambda-granula (lysozomy)
- **hemostatická role**
- **funkce při vrozené a adaptivní imunitě a zánětu**
- zapojení v mechanismech **hojení ran a reparace tkání**
- alogenní koncentráty - prevence krvácení u pacientů postižených trombocytopenií nebo dysfunkcí trombocytů

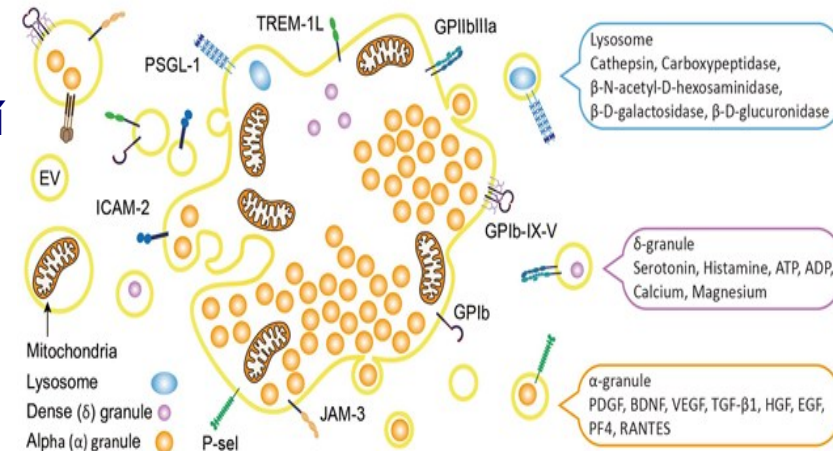


ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Co obsahují trombocyty?

- **alfa-granula** – obsahují fibrinogen, trombokinázu, směs proteinů, růstový faktor s mitogenními účinky hlavně na fibroblasty, destičkový faktor 4 (antagonista heparinu), glie a hladké svalové buňky, β -tromboglobulin, faktor V. aj.
- **delta-granula** (denzní) – obsahují serotonin, vápenaté ionty Ca^{2+} , pyrofosfát, ATP, ADP
- **lambda-granula** (lysosomy) – obsahují lysosomální enzymy
- rezervoár mnoha trofických faktorů, enzymů a signálních molekul
- unikátní soubor **extracelulárních vezikul**, které nesou bohatý biomolekulární náklad ovlivňující přímou komunikaci mezi buňkami
- výjimečné funkční uplatnění trombocytů a jejich extracelulárních vezikul vede ke zkoumání využití alogenních trombokoncentrátů jako **zdroj materiálu pro vývoj nových bioterapií v regenerativní medicíně a cíleného podávání léků**

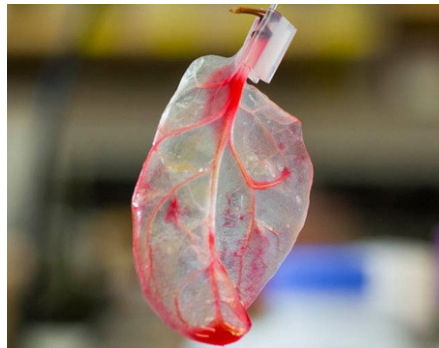


ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Co je to trombocytární lyzát a k čemu se dá použít?

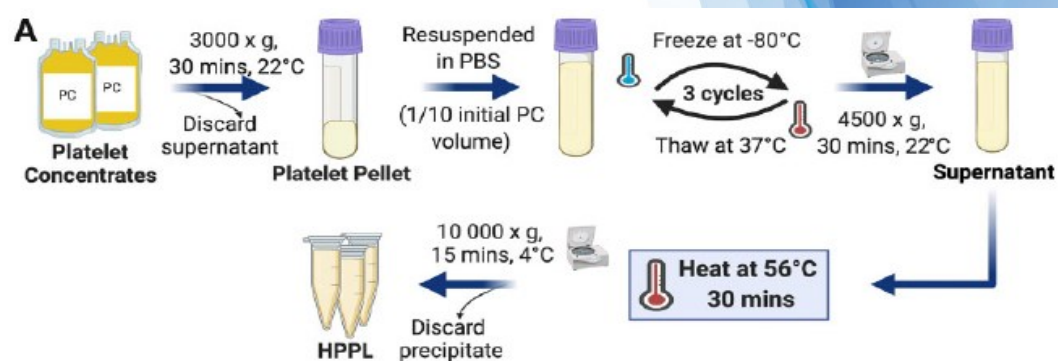
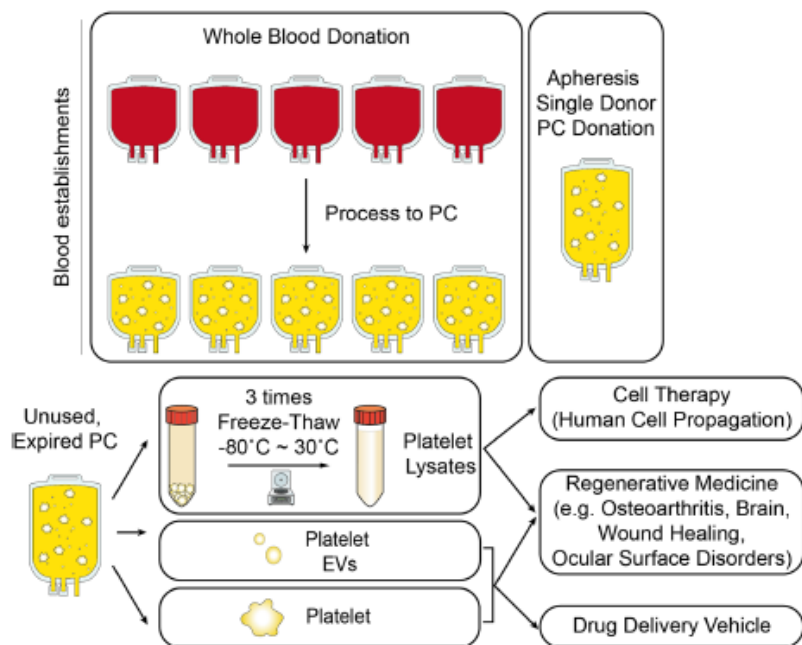
- směs lyzovaných autologních/alogenních expirovaných/neexpirovaných trombokonzentrátů
- náhrada fetálního bovinního séra jako klinický stupeň xeno-free doplněk růstového média používaného při in vitro kultivaci lidských buněk pro účely transplantace
- bioterapie poruch očního povrchu (suché oko), péče o rány a případně neurodegenerativních onemocnění, osteoartrózy a dalších.
- alogenní trombocyty snadno dostupný zdroj buněk a extracelulárních vehikul, které lze využít pro cílená vehikula pro podávání léků.



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Výroba trombocytárního lyzátu



- standartní trombocytární koncentráty vyrobené v zařízeních transfuzní služby
- expirované/neexpirované
- vyšetřené serologicky a NAT
- patogeninaktivace/redukce

Burnouf et al. Journal of Biomedical Science (2023) 30:79

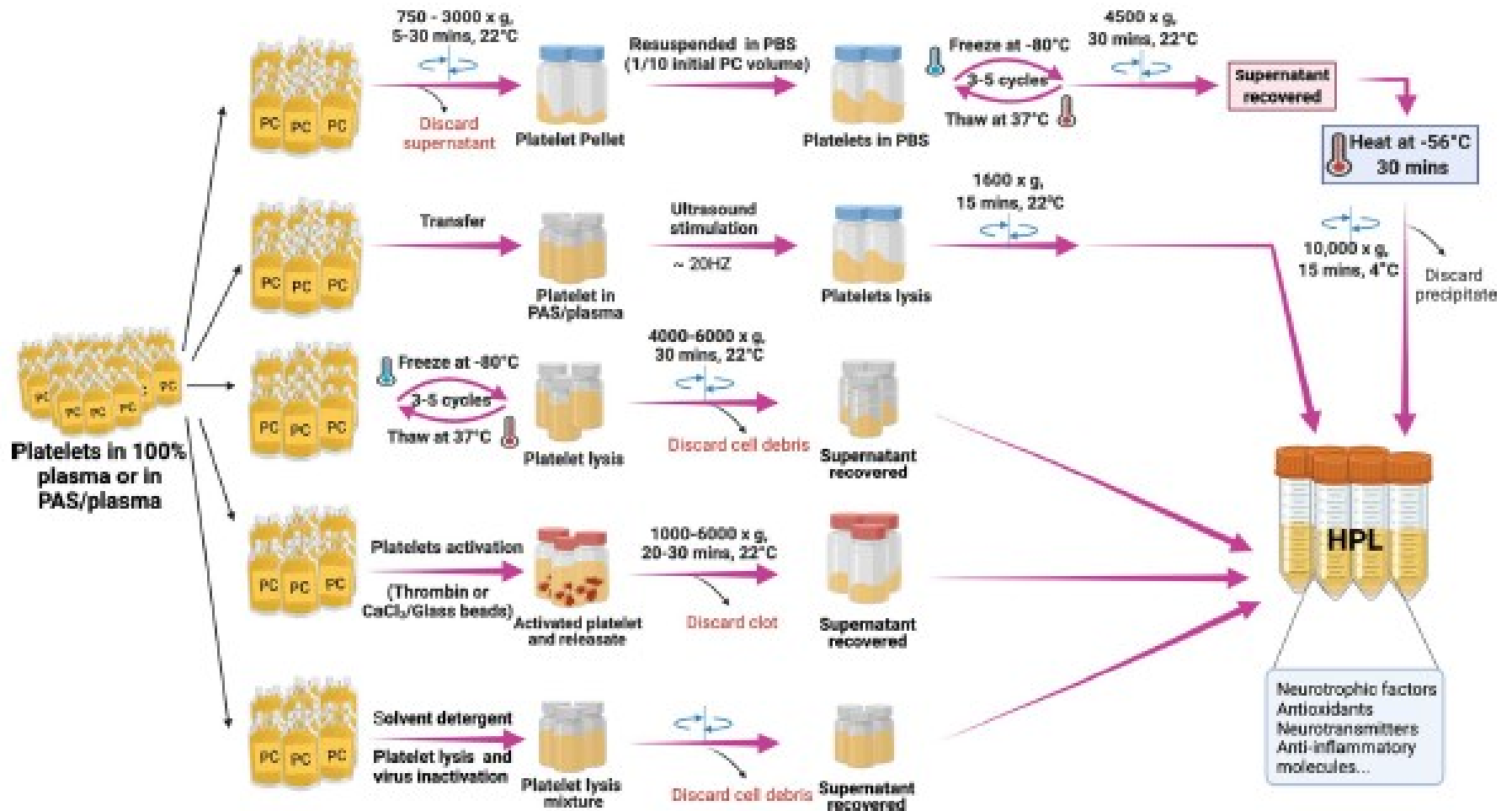
Nebie, Burnouf et al. Brain (2021) 144:3142



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

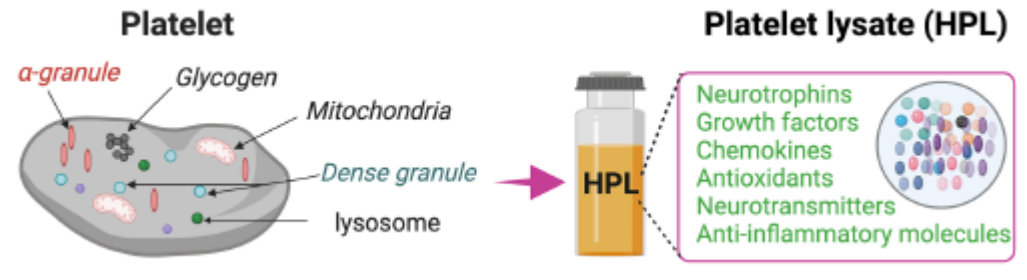
Další možnosti výroby trombocytárního lyzátu



Nebie, Burnouf et al. Brain (2021) 144:3142

Složení trombocytárního lyzátu

- Růstové faktory, cytokiny:
DNF, EGF, GSN, HGF, IGF, MANF, NENF, PF4, TGF- β , VEGF
- Chemické sloučeniny:
Vit B12, serotonin
- Chemokiny:
RANTES
- Antioxidanty:
CAT, CP, GPX, SOD, Trx (TXN), GCLM
- Interleukiny:
TIMP-1, IL-4
- Extracelulární vezikuly:
GFs, miR-126-3p (trofické faktory/proteiny, lipidy, (m)RNA a miRNA)
- mohou být doručeny vzdáleným buněčným příjemcům



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Funkce obsahu trombocytárního lyzátu

- alfa-granula obsahují, např destičkový růstový faktor (PDGF), transformující růstový faktor beta (TGF- β), růstový faktor vaskulárního endotelu (VEGF) a růstový faktor podobný inzulínu (IGF). Tyto **růstové faktory podporují buněčnou proliferaci, angiogenezi a regeneraci tkání**
- Faktory uvolňující trombocyty, včetně VEGF, PDGF, jaterní růstový faktor (HFG), a základní fibroblastový růstový faktor (bFGF), **faktory uvolňující trombocyty podporují tvorbu nového cévního zásobení, což usnadňuje opravu tkáně**
- Trombocyty uvolňují **enzymy a molekuly** podílející se na degradaci a remodelaci, jako je metaloproteináza (MMP)-2 a MMP-9. MMP-2 a MMP-9 **rozkládají proteiny jako kolagen a usnadňují remodelaci tkání během hojení ran**



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Funkce obsahu trombocytárního lyzátu

- Fibronektin a vitronektin - **glykoproteiny** zapojené do buněčné **adheze, migrace a hojení ran**. Fibronektin podporuje připojení a migraci buněk během opravy tkáně
- Trombocyty interagují s imunitními buňkami a uvolňují **imunomodulační molekuly**, včetně chemokinů a cytokinů, které přispívají k **regulaci zánětu a rekrutování imunitních buněk do míst poranění**
- Trofické faktory odvozené z trombocytů **přitahují a stimulují diferenciaci buněk** zapojených do opravy tkání, jako jsou mezenchymální kmenové buňky a fibroblasty, což **podporuje jejich migraci a proliferaci v místech poranění**
- Trombocyty **obsahují antimikrobiální peptidy a enzymy**, které pomáhají v boji množení bakterií v místech poškození tkáně, což snižuje riziko sekundárních infekcí



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Použití trombocytárního lyzátu při v neurologii?

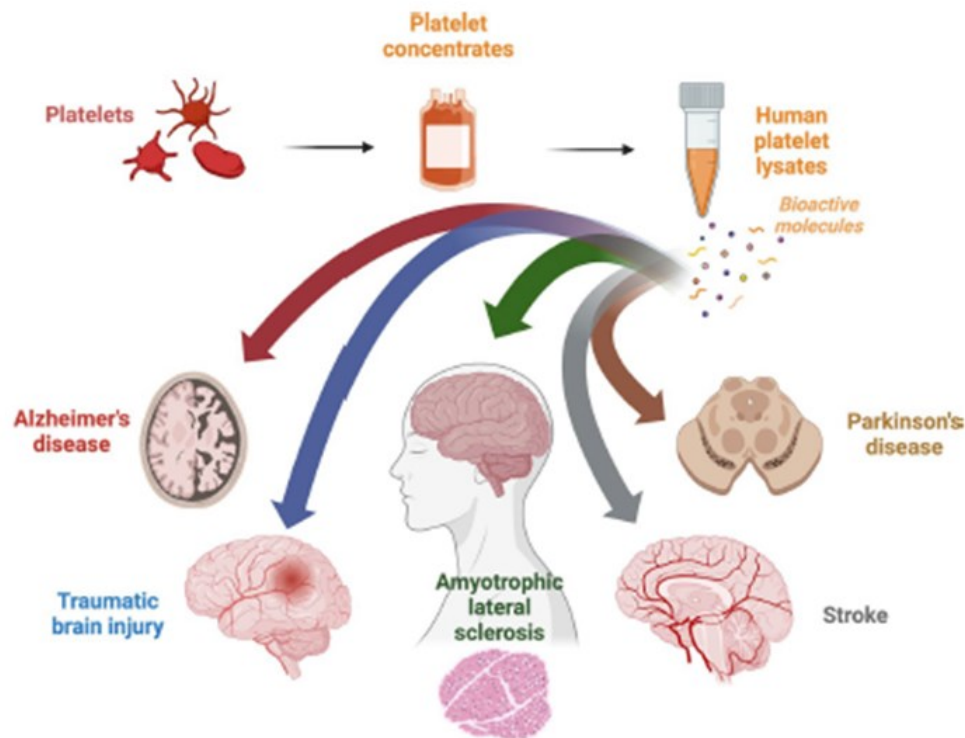
Proteom trombocytů, může aktivovat komplementární signální dráhy in vivo

Zodpovědné za:

- neuroprotekcí
- ochranu synapse
- protizánětlivý
- antioxidantní
- neuroregenerativní

Trombocytární lyzát je bezpečný a vedl k prospěšným neuroprotektivním účinkům

u zavedených modelů neurodegenerativních onemocnění **na hlodavcích** jako je **Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, traumatické poranění mozku a iktu.**



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Neurology, Burdakov et al. Cellular and Molecular Life Sciences (2022) 79:379

Neurology, Burdakov et al. Cellular and Molecular Life Sciences (2022) 79:379

Možné budoucí použití tromocytárního lyzátu

- **Regenerace rohovky:**

zvýšená životaschopnost, zvýšená rychlost hojení ran, silnější markery proliferace a zlepšená rychlost adheze

Widyaningrum R, Wu YW, Delila L, Lee DY, Wang TJ, Burnouf T. In vitro evaluation of platelet extracellular vesicles (PEVs) for corneal endothelial regeneration. Platelets. 2022 Nov 17;33(8):1237-1250.

- **Ochrana srdce po infarktu:**

velké zlepšení srdeční funkce, snížená tvorba jizev a podpořená angiogeneze

Livkisa D, Chang TH, Burnouf T, Czosseck A, Le NTN, Shamrin G, Yeh WT, Kamimura M, Lundy DJ. Extracellular vesicles purified from serum-converted human platelet lysates offer strong protection after cardiac ischaemia/reperfusion injury. Biomaterials. 2024 Apr;306:122502.



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Závěr a možné budoucí použití

- Alogenní trombokoncentráty jsou snadno dostupný zdroj trombocytárního lyzátu nebo extracelulárních vezikul pro použití v buněčné terapii, regenerativní medicíně a cílené distribuci léčiv
- Bezpečná a účinná substance, která může nahradit xenomateriál (FBS) jako doplněk růstového média ke kultivaci lidských buněk pro transplantaci na klinické úrovni primárně kmenových buněk nebo CAR-T buňek.
- Použití alogenních trombocytárních lyzátů pro vnitřní klinické použití je stále v ranné fázi
- Zatím bezpečné použití alogenních HPL jako alternativa tradičních očních kapek pro léčbu povrchových očních poruch, včetně syndromu suchého oka



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Závěr a možné budoucí použití

- budoucí preklinické a klinické studie budou zkoumat možnost použití alogenních HPL u jiných degenerativních patologií jako
 - léčba chronických kožních ran
 - degenerativních kloubních onemocnění
 - bioterapie k modulaci neurodegenerativních onemocnění
- Perspektivní použití u traumatických poranění a poranění mozku (použití i v kombinaci např. s nanovláknovým nosičem ev. i s bakteriofágy)
- Budoucí vehikula pro cílené podávání léčiv (chemoterapie) a jejich přesného zacílení



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Děkuji za pozornost!



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha