

# Journal of Transfusion Medicine

ISSN 1689-6017  
e-ISSN 2080-1505

Rok 2023, tom 16, nr 3

## **New classification criteria for antiphospholipid syndrome — 2023**

*Nowe kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego — 2023*

*Jacek Musiał*

## **Light transmission aggregometry in the diagnosis of thrombocytopathy**

*Testy agregometrii optycznej w diagnostyce trombocytopatii*

*Daria Malarczyk, Edyta Odnoczko*

## **Acquired haemophilia A treated with recombinant factor VIIa by an infusion pump and midline catheter**

*Nabyta hemofilia A leczona rekombinowanym czynnikiem VIIa z użyciem pompy infuzyjnej i wkłucia pośredniego*

*Wiktoria Ryżewska, Michał Witkowski, Tadeusz Robak*

## **Issues related to artificial tears were discussed at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023**

*Zagadnienia dotyczące sztucznych łez poruszone na 33. Regionalnym Kongresie International Society of Blood Transfusion (ISBT) w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku*

*Katarzyna Chmielewska, Joanna Janus, Jolanta Antoniewicz-Papis*

## **Selected issues regarding cell therapies in light of reports presented at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023**

*Wybrane zagadnienia dotyczące terapii komórkowych w świetle doniesień prezentowanych na 33. Regionalnym Kongresie International Society of Blood Transfusion (ISBT) w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku*

*Joanna Janus, Katarzyna Chmielewska, Jolanta Antoniewicz-Papis*







# Journal of Transfusion Medicine

Rok 2023, tom 16, nr 3

ISSN 1689-6017  
e-ISSN 2080-1505

**Redaktor naczelna:** Magdalena Łętowska  
**Zastępca redaktora naczelnego:** Jerzy Windyga  
**Sekretarz redakcji:** Krystyna Dudziak  
**Redaktor prowadzący:** Izabela Hallmann  
**Redaktorzy działów:**  
**Transfuzjologia kliniczna:** Ryszard Pogłód  
**Transfuzjologia laboratoryjna:** Piotr Grabarczyk  
**Hematologia i Hemostaza:** Jerzy Windyga

## Rada Naukowa:

Jean Pierre Allain (Anglia), Margarida Amil Diaz (Portugalia), Jolanta Antoniewicz-Papis, Ewa Brojer, Przemysław Juszczyński, Elżbieta Lachert, Ewa Lech-Marańda, Miquel Lozano (Hiszpania), Mario Muon (Portugalia), Edyta Odnoczko, Piotr Paluszkiwicz, Aleksandra Rosiek, Erwin Scharberg (Niemcy), Zbigniew Szczepiórkowski (Stany Zjednoczone)

**Journal of Transfusion Medicine** (ISSN 1689–6017, e-ISSN 2080–1505) jest czasopismem wydawanym cztery razy w roku przez VM Media Group sp. z o.o., Grupa Via Medica, ul. Świętokrzyska 73, 80–180 Gdańsk, tel.: 58 320 94 94; faks: 58 320 94 60; e-mail: viamedica@viamedica.pl; www.viamedica.pl

Wersja elektroniczna czasopisma znajduje się na stronie: <https://journals.viamedica.pl>

## Adres Redakcji:

Instytut Hematologii i Transfuzjologii  
Zakład Transfuzjologii  
ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa  
tel.: 22 349 63 71, tel./faks: 22 349 63 72  
e-mail: bloodorg@ihit.waw.pl

Zasady edycji i informacje dla autorów zamieszczono na stronie [www.jtm.viamedica.pl](http://www.jtm.viamedica.pl)

Prenumerata w wersji elektronicznej jest bezpłatna  
[https://journals.viamedica.pl/journal\\_of\\_transfusion\\_medicine/about/subscriptions](https://journals.viamedica.pl/journal_of_transfusion_medicine/about/subscriptions)

**Reklamy:** należy kontaktować się z wydawnictwem Via Medica, tel.: (58) 320 94 94; e-mail: [dsk@viamedica.pl](mailto:dsk@viamedica.pl)  
Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam.

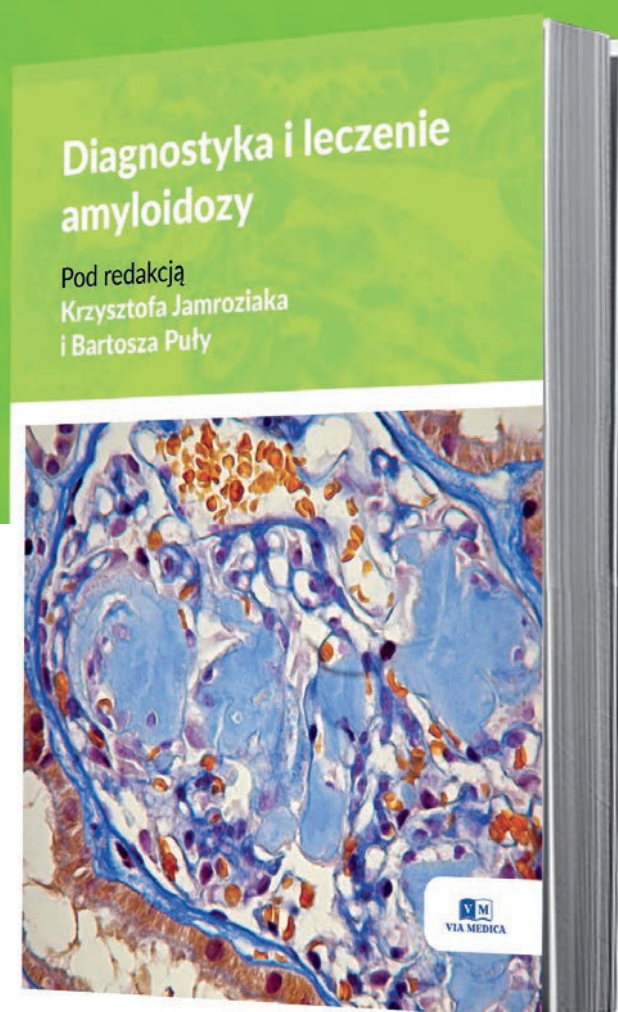
Wszelkie prawa zastrzeżone, włącznie z tłumaczeniem na języki obce. Żaden fragment tego czasopisma zarówno tekstu, jak i grafiki nie może być wykorzystywany w jakiegokolwiek formie. W szczególności zabronione jest dokonywanie reprodukcji oraz przekładanie na język mechaniczny lub elektroniczny, a także utrwalanie w jakiegokolwiek postaci, przechowywanie w jakimkolwiek układzie pamięci oraz transmitowanie, czy to w formie elektronicznej, mechanicznej czy za pomocą fotokopii, mikrofilmu, nagrań, skanów bądź w jakikolwiek inny sposób, bez wcześniejszej pisemnej zgody wydawcy. Prawa wydawcy podlegają ochronie przez krajowe prawo autorskie oraz konwencje międzynarodowe, a ich naruszenie jest ścigane pod sankcją karną.

Czasopismo jest indeksowane w bazach *CrossRef*, *EBSCO*, *Free Medical Journals*, *Google Scholar*, Głównej Biblioteki Lekarskiej, *Index Copernicus* (76,83), Ministerstwa Edukacji i Nauki (70), Polskiej Bibliografii Naukowej, *Ulrich's Periodicals Directory*, *WorldCat*.



# Diagnostyka i leczenie amyloidozy

Pod redakcją  
Krzysztofa Jamroziaka  
i Bartosza Puły



**KSIĄŻKA DOSTĘPNA  
W INTERNETOWEJ KSIĘGARNI  
MEDYCZNEJ IKAMED**



19-0309.004.002



Polska  
Sieć  
Amyloidozy



Polskie  
Konsorcjum  
Szpiczakowe



CENTRUM DOSKONAŁOŚCI  
CHOROÓB RZADKICH  
I NIEZDIAGNOZOWANYCH

WARSZAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY

 **ikamed.pl**  
Internetowa księgarnia medyczna

 **VIA MEDICA**

# Journal of Transfusion Medicine

2023, tom 16, nr 3

ISSN 1689-6017  
e-ISSN 2080-1505

## CONTENTS

### GUIDELINES

- New classification criteria for antiphospholipid syndrome — 2023**  
Jacek Musiał ..... 103

### REVIEW ARTICLE

- Light transmission aggregometry in the diagnosis of thrombocytopathy**  
Daria Malarczyk, Edyta Odnoczko..... 117

### CASE REPORT

- Acquired haemophilia A treated with recombinant factor VIIa by an infusion pump and midline catheter**  
Wiktoria Ryzewska, Michał Witkowski, Tadeusz Robak ..... 136

### CONGRESS REPORT

- Issues related to artificial tears were discussed at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023**  
Katarzyna Chmielewska, Joanna Janus, Jolanta Antoniewicz-Papis..... 146

### REPORT

- Selected issues regarding cell therapies in light of reports presented at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023**  
Joanna Janus, Katarzyna Chmielewska, Jolanta Antoniewicz-Papis..... 154

## SPIS TREŚCI

### WYTYCZNE

- Nowe kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego — 2023**  
Jacek Musiał ..... 110

### ARTYKUŁ POGLĄDOWY

- Testy agregometrii optycznej w diagnostyce trombocytopatii**  
Daria Malarczyk, Edyta Odnoczko..... 126

### ARTYKUŁ KAZUISTYCZNY

- Nabyta hemofilia A leczona rekombinowanym czynnikiem VIIa z użyciem pompy infuzyjnej i wkłucia pośredniego**  
Wiktoria Ryzewska, Michał Witkowski, Tadeusz Robak ..... 141

### STRESZCZENIE KONGRESOWE

- Zagadnienia dotyczące sztucznych łez poruszone na 33. Regionalnym Kongresie *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku**  
Katarzyna Chmielewska, Joanna Janus, Jolanta Antoniewicz-Papis..... 150

### SPRAWOZDANIE

- Wybrane zagadnienia dotyczące terapii komórkowych w świetle doniesień prezentowanych na 33. Regionalnym Kongresie *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku**  
Joanna Janus, Katarzyna Chmielewska, Jolanta Antoniewicz-Papis..... 160



# New classification criteria for antiphospholipid syndrome — 2023

Jacek Musiał 

II Department of Internal Medicine, Jagiellonian University, Medical College, Kraków, Poland

## Summary

*Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disorder characterized by the clinical presence of thrombotic episodes, and — in women — obstetric complications with the laboratory presence of antiphospholipid antibodies in blood. The main objective of this report is to present in detail the new American College of Rheumatology (ACR)/Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) APS classification criteria. According to EULAR methodology they include entry criterion indispensable to initiate classification process and contain 8 clinical and laboratory domains allowing to classify patient as having APS with 99% specificity.*

**Keywords:** antiphospholipid syndrome; antiphospholipid antibodies; lupus anticoagulant; thrombosis; obstetric complications; classification criteria

*J. Transf. Med. 2023; 16: 103–109*

## Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is characterized by clinical symptoms of venous or arterial thrombosis (and obstetric complications in women) and the presence of antiphospholipid autoantibodies (aPL) in the patient's plasma. These include lupus anticoagulant (LA) detected by coagulation-based functional assay as well as anti-cardiolipin antibodies (aCL) and anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies (a $\beta_2$ -GPI) directed against complexes of proteins and negatively charged phospholipids detected by solid-phase assays.

APS is a systemic autoimmune disorder (probably one of the most common), the etiology of which is unknown and the pathogenesis includes a role of heterogeneous group of antiphospholipid autoantibodies. Clinical manifestations co-existing with the occurrence of these autoantibodies are quite common and in the general population may be

attributable to other causes. It is therefore necessary to single out and describe the laboratory and clinical features characteristic for this syndrome in order to develop classification criteria allowing research in a relatively homogeneous groups of patients. Such criteria are primarily used to include patients into clinical trials on pathogenesis, diagnostics and management of the disease.

APS classification criteria were last developed at the Sapporo congress and published in 2006 [1]. In brief: the Sapporo criteria for APS require that the patient meets at least one clinical criterion (macrovascular, or microvascular thrombosis, and in women — obstetric complications) and one laboratory criterion (presence of lupus anticoagulant LAC and/or aCL and/or a $\beta_2$ -GPI antibodies of the IgG or IgM class in moderate to high titers).

From the very beginning it was pointed out that the suggested criteria did not include some clinical and laboratory aspects. Firstly, they did not

**Correspondence address:** prof. dr hab. n. med. Jacek Musiał, II Department of Internal Medicine, Jagiellonian University, Medical College, ul. Skawińska 8, 31–066 Kraków, Polska, e-mail: jacek.musial@uj.edu.pl  
 Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 25.09.2023

Accepted: 02.10.2023

Early publication date: 11.10.2023

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.



consider several other clinical manifestations not suggestive of thrombosis but often co-existing with aPL such as thrombocytopenia, hemolytic anemia, valvular heart lesions, nephropathy, and a number of less frequent thrombotic microangiopathy — related symptoms. At that time, this was explained mostly by low specificity of these symptoms. Moreover, since the publication of these criteria new types of antiphospholipid antibodies have been described which strongly correlated with thrombotic symptoms of the syndrome. Most prominent among them are antibodies against domain I of  $\beta_2$ -glycoprotein I (aDI) — the domain against which most pathogenic antiphospholipid antibodies were to be directed [2]. Other antibodies manifesting strong correlation with the presence of lupus anticoagulant are antibodies directed against phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) complexes [3]. They were even included in the proposed global anti-phospholipid syndrome score (GAPSS) [4]. Questions have also been raised about the possible independent role of IgA antiphospholipid antibodies [5].

It also became obvious that the risk of developing clinical symptoms, mostly thrombotic events, varies and depends on the type, titer and nature (persistent/transient) of the detected antibodies. On the other hand, in some patients, symptoms of thrombosis (as well as others) may have been explained by risk factors not related to antiphospholipid antibodies, e.g. by classic cardio-vascular risk factors.

In light of the above and based on the new scientific data published after 2006, an attempt was made to develop new classification criteria following recommendations of the European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR). Already at the initial stage of work, the number of considered clinical symptoms was reduced, and aDI, aPS/PT and IgA antibodies were eliminated, mainly because they showed no independent diagnostic value (independent of co-occurring aPL, hitherto included in the APS diagnostic criteria), with no additional contribution to the specificity of existing laboratory criteria [6]. Therefore, only lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies and antibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein I of IgG and IgM class remained as in original list of the Sapporo criteria.

In 2023 the new antiphospholipid syndrome classification criteria were finally published, following the standardized EULAR methodology. The new set of criteria was developed by a group of experts of the American College of Rheumatology

(ACR) and EULAR [7, 8]. The new criteria differ from the Sapporo criteria in several aspects [7, 8].

Firstly, entry criteria were introduced which had to be fulfilled for the patient to be classified (Fig. 1). The maximum interval between the occurrence of the clinical symptom/clinical criterion and detection of antiphospholipid antibody was reduced to 3 years. Clinical symptoms and laboratory criteria were divided into domains and in each of them the symptoms and laboratory test results were assigned certain weight expressed as score-points. The list of clinical symptoms was markedly expanded to include a number of new ones as well as some omitted from the Sapporo version. As regards thrombosis transfusion-related clinical symptoms, much emphasis was devoted to deciding whether the observed symptom, (non-specific to APS only) may be otherwise explained. In the current APS classification only criterion with the highest weight within one domain should be included. A patient who meets the entry criteria and accumulates at least 3 points from each of the clinical and laboratory domains is classified as having APS.

According to EULAR methodology, the latest criteria allow to classify patients as having APS with 99% specificity and 84% sensitivity. It is worth mentioning here that classification criteria should not be confused with diagnostic criteria. The former are used to single out homogeneous groups of patients for further research.

Figure 1 presents the classification process and the clinical and laboratory domains. We then present fairly detailed definitions of classification criteria with their specific ontology and explanation.

## Definitions of criteria used in antiphospholipid syndrome classification [7, 8]

### Clinical criteria

#### **Domain 1. Macrovascular (venous thromboembolism)**

Venous thromboembolism (VTE) otherwise unexplained and confirmed by appropriate testing for: pulmonary embolism, deep vein thrombosis of lower extremities, splanchnic and renal vein thrombosis, cerebral venous thrombosis and retinal vein occlusion as well as others.

#### High VTE risk profiles:

- a) any VTE high risk factor such as:
- **active malignancy** — ongoing curative treatment (hormonal therapy included); disease

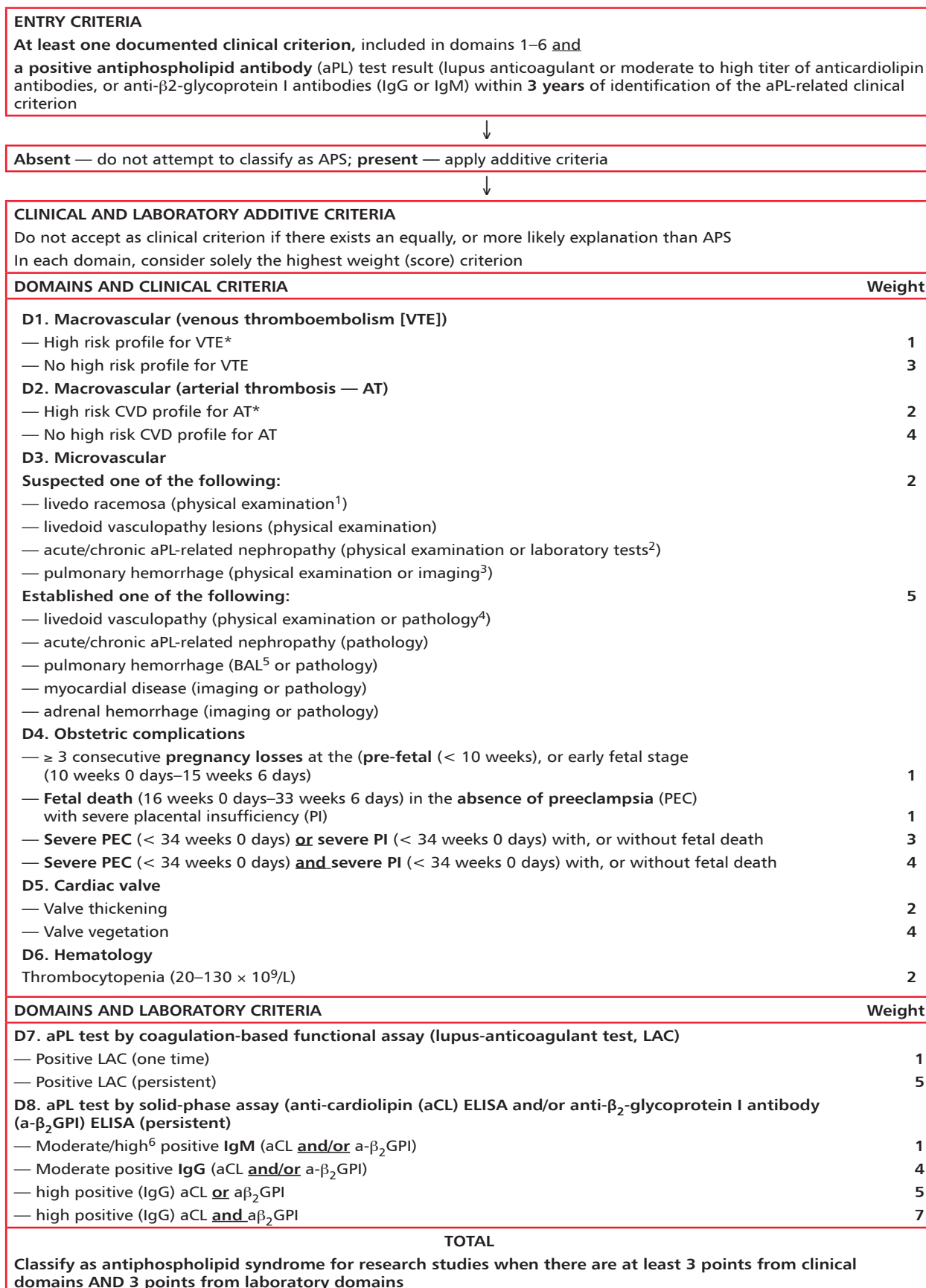


Figure 1. Antiphospholipid syndrome (APS) classification criteria — 2023 ACR/EULAR [7, 8]

\*Factors related to VTE and AT risk — see below; <sup>1</sup>physical examination — the suspicion based on physical examination; <sup>2</sup>lab. — clinical suspicion based on laboratory findings; <sup>3</sup>imaging — clinical suspicion based on imaging; <sup>4</sup>pathol. — diagnosis based on histo-pathological tests; <sup>5</sup>BAL — bronchoalveolar lavage; <sup>6</sup>moderate positive antibodies 40–79 U, high positive ≥ 80 U

recurrence/progression during/despite treatment of the VTE episode;

- **emergency hospitalization** with at least 3 day bed confinement within 3 months prior to the VTE event;
  - **major trauma** with limb fractures, spinal cord injury within one month prior to the VTE event;
  - surgery with general/spinal/epidural anaesthesia for > 30 minutes within 3 months prior to VTE event; or
- b) at least two minor risk factors, i.e.:
- **active systemic autoimmune disease or active inflammatory bowel disease;**
  - **acute/active infection**, e.g.: sepsis, pneumonia, SARS-CoV-2;
  - **central venous catheter** in the same vascular bed;
  - **hormone replacement therapy, with estrogen containing oral contraceptives or ongoing in vitro fertilization treatment;**
  - **long distance travel** ( $\geq 8$  hours);
  - **obesity** ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ );
  - **pregnancy or postpartum period** (within 6 weeks of delivery);
  - **prolonged immobilization** for other reasons than those already mentioned i.e. lower limb injury associated with reduced mobility or out-of-hospital confined to bed > 3 day;
  - **surgical procedure** — as above but with general/spinal/epidural anesthesia of < 30 minutes within 3 months prior to VTE event.

### **Domain 2. Macrovascular (arterial thrombosis)**

Arterial thrombosis otherwise unexplained and confirmed by appropriate testing for: myocardial infarction, peripheral/splanchnic/retinal artery thrombosis, stroke, and other organ infarcts (kidney, liver, or spleen) — in the absence of visualised thrombus.

High risk cardiovascular disease (CVD) profile — presence of one or more than one high-risk CVD factors or three or more moderate-risk CVD factors if timeline/severity is associated with the event based on the investigator/s judgement.

- a) High risk factors for CVD any of the following at the time of the event:
- **arterial hypertension**, with systolic blood pressure  $\geq 180$  mmHg or diastolic blood pressure  $\geq 110$  mmHg;
  - **chronic kidney disease** with estimated glomerular filtration rate (GFR)  $\leq 60$  mL/min, for more than 3 months;

- **diabetes melitus** with organ damage or long duration (type 1  $\geq 20$  years, type 2  $\geq 10$  years);
  - **hyperlipidemia** (severe); total cholesterol  $\geq 310$  mg/dL (8 mmol/L) or low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol  $> 190$  mg/dL (4.9 mmol/L);
- b) moderate CVD risk factors:
- **arterial hypertension** on treatment, or with systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg;
  - **current tobacco smoking;**
  - **diabetes mellitus**, with no organ damage and short duration (type 1 < 20 years; type 2 < 10 years);
  - **hyperlipidemia** (moderate) on treatment or total cholesterol above normal but < 310 mg/dL (8 mmol/L), or LDL-cholesterol < 190 mg/dL (4.9 mmol/L);
  - **obesity** ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ).

### **Domain 3. Microvascular**

**Suspected** (based on physical examination, clinical symptoms, imaging or laboratory tests):

- **livedo racemosa** — violaceous, net-like, blotchy mottling of the skin. irregular, patchy, persistent skin lesions, reticulated and asymmetrical, nonuniform, irreversible; broken and asymmetric persistent discoloring should be differentiated from *livedo reticularis* with uniform, reversible, unbroken and symmetric discoloration and should not be scored. *Livedo reticularis* is not included in the APS classification criteria;
- **livedoid vasculopathy lesions** — otherwise unexplained painful papules and violaceous purpuric plaques, which may rapidly evolve into hemorrhagic vesicles or bullae; if ruptured, may result in small, painful ulcers or reticulate, confluent, geometric and painful ulcers;
- **antiphospholipid antibody (aPL) nephropathy.**  
Otherwise unexplained, persistent:
  - a) arterial hypertension — new-onset hypertension or deterioration of previously well-controlled hypertension;
  - b) proteinuria  $\geq 0.5$  g/24 hour urine specimen or protein/creatinine ratio 0,5 (mg/mg, or 50 mg/mmol); /day or protein/creatinine ratio  $\geq 0.5$  mg/mg (50 mg/mmol);
  - c) acute renal failure serum (creatinine level increased above normal), or
  - d) glomerular microscopic hematuria.



**Pulmonary hemorrhage** (by clinical symptoms and imaging); respiratory symptoms (dyspnoea, cough, hemoptysis) and otherwise unexplained pulmonary infiltrates or imaging suggestive of pulmonary hemorrhage.

**Confirmed/established:**

- **livedoid vasculopathy** — by pathology, once livedoid vasculopathy lesions are present. Otherwise unexplained thrombosis of the small dermal vessels and/or endothelial proliferation.
- **aPL nephropathy** (by pathology once suspected aPL nephropathy definition is fulfilled): a) acute glomerular or and renal vascular thrombotic microangiopathy lesions including fibrin thrombi in the arterioles or glomeruli, without inflammatory cells and immune complexes, b) chronic glomerular and renal vascular lesions, described as: arterial or arteriolar microthrombi with, or without recanalization; fibrous, or fibrocellular occlusion of vessels; focal cortical atrophy; fibrous and fibrocellular (arterial or arteriolar) occlusions, focal cortical atrophy with or without thyroïdization, fibrous intimal hyperplasia or chronic/organized glomerular thrombi. *Note:* in patients with systemic lupus erythematosus, aPL nephropathy occurs independent of lesions attributable to lupus nephritis;
- **pulmonary hemorrhage** — by histopathology or bronchoalveolar lavage (BAL) — otherwise unexplained progressive hemorrhagic return on BAL or hemosiderin-laden macrophages (> 20%) or lung biopsy demonstrating capillaritis or microthrombosis;
- **myocardial disease** (by imaging, or histopathology). Otherwise unexplained non-ST segment elevation myocardial infarction and with a normal coronary angiogram (myocardial infarction with nonobstructive coronary arteries, MINOCA) and cardiac magnetic resonance imaging (CMRI) abnormalities including: a) late gadolinium enhancement, b) T2 abnormalities, or c) perfusion MRI abnormalities. OR histologically by thrombosis of the small vessels of the heart.

**Adrenal hemorrhage or microthrombosis** (by imaging or pathology). Otherwise unexplained CT or MRI demonstrating hemorrhage, histologically by thrombosis of the adrenal(micro) vasculature, eg. adrenal plexus, adrenal vein.

**Domain 4. Obstetric complications**

**Prefetal death (preembryonic or embryonic loss)** — otherwise unexplained pregnancy loss before 10 weeks and 0 days of gestation.

**Fetal death** — otherwise unexplained pregnancy loss between 10. w. 0 d. and 15 w. 6 d. of gestation (early fetal death), or between 16 w. 0 d. and 34 w. 0 d. of gestation. *Note:* If a detailed analysis of the fetal morphology or genetic constitution are unavailable, reasonable clinical judgement should be used based on review of available medical records.

**Preeclampsia with severe features**

**Preeclampsia**, defined as **hypertension**; systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg on 2 occasions at least 4 hours apart **after 20 weeks** of gestation in a previously normotensive or hypertensive patient (a sudden blood pressure elevation and/or proteinuria after 20 weeks of pregnancy), **and proteinuria** (also after 20 weeks of pregnancy), determined as a) proteinuria  $\geq 0.3$  mg/mg (30 g/mmol) in a random urine specimen, or b) dipstick protein  $\geq 2+$  strip test.

**The definition of severe preeclampsia includes the above symptoms plus at least one of the following severe features:**

- **severe blood pressure elevation** — systolic blood pressure  $\geq 160$  mmHg or diastolic blood pressure  $\geq 110$  mmHg on 2 occasions, at least 4 hours apart, when the patient is on bed rest (antihypertensive therapy can be started on confirmation of severe blood pressure elevation in which case the 4-hour wait criterion does not apply);
- **central nervous system dysfunction (CSN):** new-onset headache, not accounted for by other diagnosis and unresponsive to medication;
- **visual disturbances;**
- **pulmonary edema;**
- **impaired liver function** — elevated blood concentrations of liver enzymes (more than twice the upper limit of normal concentration) or severe, persistent right upper quadrant or epigastric pain unresponsive to medication and not accounted for by another diagnosis;
- **renal dysfunction** — serum creatinine concentration  $> 1.1$  mg/dL or a doubling of the serum creatinine concentration in the absence of other renal disease;
- **thrombocytopenia** platelet count of  $< 100 \times 10^9/L$ .

### **Placental insufficiency with severe features:**

- **intrauterine fetal growth restriction** defined as biometry indicating estimated fetal weight of less than the 10th percentile for gestational age or postnatal birth weight less than the 10th percentile for gestational age in the absence of fetal-neonatal syndromes or conditions associated with growth restriction **and**;
- **abnormal or non-reassuring fetal surveillance tests** suggestive of fetal hypoxemia;
- **abnormal doppler flow velocimetry waveform** analysis suggestive of fetal hypoxemia;
- **severe intrauterine fetal growth restriction** — suggested by fetal biometry indicating an estimated fetal or postnatal weight of < 3rd percentile for gestational age;
- **oligohydramnios** — according to obstetric criteria;
- **maternal vascular malperfusion on histology** — suggested by placental thrombosis/infarction, inadequate remodelling of the uterine spiral arteries (decidual vasculopathy), decreased vasculosyncytial membranes, increased syncytial knots, or decidual inflammation. These findings are not specific for APS.

### **Domain 5: Cardiac valves**

**Valve thickening** (otherwise unexplained) — based on echocardiographic criteria, mitral valve thickening is defined as > 4 mm between ages 20–39 years and > 5 mm for those older than age 40 years; and > 3 mm for other valves for any age. Valve thickening can be associated with valvular dysfunction (regurgitation or stenosis).

**Valve vegetations** (otherwise unexplained) — based on the American Society of Echocardiography guidelines [9], valve vegetation is defined as shaggy, lobulated or rounded masses typically located on the atrial side of the atrioventricular valves (mitral and tricuspid valves) or ventricular side of the aortic valve, variable in size, usually < 1 cm. Unlike lesions in infective endocarditis, they are not related to valve damage but may be associated with regurgitation or valve stenosis.

### **Domain 6. Hematology**

**Thrombocytopenia** — otherwise unexplained lowest platelet count ever between 20 and  $130 \times 10^9/L$ , confirmed by peripheral blood smear and repeat testing.

## **Laboratory criteria**

### **Domain 7. Antiphospholipid antibody test (aPL) by coagulation-based functional assay**

Lupus anticoagulant (LAC) assay used and interpreted based on ISTH guidelines [10]. A three-step procedure is recommended. Results of LAC testing should be interpreted with caution because false positive or false negative test results can occur during anticoagulation treatment as acute-phase response due to acute-phase reactants or in pregnancy due to increase in blood coagulation factors. Samples from patients receiving anticoagulants should be marked positive or negative only by individuals with expertise in performing and interpreting the LAC assay.

### **Domain 8. Antiphospholipid antibodies (aPL) determined by solid phase-based assay**

Anticardiolipin antibodies (aCL) and anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibody (a $\beta_2$ GPI) — thresholds of **moderate** (40–79 U) and **high** ( $\geq 80$  U) should be determined based on standardized immunoenzymatic assays (ELISA) with solid-phase antigen binding. New automated platforms with variations of the solid-phase modifications (eg. magnetic microparticles and microspheres) and various detection systems (e.g. chemiluminescent immunoassay (CLIA), multiplex flow immunoassay (MFI) or flow cytometry ) should not be used for the purpose. The correlation of the numerical values between the moderate/high values of ELISA and automated platforms varies substantially. Therefore these data can only provide guidance but for classification purposes they can be used only after additional validation studies and publication of new guidelines issued by the SSC subcommittee of Lupus Anticoagulant (LAC/aPL) of ISTH.

## **Conclusions**

The presented classification criteria allow to identify patients with high likelihood of having antiphospholipid syndrome (APS) and to include them into clinical trials devised to improve diagnosis and management of APS. Presently however, the very determination of the type and titer of antiphospholipid antibodies is sufficient to assess the future risk of clinical complications [11] and to make appropriate decisions regarding anticoagulant treatment and duration [12, 13].

**Conflict of interest:** none declared

## References

- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4(2): 295–306, doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x, indexed in Pubmed: 16420554.
- Pelkmans L, de Laat B. Antibodies against domain I of  $\beta$ -glycoprotein I: the one and only? *Lupus.* 2012; 21(7): 769–772, doi: 10.1177/0961203312437439, indexed in Pubmed: 22635228.
- Sciascia S, Khamashta MA, Bertolaccini ML. New tests to detect antiphospholipid antibodies: antiprothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies. *Curr Rheumatol Rep.* 2014; 16(5): 415, doi: 10.1007/s11926-014-0415-x, indexed in Pubmed: 24609824.
- Sciascia S, Radin M, Sanna G, et al. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology (Oxford).* 2013; 52(8): 1397–1403, doi: 10.1093/rheumatology/kes388, indexed in Pubmed: 23315788.
- Meijide H, Sciascia S, Sanna G, et al. The clinical relevance of IgA anticardiolipin and IgA anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antiphospholipid antibodies: a systematic review. *Autoimmun Rev.* 2013; 12(3): 421–425, doi: 10.1016/j.autrev.2012.08.002, indexed in Pubmed: 22951216.
- Barbhaiya M, Zuily S, Ahmadzadeh Y, et al. Development of a New International Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria Phase I/II Report: Generation and Reduction of Candidate Criteria. *Arthritis Care & Research.* 2021; 73(10): 1490–1501, doi: 10.1002/acr.24520, indexed in Pubmed: 33253499.
- Barbhaiya M, Zuily S, Naden R, et al. 2023 American College of Rheumatology (ACR)/ European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria. *Ann Rheum Dis.* ; 2023, doi: 1.1136/ard-2023-224609.
- Barbhaiya M, Zuily S, Naden R, et al. 2023 American College of Rheumatology (ACR)/ European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria. *Arthritis Rheumatol.* ; 2023, doi: 10.1002/art.42629, indexed in Pubmed: 37327357.
- Mitchell C, Rahko PS, Blauwet LA, et al. Guidelines for Performing a Comprehensive Transthoracic Echocardiographic Examination in Adults: Recommendations from the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2019; 32(1): 1–64, doi: 10.1016/j.echo.2018.06.004, indexed in Pubmed: 30282592.
- Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(11): 2828–2839, doi: 10.1111/jth.15047, indexed in Pubmed: 33462974.
- Devreese K, Ortel TL, Pengo V, et al. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2018; 16(4): 809–813, doi: 10.1111/jth.13976, indexed in Pubmed: 29532986.
- Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis.* 2019; 78(10): 1296–1304, doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215213, indexed in Pubmed: 31092409.
- Giarretta I, Ageno W, Dentali F. Lack of efficacy of direct oral anticoagulants compared to warfarin in antiphospholipid antibody syndrome. *Haematologica.* 2022; 107(11): 2737–2741, doi: 10.3324/haematol.2022.281586, indexed in Pubmed: 35861020.

# Nowe kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego — 2023

Jacek Musiał 

II Katedra Chorób Wewnętrznych im. Prof. Andrzeja Szczeklika,  
 Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Musiał J. New classification criteria for antiphospholipid syndrome — 2023. *J Transf Med* 2023; 16 (3): 103–109. DOI: 10.5603/jtm.97795. Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

Zespół antyfosfolipidowy (APS) jest ogólnoustrojowym schorzeniem autoimmunologicznym, który charakteryzuje się klinicznym występowaniem epizodów zakrzepowych, a u kobiet także powikłań położniczych, oraz laboratoryjną obecnością we krwi przeciwciał antyfosfolipidowych. Zasadniczym celem pracy jest szczegółowe przedstawienie nowych kryteriów klasyfikacyjnych APS, opracowanych przez American College of Rheumatology (ACR) i Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR). Zgodnie z metodologią EULAR zawierają one kryterium wstępne, którego spełnienie jest niezbędne, aby rozpocząć proces klasyfikacji, oraz składają się z 8 domen klinicznych i laboratoryjnych, pozwalających zakwalifikować chorego jako cierpiącego na APS z 99-procentową swoistością.

**Słowa kluczowe:** zespół antyfosfolipidowy; przeciwciała antyfosfolipidowe; antykoagulant tocznia; zakrzepica; powikłania położnicze; kryteria klasyfikacyjne

*J. Transf. Med.* 2023; 16: 110–116

## Wstęp

Zespół antyfosfolipidowy (APS, *antiphospholipid syndrome*) to schorzenie, w którym współwystępują kliniczne objawy zakrzepicy żyłnej lub tętniczej, a u kobiet także powikłań położniczych z obecnością w osoczu chorego autoprzeciwciał antyfosfolipidowych (aPL, *antiphospholipid antibodies*). Należą do nich: wykrywany metodami koagulometrycznymi antykoagulant toczniowy (LA, *lupus anticoagulant*) oraz wykrywane metodami immunologicznymi przeciwciała skierowane przeciwko kompleksom białek i ujemnie naładowanych fosfolipidów, do których należą: przeciwciała antykardiolipinowe (aCL, *anti-cardiolipin antibodies*) i przeciwciała skierowane przeciwko  $\beta_2$ -glikoproteinie I ( $\text{a}\beta_2\text{-GPI}$ , *anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies*).

Jest to zatem schorzenie autoimmunologiczne (prawdopodobnie jedno z najczęstszych), którego etiologia nie jest znana, a w patogenezie uwzględnia się rolę autoprzeciwciał o dość heterogennej charakterystyce. Współistniejące z tymi autoprzeciwciałami objawy kliniczne występują często i są wywoływane w ogólnej populacji szeregiem innych, znanych przyczyn. W takiej sytuacji konieczne jest

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Jacek Musiał, II Katedra Chorób Wewnętrznych im. Prof. Andrzeja Szczeklika, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Skawińska 8, 31-066 Kraków, e-mail: jacek.musial@uj.edu.pl

Nadesłano: 25.09.2023

Przyjęto do druku: 26.09.2023

Data pierwszej publikacji: 11.10.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.



wyodrębnienie i opisanie charakterystycznych dla zespołu, powiązanych ze sobą cech laboratoryjnych i klinicznych, aby na ich podstawie stworzyć kryteria klasyfikacyjne, które pozwolą prowadzić badania nad w miarę jednolitymi grupami chorych. Kryteria służą przede wszystkim dla klasyfikowania chorych włączanych do badań naukowych nad patogenezą, diagnostyką i leczeniem wyodrębnionych zespołów chorobowych.

Takie ostatnie kryteria klasyfikacyjne dla zespołu antyfosfolipidowego opracowano w czasie konferencji w Sapporo i opublikowano w 2006 roku [1]. Pokróćce: dla zakwalifikowania zespołu wykrytych objawów jako pewnego zespołu antyfosfolipidowego konieczne było spełnienie jednego kryterium klinicznego (zakrzepica żylna, tętnicza lub zakrzepica drobnych naczyń, a u kobiet powikłania położnicze) i jednego kryterium laboratoryjnego (obecność antykoagulantu tocznia i/lub obecności w umiarkowanym lub wysokim mianie przeciwciał aCL i/lub  $\beta_2$ -GPI w klasie IgG lub IgM).

Już od początku zwracano uwagę, iż zaproponowane kryteria nie uwzględniają wielu aspektów klinicznych i laboratoryjnych. Po pierwsze, nie uwzględniono w nich szeregu innych objawów klinicznych, które nie miały podłoża zakrzepowego, a często współwystępowały z obecnością aPL. Należą tu: małopłytkowość, niedokrwistość hemolityczna, zmiany zastawkowe serca, nefropatia oraz wiele rzadszych objawów związanych z współistnieniem mikroangiopatii zakrzepowej. Tłumaczono to wówczas głównie małą swoistością wyżej wymienionych objawów. Ponadto, od czasu ukazania się kryteriów opisano nowe rodzaje przeciwciał antyfosfolipidowych, wiążących się silnie z zakrzepowymi objawami zespołu. Wśród nich wyróżnia się przede wszystkim przeciwciała przeciwko domenie I  $\beta_2$ -glikoproteiny I (aDI) — domenie przeciwko której miałyby być skierowana większość patogennych przeciwciał antyfosfolipidowych [2]. Innymi przeciwciałami, które wykazują silny związek z obecnością antykoagulantu toczniowego, są przeciwciała skierowane przeciwko kompleksom fosfatydyloseryna/protrombina (aPS/PT) [3]. Stały się one nawet elementem sugerowanej skali oceny ryzyka zakrzepicy (GAPSS, *global antiphospholipid syndrome score*) u chorych z zespołem antyfosfolipidowym [4]. Pojawiły się także pytania o ewentualną niezależną rolę obecności przeciwciał antyfosfolipidowych w klasie IgA [5].

Jednocześnie oczywistym okazało się, iż zagrożenie objawami klinicznymi, a przede wszystkim epizodami zakrzepowymi jest zróżnicowane i zależy od typu wykrywanych przeciwciał, ich miana

oraz trwałego czy też przemijającego charakteru ich obecności. Z drugiej strony było oczywiste, iż u niektórych chorych objawy zakrzepowe (jak i inne) mogły znaleźć uzasadnienie w obecności innych niż przeciwciała antyfosfolipidowe, klasycznych czynnikach ryzyka ich występowania.

Na podstawie nowych danych pochodzących z badań naukowych opublikowanych po 2006 roku podjęto próbę opracowania nowych kryteriów klasyfikacyjnych, posługując się metodologią stosowaną przez *European Alliance of Associations for Rheumatology* (EULAR). Już na wstępnym etapie prac nad nowymi kryteriami zredukowano liczbę rozpatrywanych objawów klinicznych i wyeliminowano przeciwciała aDI, aPS/PT i przeciwciała klasy IgA, jako nieposiadające niezależnej (od współwystępujących aPL, dotychczas ujmowanych w kryteriach APS) wartości diagnostycznej, a więc nie podnoszących dodatkowo swoistości kryteriów laboratoryjnych [6]. Dlatego wśród kryteriów klasyfikacyjnych już od początku, bez zmian w stosunku do kryteriów z Sapporo, pozostały jedynie: antykoagulant tocznia oraz przeciwciała antykardiolipinowe i przeciwciała przeciwko  $\beta_2$ -glikoproteinie I w klasach IgG i IgM.

Ostatecznie w 2023 roku opublikowano nowe kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego, zgodnie z ujednoliconą metodologią EULAR, a opracowane przez zespół ekspertów, łącznie przez *American College of Rheumatology* (ACR) i EULAR [7, 8]. Różnią się one w wielu punktach od poprzednich kryteriów [7, 8].

Przede wszystkim wprowadzono kryteria wyjściowe, których spełnienie jest niezbędne, aby podjąć się klasyfikowania chorego (ryc. 1). Skrócono do 3 lat maksymalny okres, jaki mógł upłynąć pomiędzy objawem/kryterium klinicznym, a stwierdzeniem obecności przeciwciał antyfosfolipidowych. Objawy kliniczne i kryteria laboratoryjne podzielono na 8 domen, a objawom i wynikom badań zawartym w tych domenach przypisano pewną wagę, określaną liczbą punktów. Rozszerzono znacznie listę objawów klinicznych, w tym wielu nowych, oraz tych pominiętych we wcześniejszej wersji kryteriów. Jednocześnie wśród kryteriów klinicznych związanych z zakrzepicą położono duży nacisk na określenie, czy stwierdzany (a nieswoisty wyłącznie dla APS) objaw może mieć inną równie lub bardziej prawdopodobną przyczynę. Obecnie klasyfikując chorego, należy uwzględnić tylko ten objaw/wynik z danej domeny, który ma przypisaną najwyższą wagę/najwyższą liczbę punktów. Jeśli chory po spełnieniu kryteriów wyjściowych zgromadzi następnie po co najmniej 3 punkty z domen

**KRYTERIA WYJŚCIOWE**

Co najmniej jedno udokumentowane kryterium kliniczne, zawarte w domenach 1–6 oraz

**Dodatni wynik badania przeciwciał antyfosfolipidowych (aPL)** (antykoagulant tocznia, umiarkowane/wysokie miano przeciwciał antykardiolipinowych lub przeciwko  $\beta_2$ -glikoproteinie I, klasy IgG lub IgM) uzyskany w ciągu 3 lat od udokumentowania kryterium klinicznego



Jeśli nieobecne — nie usiłuj klasyfikować jako APS; jeśli obecne — zastosuj kryteria dodatkowe

**KLINICZNE I LABORATORYJNE KRYTERIA DODATKOWE**

Nie zaliczaj kryterium klinicznego, jeśli istnieje jego równie lub bardziej prawdopodobna przyczyna niż APS

W zakresie każdej domeny licz tylko kryterium o najwyższej wadze (punktacji)

DOMENY I KRYTERIA KLINICZNE	Waga
<b>D1. Duże naczynia (żylna-choroba zakrzepowo-zatorowa [ŻChZZ])</b>	
— ŻChZZ u chorego z wysokim profilem ryzyka*	1
— ŻChZZ u chorego bez wysokiego profilu ryzyka	3
<b>D2. Duże naczynia (zakrzepica tętnicza — [ZT])</b>	
— ZT u chorego z wysokim profilem ryzyka sercowo-naczyniowego*	2
— ZT bez wysokiego profilu ryzyka jw.	4
<b>D3. Mikronaczynia</b>	
<b>Podejrzenie jednego z poniższych:</b>	2
— <i>livedo racemoso</i> (badanie przedmiotowe <sup>1</sup> )	
— <i>livedoid vasculopathy</i> (badanie przedmiotowe)	
— ostra/przewlekła nefropatia związana z aPL (badanie przedmiotowe lub laboratoryjne <sup>2</sup> )	
— krwawienie śródpecherzykowe (badanie przedmiotowe lub obrazowe <sup>3</sup> )	
<b>Ustalone rozpoznanie jednego z poniższych:</b>	5
— <i>livedoid vasculopathy</i> (badanie przedmiotowe lub histopatologiczne <sup>4</sup> )	
— ostra/przewlekła nefropatia związana z aPL	
— krwawienie śródpecherzykowe (BAL <sup>5</sup> lub badanie histopatologiczne)	
— choroba mięśnia sercowego (badanie obrazowe lub histopatologiczne)	
— krwawienie do nadnerczy (badanie obrazowe lub histopatologiczne)	
<b>D4. Powikłania położnicze</b>	
— $\geq 3$ następujące po sobie utraty ciąży w stadium (przed)zarodkowym (< 10 tygodni), lub obumarcia płodu (10 tygodni 0 dni–15 tygodni 6 dni)	1
— <b>Obumarcie płodu</b> (16 tygodni 0 dni–33 tygodnie 6 dni) <b>bez obecności ciężkiego</b> stanu przedrzucawkowego <b>lub</b> ciężkiej niewydolności łożyska	1
— <b>Ciężki stan przedrzucawkowy</b> (< 34 tygodni 0 dni) <b>lub</b> ciężka niewydolność łożyska (< 34 tygodni 0 dni) z lub bez obumarcia płodu	3
— <b>Ciężki stan przedrzucawkowy</b> (< 34 tygodni 0 dni) i ciężka niewydolność łożyska (< 34 tygodni 0 dni) z lub bez obumarcia płodu	4
<b>D5. Zastawki serca</b>	
— Pogrubienie	2
— Wegetacje	4
<b>D6. Hematologia</b>	
Małopłytkowość ( $20\text{--}130 \times 10^9/l$ )	2
DOMENY I KRYTERIA LABORATORYJNE	Waga
<b>D7. Badanie aPL za pomocą czynnościowego testu krzepnięcia (badanie antykoagulantu tocznia [LA]) za pomocą czynnościowego testu krzepnięcia</b>	
— Dodatni LA (jednorazowo)	1
— Dodatni LA (trwale)	5
<b>D8. Badanie aPL metodą ELISA w fazie stałej (przeciwciała antykardiolipinowe [aCL] i/lub przeciwciała przeciwko <math>\beta_2</math>-glikoproteinie I [a-<math>\beta_2</math>GPI] — obecność trwała)</b>	
— Umiarkowanie/wysoko <sup>6</sup> dodatnie aCL <b>i/lub</b> a- $\beta_2$ GPI klasy IgM	1
— Umiarkowanie dodatnie aCL <b>i/lub</b> anty- $\beta_2$ GPI klasy IgG	4
— Wysoko dodatnie aCL <b>lub</b> a $\beta_2$ GPI klasy IgG	5
— Wysoko dodatnie aCL i a $\beta_2$ GPI klasy IgG	7
<b>PODLICZ PUNKTY</b>	
Klasyfikuj dla celów badawczych jako zespół antyfosfolipidowy, jeśli zgromadzono co najmniej <b>3 punkty</b> z domen klinicznych oraz <b>3 punkty</b> z domen laboratoryjnych	

**Rycina 1.** Kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego — 2023 ACR/EULAR [7, 8]

\*Czynniki określające ryzyko ŻChZZ oraz ZT — patrz niżej; <sup>1</sup>badanie przedmiotowe — podejrzenie podjęte na podstawie badania przedmiotowego; <sup>2</sup>badanie laboratoryjne — podejrzenie kliniczne podjęte na podstawie wyników badań laboratoryjnych; <sup>3</sup>badanie obrazowe — podejrzenie kliniczne podjęte na podstawie badań obrazowych; <sup>4</sup>badanie histopatologiczne — rozpoznanie ustalone na podstawie badania histopatologicznego; <sup>5</sup>BAL (*bronchoalveolar lavage*) — płukanie pęcherzykowo-oskrzelikowe; <sup>6</sup>przeciwciała umiarkowanie dodatnie 40–79U, wysoko dodatnie  $\geq 80U$ ; APS (*antiphospholipid syndrome*) — zespół antyfosfolipidowy

klinicznych i laboratoryjnych, jest klasyfikowany jako cierpiący na zespół antyfosfolipidowy.

Zgodnie z założeniami dla dobrych kryteriów klasyfikacyjnych aktualne zalecenia wykazują 99-procentową swoistość i 84-procentową czułość. Należy w tym miejscu podkreślić, iż kryteria klasyfikacyjne nie są kryteriami diagnostycznymi. Służą one doborowi jednolitych grup chorych w celach badań naukowych.

Opis procesu klasyfikacyjnego i domen klinicznych oraz laboratoryjnych zawiera rycina 1. W dalszej kolejności przedstawiono także dość szczegółowe definicje kryteriów klasyfikacyjnych, ich swoistą ontologię, która ma pomóc w ich jednolitym rozumieniu.

### Szczegółowe definicje kryteriów klasyfikacyjnych zespołu antyfosfolipidowego [7, 8]

#### Kryteria kliniczne

##### **Domena 1. Duże naczynia (żylna choroba zakrzepowo-zatorowa)**

Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ), nieznaną innego wyjaśnienia (równie lub bardziej prawdopodobnego) oraz potwierdzona właściwymi metodami diagnostycznymi dla: zatorowości płucnej, zakrzepicy żył głębokich kończyn, żył trzewnych i nerkowych, zakrzepicy zatok mózgu oraz zamknięcia żył siatkówki i itp.

Wysoki profil ryzyka ŻChZZ to:

a) obecność jakiegokolwiek z dużych czynników ryzyka ŻChZZ, tzn.:

- **aktywny proces nowotworowy** — w trakcie leczenia, w tym leczenia hormonalnego, a także nawrotu/progresji choroby pomimo leczenia w czasie wystąpienia epizodu ŻChZZ;
- **hospitalizacja** z ostrych przyczyn z unieruchomieniem w łóżku przez co najmniej 3 dni w okresie do 3 miesięcy przed wystąpieniem epizodu ŻChZZ;
- **duży uraz** ze złamaniami kończyn, uszkodzeniem rdzenia w ciągu jednego miesiąca poprzedzającego epizod ŻChZZ;
- zabieg chirurgiczny ze znieczuleniem ogólnym/dordzeniowym/nadoponowym trwającym dłużej niż 30 min w ciągu 3 miesięcy poprzedzających epizod ŻChZZ, lub

b) obecność co najmniej dwóch mniejszych czynników ryzyka, tzn.:

- **aktywna ogólnoustrojowa choroba autoimmunologiczna lub aktywne nieswoiste zapalenie jelit;**
- **ostra/aktywna ciężka infekcja**, np.: sepsa, zapalenie płuc, SARS-CoV-2;
- **cewnik w żyłę centralnej**, w tym samym co zakrzep w łożysku naczyniowym;
- **hormonalna terapia zastępcza, doustne środki antykoncepcyjne zawierające estrogeny lub trwający proces zapłodnienia *in vitro*;**
- **długotrwała podróż** ( $\geq 8$  godz.);
- **otyłość** ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ );
- **ciąża lub połóg** (w okresie 6 tygodni po porodzie);
- **przedłużające się unieruchomienie** inne niż powyżej, czyli na przykład uraz kończyny dolnej z upośledzeniem poruszania się lub unieruchomienie w łóżku ponad 3 dni, poza szpitalem;
- **zabieg chirurgiczny** (jak wyżej), lecz trwający poniżej 30 minut w ciągu 3 miesięcy przed epizodem ŻChZZ.

##### **Domena 2. Duże naczynia (zakrzepica tętnicza)**

Zakrzepica tętnicza nieznaną innego równie lub bardziej prawdopodobnego wyjaśnienia oraz potwierdzona właściwymi metodami diagnostycznymi dla odpowiednio: zawału serca, zakrzepicy tętnic obwodowych/trzewnych/siatkówki, udaru mózgu oraz zawałów innych organów (nerek, wątroby lub śledziony) bez uwidocznienia zakrzepu.

Wysoki profil ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (ChS-N) to obecność jednego lub więcej czynników wysokiego ryzyka ChS-N lub trzech lub więcej czynników umiarkowanego ryzyka ChS-N, jeśli ich chronologia (obecność w czasie)/nasilenie wiąże się w uznaniu badacza z epizodem zakrzepicy.

a) Czynniki wysokiego ryzyka ChS-N:

- **nadciśnienie tętnicze**, z ciśnieniem skurczowym  $\geq 180 \text{ mmHg}$  lub rozkurczowym  $\geq 110 \text{ mmHg}$ ;
- **przewlekła choroba nerek** przy  $GFR \leq 60 \text{ ml/min}$ , przez ponad 3 miesiące;
- **cukrzyca** z uszkodzeniem narządów lub o długim czasie trwania (typu 1  $\geq 20$  lat, typu 2  $\geq 10$  lat);
- **hiperlipidemia** (ciężka); stężenie cholesterolu całkowitego  $\geq 310 \text{ mg/dl}$  ( $8 \text{ mmol/l}$ ) lub stężenie cholesterolu frakcji LDL  $> 190 \text{ mg/dl}$  ( $4,9 \text{ mmol/l}$ );

b) Czynniki umiarkowane ryzyka ChS-N:

- **nadciśnienie tętnicze** w czasie leczenia lub z trwałym ciśnieniem skurczowym  $\geq 140$  mmHg lub rozkurczowym  $\geq 90$  mmHg;
- **obecne palenie tytoniu**;
- **cukrzyca**, bez uszkodzenia narządów i krótkim czasie trwania (typu 1  $< 20$  lat; typu 2  $< 10$  lat);
- **hiperlipidemia** (umiarkowana) w czasie leczenia lub przy całkowitym poziomie cholesterolu powyżej wartości prawidłowej, lecz  $< 310$  mg/dl (8 mmol/l) lub cholesterolu frakcji LDL  $< 190$  mg/dl (4,9 mmol/l);
- **otyłość** (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>).

### Domena 3. Mikronaczynia

**Podejrzanie** (na podstawie badania przedmiotowego, objawów klinicznych, badań obrazowych lub badań laboratoryjnych):

- **livedo racemosa** (pol. plamica groniasta) — sinawe, nieregularne, poprzerywane, trwałe zmiany skórne, o siatkowatym rysunku i niesymetrycznym charakterze; należy odróżnić od *livedo reticularis* (pol. plamicy siatkowatej), która ma charakter regularny, przemijający (np. pod wpływem ogrzania), symetryczny, z rysunkiem regularnym, o zamkniętych oczkach sieci. *Livedo reticularis* nie jest zaliczane do kryteriów APS;
- **livedoid vasculopathy** (pol. sinicze zapalenie naczyń) — niewyjaśnione innymi przyczynami czerwonawo-sine, bolesne guzki i plamica, które mogą szybko zmienić się w krwawe pęcherze, które w przypadku pęknięcia pozostawiają drobne, bolesne owrzodzenia, lub siatkę bolesnych owrzodzeń;
- **nefropatia związana z obecnością aPL (antiphospholipid antibody nephropathy)**. Nieznajdujące innego wyjaśnienia i utrwalone:
  - a) nadciśnienie tętnicze — nowo wykryte lub pogorszenie dobrze kontrolowanej choroby;
  - b) białkomocz  $\geq 0,5$  g/dobę lub wskaźnik białko/kreatynina  $\geq 0,5$  (mg/mg lub 50 mg/mmol);
  - c) ostra niewydolność nerek (wzrost kreatyniny ponad górną granicę normy), lub
  - d) mikroskopowy krwinkomocz pochodzenia kłębuszkowego.

**Krwawienie śródpecherzykowe** — objawy ze strony układu oddechowego (np. duszność, kaszel, krwioplucie) oraz nacieki płucne w badaniach obrazowych bez innej przyczyny, a sugerujące krwawienie.

**Potwierdzone rozpoznanie:**

- **livedoid vasculopathy** — w badaniach histopatologicznych zakrzepica drobnych naczyń

skórnych i/lub proliferacja śródbłonka w badaniu histopatologicznym, bez innej określonej przyczyny;

- **nefropatia związana z obecnością aPL** w badaniach histopatologicznych: a) ostra mikroangiopatia kłębuszkowa i naczyń nerkowych z zakrzepami złożonymi z włókniaka w arterioliach i naczyniach kłębuszka, bez komórek zapalnych i kompleksów immunologicznych, b) przewlekłe zmiany kłębuszkowe i naczyniowe, opisywane jako: mikrozakrzepica tętnic i arterioli z lub bez rekanalizacji; włóknikowe lub włóknisto-komórkowe okluzje naczyń; ogniskowa atrofia korowa; włóknisty przerost warstwy wewnętrznej lub przewlekłe, zorganizowane zakrzepy w kłębkach. Uwaga: u chorych na toczeń układowy rumieniowaty zmiany te występują niezależnie od zmian typowych dla nefropatii toczniowej;
- **krwawienie śródpecherzykowe** — w badaniach histopatologicznych lub w popłuczynach oskrzelikowo-pecherzykowych (BAL), bez innych znanych przyczyn: stała narastająca obecność krwistej wydzieliny w BAL z makrofagami obciążonymi hemosyderyną ( $> 20\%$ ), lub capillaritis, lub mikrozakrzepy w biopsji płuca;
- **choroba mięśnia sercowego** — w badaniach obrazowych lub badaniach histopatologicznych, bez innego, możliwego wyjaśnienia: zawał serca bez uniesienia ST i przy prawidłowym koronarogramie (MINOCA, *myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries*) oraz histologicznie z zakrzepicą drobnych naczyń, lub zmiany w sercu techniką obrazowania rezonansem magnetycznym, określane jako: a) *late gadolinium enhancement*, b) nieprawidłowości T2 lub c) zaburzenia perfuzji.

**Krwotok do nadnerczy lub zakrzepica splotu naczyniowego** w badaniach techniką tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego, które wykazują niewyjaśnione innymi przyczynami: krwotok lub na podstawie badania histopatologicznego zakrzepicę nadnerczowego splotu naczyniowego.

### Domena 4. Powikłania położnicze

**Utrata ciąży w okresie przed- i embrionalnym** — utrata przed 10 tygodniem 0 dni ciąży, bez innej uchwytnej przyczyny.

**Śmierć płodu** — to utrata ciąży pomiędzy 10. tygodniem 0 dni a 15 tygodniem 6 dni ciąży (wcześnie) lub pomiędzy 16 tygodniem 0 dni a 34 tygodniem 0 dni ciąży. Uwaga: Jeśli nie jest dostępne



dokładne genetyczne i morfologiczne badanie płodu, należy posłużyć się racjonalną oceną kliniczną, opartą na dostępnych danych medycznych.

**Ciężki stan przedrzucawkowy** (*pre-eclampsia with severe features*).

**Stan przedrzucawkowy to nadciśnienie**, definiowane jako skurczowe tętnicze ciśnienie krwi  $\geq 140$  mmHg lub rozkurczowe  $\geq 90$  mmHg, stwierdzone co najmniej dwukrotnie, w odstępie co najmniej 4 godzin, stwierdzone **po 20. tygodniu ciąży** u kobiety, która miała poprzednio prawidłowe ciśnienie krwi lub cierpiała na nadciśnienie (w tym ostatnim przypadku, aby rozpoznać stan przedrzucawkowy, powinno dojść po 20. tygodniu ciąży do nagłego wzrostu ciśnienia krwi i/lub białkomoczu), **oraz białkomocz** (także po 20. tygodniu ciąży), albo stwierdzony jako: a) białkomocz  $\geq 0,3$  mg/mg (30 g/mmol) w przypadkowej próbce moczu lub b) białko w moczu przy użyciu testu paskowego  $\geq 2+$ .

**Ciężki stan przedrzucawkowy to powyższe objawy oraz co najmniej jedno z poniższych objawów ciężkich** (*severe features*):

- **znaczne podwyższenie ciśnienie krwi** — ciśnienie skurczowe  $\geq 160$  mmHg lub rozkurczowe  $\geq 110$  mmHg przy dwóch okazjach, co najmniej w odstępie 4 godzin, kiedy chora spoczywa w łóżku (jeśli stwierdzimy znaczny wzrost ciśnienia, można rozpocząć leczenie — wtedy nie obowiązuje kryterium 4 godzin);
- **zaburzenia ze strony centralnego systemu nerwowego** (CSN): nowy ból głowy, niewyjaśniony innymi przyczynami i niereagujący na leki;
- **zaburzenia widzenia**;
- **obrzęk płuc**;
- **uszkodzenie funkcji wątroby** — podwyższenie aktywności enzymów wątrobowych co najmniej 2 razy ponad górną granicę normy lub silny, ciągły ból w nadbrzuszu lub prawym górnym kwadrancie jamy brzusznej, niereagujący na leki — niewyjaśnione innymi przyczynami;
- **zaburzenia czynności nerek** — stężenie kreatyniny w surowicy ponad 1,1 mg% lub podwojenie stężenia kreatyniny bez innej choroby nerek;
- **małopłytkowość**  $< 100 \times 10^9/l$ .

**Ciężka niewydolność łożyska:**

- **wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu płodu:** waga płodu  $< 10$  percentyla dla wieku płodowego lub masa urodzeniowa  $< 10$  percentyla dla wieku płodowego przy nieobecności związanych z ograniczeniem wzrostu przyczyn genetycznych lub zespołów płodowo-noworodkowych, **oraz**

- **nieprawidłowe lub niepokojące wyniki monitorowania płodu** — badanie sugerujące niedotlenienie płodu;
- **nieprawidłowe przepływy w badaniu dopplerowskim** — badanie sugerujące niedotlenienie płodu;
- **ciężkie wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu płodu** — biometria płodu wskazująca na wagę płodową lub po urodzeniu  $< 3$  percentyla dla wieku płodowego;
- **małowodzie** — zgodnie z położniczymi kryteriami;
- **upośledzenie matczynej perfuzji naczyniowej łożyska** — na takie upośledzenie wskazują w badaniu histopatologicznym zakrzepica/zawał łożyska, patologia naczyniowa doczesnej, zapalenie doczesnej, nieprawidłowości syncytiotrofoblastu. Zmiany te nie są swoiste dla APS.

### Domena 5. Zastawki serca

**Pogrubienie zastawek** (niewyjaśnione innymi przyczynami) — na podstawie kryteriów echokardiograficznych pogrubienie  $> 4$  mm u osób w wieku 20–39 lat, a  $> 5$  mm u osób w wieku  $\geq 40$  lat;  $> 3$  mm dla innych zastawek w każdym wieku. Pogrubieniu może towarzyszyć niedomykalność lub zwężenie zastawki.

**Wegetacje na zastawkach** (niewyjaśnione innymi przyczynami) — na podstawie zaleceń *American Society of Echocardiography* [9] są to wielopłatowe, krągłe twory, typowo zlokalizowane na przedsionkowej powierzchni zastawki mitralnej i trójdzielnej lub komorowej powierzchni zastawki aortalnej, zmiennej wielkości, zwykle  $< 1$  cm. W odróżnieniu od zmian w infekcyjnym zapaleniu wsierdzia nie są związane z destrukcją zastawki. Mogą się wiązać z niedomykalnością lub zwężeniem zastawki.

### Domena 6. Hematologia

**Małopłytkowość** — niewyjaśnione innymi przyczynami obniżenie liczby płytek krwi, nie niższe niż  $20\text{--}130 \times 10^9/l$ , potwierdzone rozmazem krwi obwodowej i powtórzone pomiary.

### Kryteria laboratoryjne

#### Domena 7. Badanie przeciwciał antyfosfolipidowych czynnościową metodą koagulometryczną

**Antykoagulant toczeniowy** — określany zgodnie z zaleceniami *International Society on Thrombosis and Hemostasis* (ISTH) [10].

Zalecana jest procedura trójstopniowa. Należy zwrócić uwagę na możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich i ujemnych, przy stosowaniu leków przeciwzakrzepowych, reakcjach ostrej fazy (wpływ markerów ostrej fazy) czy w ciąży. W przypadku stosowania leków przeciwzakrzepowych wyniki badań muszą być wykonywane i interpretowane przez osoby posiadające eksperckie doświadczenie w wykonywaniu takich oznaczeń.

### **Domena 8. Przeciwciała antyfosfolipidowe oznaczane metodami z użyciem fazy stałej**

Przeciwciała antykardiolipinowe (aCL) i przeciwciała przeciwko  $\beta_2$ -glikoproteinie I ( $\alpha\beta_2$ GPI) — punkty odcięcia dla **umiarkowanych** (40–79 U) i **wysokich** ( $\geq 80$  U) wartości przeciwciał powinny być ustalone na podstawie wystandaryzowanych testów immunoenzymatycznych (ELISA) z wiązaniem antygeny w fazie stałej. Nie powinno się dla tych celów używać szeroko obecnie wprowadzanych zautomatyzowanych platform z różnymi modyfikacjami fazy stałej dla wiązania antygeny (mikrosfery, magnetyczne mikrocząstki) i różnych nowych sposobów detekcji (np. chemiluminescencja, flowcytometria itp.). Wynika to z faktu, iż progi odcięcia dla wartości umiarkowanych/wysokich pomiędzy testami ELISA a zautomatyzowanymi platformami znacznie się różnią. Ich zastosowanie do celów klasyfikacyjnych będzie możliwe po przeprowadzeniu dodatkowych badań i wydaniu odpowiednich wskazówek przez podkomitet SSC LAC/aPL, towarzystwa ISTH.

### **Podsumowanie**

Przedstawione kryteria pozwalają z wysoką swoistością zaklasyfikować chorego do grupy chorych cierpiących na zespół antyfosfolipidowy i włączyć ich do badań klinicznych usprawniających diagnostykę i leczenie APS. Natomiast już obecnie określając rodzaj i miano przeciwciał antyfosfolipidowych, można określić przyszłe ryzyko wystąpienia powikłań klinicznych [11] i podjąć właściwe decyzje co do czasu trwania i doboru leczenia przeciwzakrzepowego [12, 13].

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### **Piśmiennictwo**

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4(2): 295–306, doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x, indexed in Pubmed: 16420554.

2. Pelkmans L, de Laat B. Antibodies against domain I of  $\beta_2$ -glycoprotein I: the one and only? *Lupus.* 2012; 21(7): 769–772, doi: 10.1177/0961203312437439, indexed in Pubmed: 22635228.
3. Sciascia S, Khamashta MA, Bertolaccini ML. New tests to detect antiphospholipid antibodies: antiprothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies. *Curr Rheumatol Rep.* 2014; 16(5): 415, doi: 10.1007/s11926-014-0415-x, indexed in Pubmed: 24609824.
4. Sciascia S, Radin M, Sanna G, et al. GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology (Oxford).* 2013; 52(8): 1397–1403, doi: 10.1093/rheumatology/kes388, indexed in Pubmed: 23315788.
5. Meijide H, Sciascia S, Sanna G, et al. The clinical relevance of IgA anticardiolipin and IgA anti- $\beta_2$  glycoprotein I antiphospholipid antibodies: a systematic review. *Autoimmun Rev.* 2013; 12(3): 421–425, doi: 10.1016/j.autrev.2012.08.002, indexed in Pubmed: 22951216.
6. Barbhaya M, Zuily S, Ahmadzadeh Y, et al. Development of a New International Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria Phase I/II Report: Generation and Reduction of Candidate Criteria. *Arthritis Care & Research.* 2021; 73(10): 1490–1501, doi: 10.1002/acr.24520, indexed in Pubmed: 33253499.
7. Barbhaya M, Zuily S, Naden R, et al. 2023 American College of Rheumatology (ACR)/ European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria. *Ann Rheum Dis.* ; 2023, doi: 1.1136/ard-2023-224609.
8. Barbhaya M, Zuily S, Naden R, et al. 2023 American College of Rheumatology (ACR)/ European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria. *Arthritis Rheumatol.* ; 2023, doi: 10.1002/art.42629, indexed in Pubmed: 37327357.
9. Mitchell C, Rahko PS, Blauwet LA, et al. Guidelines for Performing a Comprehensive Transthoracic Echocardiographic Examination in Adults: Recommendations from the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2019; 32(1): 1–64, doi: 10.1016/j.echo.2018.06.004, indexed in Pubmed: 30282592.
10. Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(11): 2828–2839, doi: 10.1111/jth.15047, indexed in Pubmed: 33462974.
11. Devreese K, Ortel TL, Pengo V, et al. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2018; 16(4): 809–813, doi: 10.1111/jth.13976, indexed in Pubmed: 29532986.
12. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis.* 2019; 78(10): 1296–1304, doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215213, indexed in Pubmed: 31092409.
13. Giarretta I, Ageno W, Dentali F. Lack of efficacy of direct oral anticoagulants compared to warfarin in antiphospholipid antibody syndrome. *Haematologica.* 2022; 107(11): 2737–2741, doi: 10.3324/haematol.2022.281586, indexed in Pubmed: 35861020.

# Light transmission aggregometry in the diagnosis of thrombocytopathy

Daria Malarczyk , Edyta Odnoczko 

Laboratory of Hemostasis and Porphyria Genetics, Department of Hemostasis and Metabolic Diseases, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

## Summary

*Platelet function disorders (PFD) are a rare and heterogeneous group of hemorrhagic diathesis. Comprehensive diagnostics of impaired platelet function (PLT) — the so called thrombocytopathy — requires the use of special testing. The gold standard for measurement/diagnostics of platelet function disorders is light transmission aggregometry (LTA). A platelet agonist (ADP, arachidonic acid, collagen, ristocetin, epinephrine) is added at an appropriate concentration to the sample of platelet-rich plasma. The interaction with the agonist leads to platelet activation and subsequent platelet aggregation. Aggregate formation is accompanied by a corresponding increase in light transmission. This review presents the principle of the LTA method, and a discussion of the basic panel of platelet aggregation agonists. In addition, the strengths and limitations of the LTA method are characterized and the method is compared with other alternative methods of PFD diagnostics.*

**Keywords:** platelets; thrombocytopathies; agonist; laboratory diagnostics; light transmission aggregometry; LTA

*J. Transf. Med.* 2023; 16: 117–125

## Introduction

Platelet abnormalities include both quantitative disorders (problems with the number of platelets) as well as the less frequent — disability of the function performed by the PLT in hemostasis. Thrombocytopathies are a group of bleeding abnormalities caused by congenital or acquired platelet disorders that impair platelet function in the blood coagulation process. Inherited thrombocytopathies may result either from structural abnormalities in platelet granules, receptors and phospholipid membrane or from abnormal PLT activation due to inappropriate signaling. However, acquired thrombocytopathies which result from the use of certain

drugs and accompany other chronic diseases (e.g. myeloproliferative neoplasms, cirrhosis, etc.) are diagnosed more frequently. Correct diagnosis of inherited thrombocytopathies is often problematic due to the high complexity of platelet defects. In addition, the diagnosis of this group of disorders is often associated with series of complex laboratory tests, which are not easily accessible and often provide ambiguous information [1].

Comprehensive diagnosis of thrombocytopathy — dysfunctional platelets (thrombocytes) — requires special testing. Depending on their availability, the panel of laboratory tests includes: microscopic evaluation of the peripheral blood smear, measurement of the occlusion time (CT,

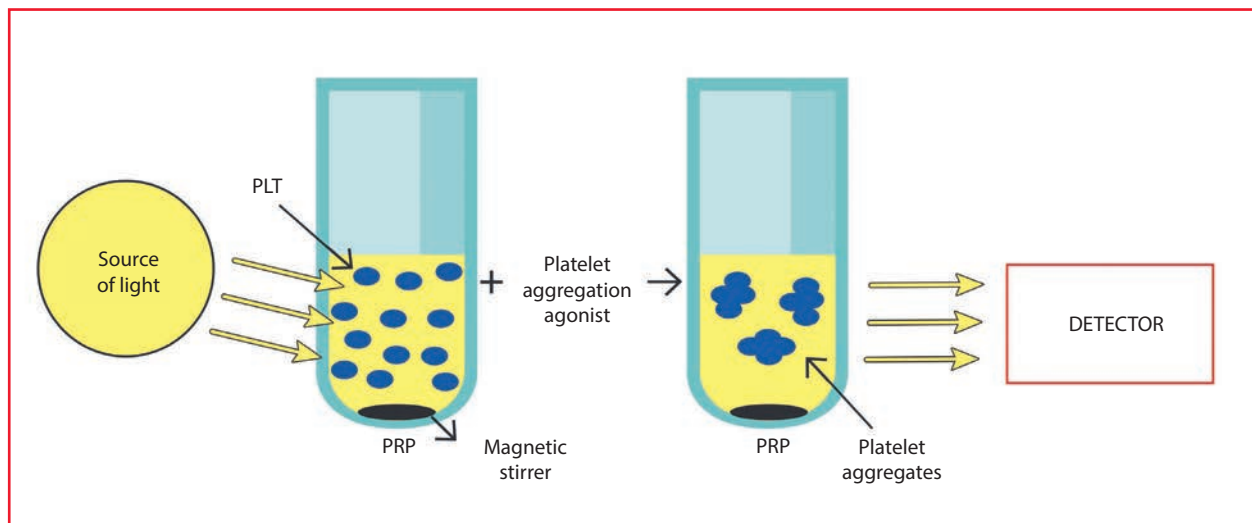
**Correspondence address:** dr n. med. Edyta Odnoczko, Department of Hemostasis and Metabolic Disorders, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, ul. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, Polska, e-mail: [ednoczko@ihit.waw.pl](mailto:ednoczko@ihit.waw.pl)  
 Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 21.03.2023

Accepted: 21.04.2023

Early publication date: 14.07.2023

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.



**Figure 1.** The mechanism of the LTA (description in the text) [6]; PLT — platelets, PRP — platelet-rich plasma

closure time) in the platelet function analyzer (PFA-100/200), analysis of the degree of PLT aggregation in the presence of aggregating factors, measurement of the concentration of intraplatelet proteins and their metabolites, flow cytometry assessing proteins (glycoproteins) on platelet surface as well as genetic tests which are becoming increasingly frequent [1].

Among these special tests, the so-called platelet aggregation tests, are classified as specific for primary hemostasis. The most common assessment method of platelet aggregation and also the gold standard for PFD diagnosis is optical aggregometry based on the measurement of visible light transmission (LTA). The method was first described by Born and O'Brien about 50 years ago, and up to date it has remained a recognized diagnostic tool for identification of platelet dysfunction (both congenital and acquired) and is still used in many specialized hemostasis laboratories [2, 3].

### Principle of the light transmission aggregometry method

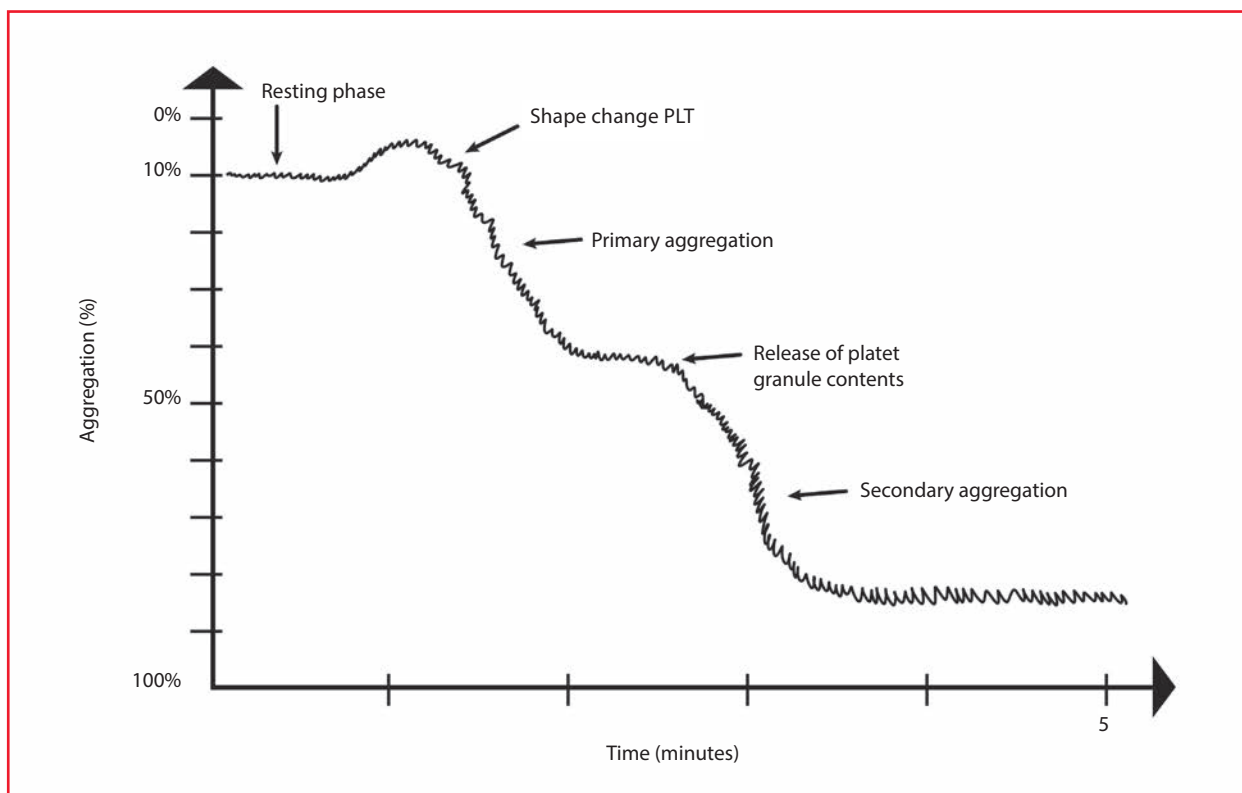
Light transmission aggregometry (LTA) is based on the measurement of the changes in the transmitted light which passes through two cuvettes, one of which contains autologous standard platelet-poor plasma (100% light transmittance). The other cuvette contains the tested platelet-rich plasma (PRP) sample with agonist (activator) added at a volume not exceeding 10% of the plasma sample. The observed aggregation of platelets (aggregates formation) is induced by the inter-

action between the agonist added to PRP and the appropriate activated membrane receptor complex (glycoprotein GP) [4]. During platelet aggregation, a number of biochemical and structural changes occur which are induced by the activation of various receptor-associated signaling pathways. Ultimately, irrespective of the mechanism, the fibrinogen receptor (glycoprotein — GPIIb/IIIa) is activated to form a platelet-fibrin network. Platelet aggregates are formed which are visible in platelet-rich plasma (Fig. 1). Aggregation of platelets makes cell suspension less turbid (decreases optical density). A minimum of 3 minutes is needed for an aggregate to form. The process is multi-stage, so the time may be extended to 5 minutes, and in some cases even to 10 minutes. Specific conditions must be ensured during the test; the tested citrate plasma sample must undergo constant mixing with a magnetic stirrer and heated to 37°C to create an environment as similar as possible to the conditions of blood vessels [5]. The test is semi-automated using aggregometers (e.g. Chrono-log Corporation) or performed on fully automated coagulation analyzers (e.g. Atellica COAG 360, Sysmex CS series, Siemens Healthneers).

### Platelet aggregation curve

Formation of platelet aggregates is accompanied by higher light transmission which is related to a lower number of light-scattering molecules [1]. The output signal recorded by the detector is proportional to the constantly measured difference in light transmittance between the tested and the





**Figure 2.** The aggregation curve (description in the text) [8]; PLT — platelets

reference samples. This signal is then expressed as the “aggregation percentage [%]” of PLTs, which is represented by the curve of aggregation intensity versus reaction time (Fig. 2). Reference values are usually in the range 60–90% [7]. The aggregation curve is thus an illustration of the rate of formation and the “quality” of platelet aggregates.

As result of interaction with the agonist changes in the shape of PLT occur, which may be observed in the form of a small peak on the aggregation curve. If the platelet-activating stimulus is strong enough or the process of aggregation is inhibited by the presence of antiplatelet drugs, platelets desegregation may occur. The threshold concentration of any agonist induces a change in the shape of the PLT from discoidal to spiny spheres, which is associated with a transient increase in optical density. Further platelet exposure to the agonist results in platelet adherence and aggregate formation, so more light passes through the platelet-rich plasma sample (primary aggregation). When the stimulus is strong enough, the granular content is released from platelets, and the primary aggregation is strengthened (the so called secondary aggregation occurs). For some strong agonists (e.g. arachidonic acid, thrombin, collagen)

the deformation of the curve is not clearly visible, therefore only one aggregation phase is observed [8].

### Platelet aggregation agonists

Under physiological conditions, collagen and von Willebrand factor (VWF) are necessary for activation and subsequent platelet adhesion and aggregation. In vitro however, a number of compounds collectively referred to as platelet aggregation agonists can be used for the same purpose. The panel of platelet aggregation agonists typically used in the diagnosis of PFD includes five compounds: ADP (adenosine diphosphate), arachidonic acid (AA), collagen, ristocetin, and epinephrine [9]. For each agonist the process of aggregation is different; the so-called aggregation profile differs as demonstrated on the time-aggregation curve. Apart from the basic panel of agonists, sometimes alternative activators from the extended panel of agonists are used and these include, among others: thrombin receptor activating peptide (TRAP) and thrombin, thromboxane A2 (TXA2), as well as its equivalent U46619 and collagen-related peptide (CRP) [9]. The choice of an agonist requires the determination of its optimal concentration (Table 1) to eliminate the influence of individual variability

**Table 1.** Optimum concentration values of platelet aggregation agonists [11]

PLT aggregation agonist	Optimum concentration	Concentration range	Platelet receptor
Adenosine diphosphate	2–2.5 $\mu$ M	0.2–20 $\mu$ M	P2Y1, P2Y12
Arachidonic acid	1 mM	0.2–2.0 mM	TXA2
Collagen	1–2 $\mu$ g/ml	1.0–5.0 $\mu$ g/ml	GPVI
Ristocetin	1.2 mg/ml 0.5 mg/ml	1.0–1.5 mg/ml 0.5–0.7 mg/ml	GPIb
Epinephrine	5 $\mu$ M	0.5–10 $\mu$ M	$\alpha$ 2A
<b>Extended panel agonists</b>			
Thrombin receptor activating peptide	10 $\mu$ M	10–100 $\mu$ M	TXA2
U46619	1 $\mu$ M	1–5 $\mu$ M	PAR-1
Collagen related peptide	10 ng/ml	10–1000 ng/ml	GPVI

on the test result. In case of incorrectly selected concentration, aggregation intensity may vary and induce false aggregation profiles [10].

The use of diverse agonists allows to identify PFD of various etiology in one examination. Interpretation of LTA results should take into account the aggregation profile in response to a single activator, as well as a holistic view of the agonist panel because many signaling pathways coupled to PLT surface receptors are interconnected/interrelated. Abnormal platelet aggregation in response to a particular agonist may be suggestive of specific disorders as shown in Table 2.

### Ristocetin

Ristocetin was once administered as an antibiotic in staphylococcal infections. Currently, the *in vitro* properties of ristocetin are used to induce platelet agglutination, provided VWF multimers are present in plasma. Thus, ristocetin is used to diagnose deficiencies of both VWF and its receptor — GP Ib/IX/V glycoprotein. The mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) test consists in adding ristocetin to platelet-rich plasma at a standard concentration of **1.2 mg/ml**. Low Dose Ristocetin-induced platelet aggregation (LD-RIPA) test at a lower concentration of **0.5–0.7 mg/ml** is used for more accurate diagnosis [13]. Healthy individuals present a normal response to a high concentration of ristocetin and no aggregation in response to a low concentration

of ristocetin. In contrast, excessive aggregation following the addition of low concentration-ristocetin to PRP is observed in two cases namely for von Willebrand disease (VWD) type 2B and platelet-type von Willebrand disease (PT-VWD). The difference between these diseases is that in type 2B VWD the defect refers to the von Willebrand factor, while in PT-VWD the abnormalities affect the platelet GPIb receptor, which results in higher affinity of PLT to VWF. In the differential diagnosis of these disorders, it may be helpful to add cryoprecipitate to the tested plasma; the platelets will aggregate only in PT-VWD. As for the other types of VWD (type 1, 2A, 2N, 2M), test with a higher concentration of ristocetin is routinely performed and the result may be either reduced or normal [14]. Moreover, no ristocetin-induced aggregation or its reduction is characteristic for congenital deficiency of the GP Ib/IX/V complex, which is the cause of the Bernard-Soulier syndrome (BSS). In Glanzmann's thrombasthenia, no platelet aggregation occurs in response to ristocetin, while normal aggregation with other agonists is maintained.

### Collagen (Col)

Glycoprotein VI (GPVI) is the main receptor for the collagen molecule on the platelet surface. Isolated impaired aggregation (absent or reduced) in response to 2  $\mu$ g/ml collagen added to platelet-rich plasma indicates abnormalities of the GPVI collagen-platelet receptor axis. The degree of

**Table 2.** Agonist-related causes of the abnormal platelet response [12]

Agonist (basic panel)	Causes of incorrect PLT aggregation
Adenosine diphosphate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P2Y12 receptor defect</li> <li>• Gray platelet syndrome</li> <li>• Glanzman's thrombasthenia myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia</li> <li>• Cytosolic phospholipase A2 deficiency</li> <li>• Storage pool disease (SPD)</li> </ul>
Arachidonic ACID	<ul style="list-style-type: none"> <li>• COX-1 deficiency</li> <li>• Thromboxane receptor defect</li> <li>• Glanzman's thrombasthenia</li> <li>• P2Y12 receptor defect</li> <li>• Storage pool disease (SPD)</li> <li>• Myelodysplastic syndrome</li> </ul>
Collagen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GPVI receptor defect</li> <li>• P2Y12 receptor defect</li> <li>• Storage pool disease (SPD)</li> <li>• Glanzman's thrombasthenia</li> <li>• Cytosolic phospholipase A2 deficiency</li> </ul>
Ristocetin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Platelet type von Willebrand disease</li> <li>• Bernard-Soulier syndrome</li> </ul>
Epinephrine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>2-adrenergic receptor defect</li> <li>• Quebec platelet disorder (QPD)</li> <li>• Glanzman's thrombasthenia</li> <li>• Myelodysplastic syndrome</li> <li>• Storage pool disease (SPD)</li> <li>• Cytosolic phospholipase A2 deficiency</li> </ul>

COX-1 — cyclooxygenase-1

collagen-mediated aggregation in congenital or acquired (autoimmune) GPVI deficiency depends on the total number of receptors that remain on platelet surface. It is also possible to extend the diagnostics of the PLT response to collagen by using alternative agonists from the extended panel such as convulxin and CRP [4]. Moreover, the lack of inhibition of aggregation after adding low-concentration collagen to PRP is also indicative of resistance to acetylsalicylic acid.

### Epinephrine (EPI)

Platelet activation in response to epinephrine in a concentration of 5–10  $\mu$ M added to platelet-rich plasma is the result of the interaction of this molecule with its platelet adrenergic receptor —  $\alpha$ 2A. Diagnosis of the platelet response to epinephrine may prove problematic because healthy individuals are often observed to present no aggregation after epinephrine-stimulation of platelets which may result from individual variability in the number of platelet  $\alpha$ 2A receptors [15]. An isolated, abnormal result of epinephrine-stimulated PLT aggregation

is clinically insignificant unless it is accompanied by other abnormalities or unless another specific disease is suspected. An example of such a disease is the Quebec platelet disorder (QPD) with epinephrine-induced abnormal aggregation profile.

### Arachidonic acid (AA)

Arachidonic acid-induced platelet aggregation is related to its conversion by cyclooxygenase 1 (COX-1) to prostaglandin G2 and H2 and then to thromboxane A2 (a compound which belongs to the family of prostanoids). This AA metabolite has a pro-aggregating effect resulting from platelet TP $\alpha$  and TP $\beta$  receptor activation (G protein-coupled receptors). Moreover, platelets activation via stimulation with low concentrations of collagen or ADP is associated with the release of endogenous arachidonic acid in consequence of phospholipase enzyme-A activity, which is metabolized by COX-1 to TXA2. The inhibitor of this metabolic pathway is acetylsalicylic acid, which permanently inhibits the activity of the COX-1 enzyme [16]. The irreversibility of this process is due to the fact that platelets

do not contain a cell nucleus and are incapable of producing new, properly functioning cyclooxygenase-1. Apart from arachidonic acid, which belongs to the basic panel of platelets aggregation agonists, there are also alternative compounds (U46619 or STA2) which can be useful in case of diagnostic difficulties. No aggregation in response to these compounds is indicative of a TXA2 defect, while normal aggregation in the absence of platelets response to arachidonic acid alone indicates an aspirin defect [1]. Impaired aggregation in response to stimulation with arachidonic acid may be related to impaired conversion of AA to TXA2. In such case, the use of an extended panel of agonists may prove helpful. On the other hand, no platelets aggregation may be due to the mutation in the TP $\alpha$  receptor encoding gene.

### Adenosine diphosphate (ADP)

ADP is a natural platelets aggregation agonist which activates them by interacting with specific purinergic receptors — P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> [17]. ADP-induced platelets stimulation (via P2Y<sub>1</sub> receptor) initially increases the concentration of calcium ions (Ca<sup>2+</sup>) in the cytoplasm and leads to inhibition of adenylyl cyclase (AC). Thus, no synthesis of the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) occurs and aggregation is uninhibited. The ADP-induced intracellular increase in Ca<sup>2+</sup> is responsible for the activation of membrane calcium channels (purinergic P2X<sub>1</sub> receptor) and the influx of calcium ions from the external environment into platelets cytoplasm. Abnormal aggregation in response to ADP stimulation may either result from congenital defects of purinergic receptors or from platelets signaling disorders. Due to the fact that ADP is stored in dense granules of PLT, as a result of their activation, the content of granules (including ADP) is released to enhance aggregation and induce the second phase of the aggregation curve. Disruption of the PLT activation pathway by ADP leads to an abnormal response to other agonists.

### Strengths and limitations of optical aggregometry

Optical aggregometry is a recognized tool in the diagnosis of platelets dysfunction mainly because it allows to use various groups of aggregation agonists that stimulate different mechanisms leading to abnormal platelet activation and can be detected during one test. Apart from PFD diagnosis, the LTA method has also been used for monitoring the effect of antiplatelet therapy. However

further analyses are required to see if the method may be used for purposes other than scientific ones (there is no accurate correlation between the clinical phenotype and test results). Although the LTA method is considered the gold standard for PFD diagnosis, it has numerous limitations. The main disadvantage is no adequate standardization of the procedure as well as problematic quality control of conducted tests [18]. The pre-analytical stage of the LTA is rather complex therefore it is important to properly prepare the patient for the procedure as well as to properly prepare the test samples [5]. Standardization of the technical conditions aims at obtaining the most repeatable and reliable results as well as elimination of factors affecting platelet-activation. The procedure of optical aggregometry is time-consuming which is another example of its limitations, especially when it comes to the proper preparation of platelet-rich and poor plasma samples. However it should be emphasized, that the use of automated coagulation analyzers significantly improves the procedure. It is also recommended to leave blood and PRP samples at rest for up to 30 minutes prior to centrifugation and testing of PLT-agonist interaction [19, 20]. Thus the entire time of LTA procedure is markedly prolonged but the total testing time should not exceed 4 hours (from blood collection) or 2 hours (from plasma preparation). Prolonged time of LTA procedure may lead to incorrect results — false-low aggregation due to the loss of PLT activity over time. The LTA test requires an adequate amount of plasma which involves the collection of significant volume of blood from the patient (even 20–25 ml) [7]. Furthermore, fresh blood samples are required, with no signs of hemolysis or lipemia [19]. It is not always possible to obtain such volume of blood/so many blood samples, particularly in the case of children. An important aspect of the LTA method is also the proper platelets count in the PRP. Determining the number of PLT in the PRP sample of both the patient plasma and normal plasma is an essential element of the LTA and it is an internal control of the test conditions. The PLT aggregation test is not recommended if platelet count is < 150 G/L. The LTA method cannot therefore be used to diagnose platelet dysfunction with coexistent thrombocytopenia. Too high platelet count remain a debatable issue. Dilution of PRP with autologous PPP to the desired values is an internal control of the test conditions. Standardization of the PLT count to the desired values of 200–300 G/L may result in abnormal platelet response to the agonists and it is not recommended. However, standardization of



platelet count has been common in the LTA procedure for years [20, 21]. The procedure used in PFD diagnostics also requires proper preparation of the patient for the test, so as to eliminate the factors that may affect PLT activity [19, 20] such as: physical activity, stimulants, medications or meals, as well as the type of food or stimulants consumed [22]. The pre-analytical stage of the LTA method is considered to be the most error-prone. Therefore, only proper preparation of the patient for the examination and proper handling of the collected material will eliminate the impact of pre-analytical variables on the LTA test results. Interpretation of the outcome of platelet aggregation tests may cause difficulties, therefore the laboratory staff who analyzes the aggregation curves must be well skilled and experienced [7].

### **Other diagnostic methods for platelet dysfunction**

Numerous limitations of LTA, have directed attention to the use of complementary diagnostic techniques for assessment of platelet function. The right choice of the diagnostic method allows either to confirm or exclude the preliminary diagnosis in the shortest possible time as well as to implement the appropriate therapy or to continue the diagnostic process.

A common screening method used to assess primary hemostasis disorders is the Closure Time (CT) test in the PFA-100 or PFA-200 analyzer (Platelet Function Analyser-100/200). The principle of the PFA method is to assess the function of platelets in whole blood, which passes through a hole in the membrane of a test cartridge coated with an appropriate aggregation agonist (collagen and epinephrine or collagen and ADP). Agonists trigger platelets activation and aggregation. When platelets aggregate enough to closes the hole and prevent blood from passing through the membrane that's the closure time. The test is extremely useful for the diagnosis of severe platelet dysfunction (Glanzman's thrombasthenia or Bernard-Soulier syndrome) but it is of limited use in the case of milder thrombocytopathies. A normal PFA result allows to exclude — with high probability — serious, congenital platelet dysfunctions [23].

Advancement in the technology of platelet dysfunction diagnosis has also contributed to the development of POCT (Point-of-Care Testing) methods for assessment of platelet aggregation. One of such methods is multiple electrode platelet aggregometry (MEA) based on the measurement

of the change in electrical impedance between two electrodes when platelets aggregation is induced by an agonist. On the electrodes immersed in the blood sample, PLT aggregation occurs as a result of interaction with the agonist. The change in electrical resistance (impedance) is directly proportional to the degree of platelet aggregation [24]. Platelet aggregation is stimulated by a basic panel of aggregating factors although at different concentrations [7]. It is worth noting that the platelets response to aggregation agonists is different for LTA and for impedance aggregometry, especially in the presence of ADP and epinephrine. The measurement expressed in ohms ( $\Omega$ ) can be converted to arbitrary aggregation units. Unlike the LTA method, impedance aggregometry requires no time-consuming sample preparation as whole blood is used which markedly shortens the time until the result becomes available. This reduces the risk of PLT activation prior to testing. Also the required volume of blood is smaller than for the LTA method. However, the limitation of impedance aggregometry, is its dependence on the platelet count and hematocrit. The PLT aggregation test in whole blood more closely reflects the in vivo conditions in blood vessels due to the presence of PLT subpopulations and other blood morphotic elements. However, this test does not take into account the effects of vascular endothelium and shear forces on platelet activity. Table 3 is the comparison of the above methods of assessing the ability of platelet to aggregate in response to stimulation with the appropriate activator. The impedance method is used in hemostasis laboratories less frequently than LTA; in the literature there are no extensive comparative studies with LTA or clinical experience of its usefulness in the diagnosis of platelet function disorders [7].

Another important method of PFD diagnosis is flow cytometry (FCM). The test is primarily performed to quantify (express) glycoprotein receptors, the deficiencies of which are the cause of inherited thrombocytopathies [1]. An unquestioned advantage of this method is that it enables a comprehensive assessment of platelet function, also in thrombocytopenia patients. Moreover, it requires a small volume of blood for testing [25]. Platelet GP cytometry is performed in patients with abnormal aggregation test results and/or a significant clinical history suggestive of thrombocytopathy. Therefore, FCM plays an important role in the diagnosis of Glanzmann's thrombasthenia (deficiency or lack of GPIIb/IIIa) and Bernard-Soulier syndrome (deficiency of GPIb/IX/V) [7].

**Table 3.** Comparison of assessment methods for platelet aggregation [6]

Method	Principle of the method	Platelet aggregation agonist	Test material	Test time
LTA	Turbidimetric measurement	AA, ADP, collagen, epinephrine, ristocetin (additionally extended panel agonists)	PRP	1–2 h
PFA-100/200	CT measurement	ADP, collagen, epinephrine	Whole blood	5–10 min
MEA	Impedance measurement	AA, collagen, ADP, TRAP	Whole blood	5–7 min

AA — arachidonic acid, ADP — adenosine diphosphate, CT — closure time, LTA — light transmission aggregometry, MEA — multi-electrode aggregometry, PFA-100/200 — platelet function analyzer 100/200, PRP — platelet-rich plasma, TRAP — thrombin receptor activating peptide

Molecular tests are also becoming increasingly popular for PFD diagnosis. The use of Next Generation Sequencing (NGS) techniques allow for a comprehensive analysis of genes responsible for platelet dysfunction. So far, more than 80 genes whose mutations are responsible for the occurrence of platelet bleeding disorders have been identified, and a given pathological variant has been correlated with the presented phenotype. Identification of the causative mutation allows to confirm the diagnosis. However, due to the complex nature of thrombocytopathy, the detection of the pathogenic variant responsible for the development of the disease is sometimes problematic. In addition, it is also possible to detect numerous variants of unknown etiology (VUS, Variants Of Uncertain Clinical Significance). Due to the complex nature of platelet bleeding disorders, such variants require further analysis and continuous updating of common mutation databases in order to be considered benign or pathogenic [26]. Few laboratories perform genetic tests for platelet dysfunction, which is a significant limitation of this method. Considering the fact that platelet bleeding disorders are a very heterogeneous group of diseases, molecular tests are mainly performed in the case of well-known platelet disorders such as: Glanzmann's thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome or platelet type of von Willebrand disease. Molecular diagnostics of PFD is not recommended as the test of first choice. However, the exceptions are some rare disorders that are difficult to diagnose in any other way (such as QPD), as well as conditions in which there is a clinical suspicion of a specific PFD [27]. In such situations, the initial DNA analysis can significantly save time in obtaining the correct diagnosis. Therefore, NGS is an effective diagnostic tool for PFD. However, it is necessary to thoroughly understand the molecular basis of platelet bleeding disorders so that this method can be used in routine practice [28].

## Summary

The LTA assay is a recognized diagnostic tool for the assessment of platelet dysfunction. However this technique is susceptible to pre-analytical, analytical and interpretation errors as there is no standardization of the testing procedure and the procedure itself is work and time-consuming. Despite numerous attempts at standardization, the procedure still varies between laboratories, and the interpretation of data requires special know-how. Moreover, the LTA technique is available only to high-tech laboratories of hemostasis. The recent successful attempts at LTA automation using coagulation analyzers (Siemens, Sysmex CS series, Atellica) represent therefore a breakthrough in the availability of these tests. They simplify test performance and enhance the readiness of clinicians to order LTA tests [29]. Comparative studies of these analyzers with standard aggregometers have demonstrated the automated method to be highly repeatable and less time-consuming for sample processing. For better evaluation of the performance and usefulness of the automated method, it is necessary to conduct further research on these coagulation analyzers in a broader spectrum of use with alternative platelets aggregation agonists or in patients with rare congenital platelet disorders [30]. It is also worth emphasizing that the close cooperation of clinicians/hematologists with the laboratory staff is essential for proper interpretation of LTA results and accurate diagnosis of difficult thrombocytopathies.

**Conflict of interest:** none declared

## References

1. Odnoczko E, Baran B, Windyga J. Z hemostazą na "Ty". Wyd. Bio-Ksel, Grudziądz 2016; 75-90.

2. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, et al. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015; 11: 133–148, doi: 10.2147/VHRM.S44469, indexed in Pubmed: 25733843.
3. Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, et al. Advances in platelet function testing-light transmission aggregometry and beyond. *J Clin Med.* 2020; 9(8), doi: 10.3390/jcm9082636, indexed in Pubmed: 32823782.
4. Alessi MC, Sié P, Payrastré B. Strengths and weaknesses of light transmission aggregometry in diagnosing hereditary platelet function disorders. *J Clin Med.* 2020; 9(3), doi: 10.3390/jcm9030763, indexed in Pubmed: 32178287.
5. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013 [Epub ahead of print], doi: 10.1111/jth.12231, indexed in Pubmed: 23574625.
6. Grove EL, Storey RF, Würtz M. Platelet function testing in atherothrombotic disease. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(33): 5379–5391, doi: 10.2174/138161212803251862, indexed in Pubmed: 22724414.
7. Odnoczek E, Baran B, Windyga J. Zasady rozpoznawania skaz krwotocznych ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki laboratoryjnej. *Hematologia.* 2017; 7(4): 303–311, doi: 10.5603/hem.2016.0029.
8. Frontröth JP. Light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2013; 992: 227–240, doi: 10.1007/978-1-62703-339-8\_17, indexed in Pubmed: 23546717.
9. Aliotta A, Bertaglia Calderara D, Zermatten MG, et al. High-dose epinephrine enhances platelet aggregation at the expense of procoagulant activity. *Thromb Haemost.* 2021; 121(10): 1337–1344, doi: 10.1055/a-1420-7630, indexed in Pubmed: 33690868.
10. Hvas AM, Favalaro EJ. Platelet function analyzed by light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 321–331, doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1\_25, indexed in Pubmed: 28804839.
11. Israels SJ. Laboratory testing for platelet function disorders. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37 Suppl 1: 18–24, doi: 10.1111/ijlh.12346, indexed in Pubmed: 25976956.
12. Gresele P. Subcommittee on platelet physiology of the international society on thrombosis and hemostasis. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015; 13(2): 314–322, doi: 10.1111/jth.12792, indexed in Pubmed: 25403439.
13. Frontröth JP, Favalaro EJ. Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 473–494, doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1\_35, indexed in Pubmed: 28804849.
14. Odnoczek E. Diagnostyka laboratoryjna choroby von Willebranda. *J Transf Med* 2012; 5(3): 103–107.
15. Lin TM, Lin JS, Tseng JY, et al. Impaired responsiveness of platelets to epinephrine due to  $\alpha 2A$  adrenoreceptor deficiency in Male Chinese. *Platelets.* 2016; 27(2): 149–154, doi: 10.3109/09537104.2015.1049137, indexed in Pubmed: 26083800.
16. Kubica J, Koziński M, Grześ G. Mechanizmy działania leków przeciwplytkowych. *Folia Cardiologica Excerpta* 2009; 4: 1: 10–17.
17. Abe H, Endo K, Shiba M, et al. Correlation between platelet thrombus formation on collagen-coated beads and platelet aggregation induced by ADP. *Transfus Apher Sci.* 2020; 59(1): 102560, doi: 10.1016/j.transci.2019.06.001, indexed in Pubmed: 31204292.
18. Althaus K, Zieger B, Bakchoul T, et al. THROMKID-Plus Studiengruppe der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Standardization of Light Transmission Aggregometry for Diagnosis of Platelet Disorders: An Inter-Laboratory External Quality Assessment. *Thromb Haemost.* 2019; 119(7): 1154–1161, doi: 10.1055/s-0039-1688791, indexed in Pubmed: 31154663.
19. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, et al. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J.* 2016; 14: 49, doi: 10.1186/s12959-016-0123-z, indexed in Pubmed: 27999475.
20. Favalaro EJ. More on preanalytical variables affecting platelet function testing using light transmittance aggregometry. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49(4): 737–739, doi: 10.1515/CCLM.2011.112, indexed in Pubmed: 21275810.
21. Ling LQ, Liao J, Niu Q, et al. Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets.* 2017; 28(7): 712–719, doi: 10.1080/09537104.2016.1265923, indexed in Pubmed: 28150526.
22. Brennan Y, Levade M, Ward CM. Acquired platelet function disorders. *Thromb Res.* 2020; 196: 561–568, doi: 10.1016/j.thromres.2019.06.009, indexed in Pubmed: 31229273.
23. Lassila R. Platelet Function Tests in Bleeding Disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2016; 42(3): 185–190, doi: 10.1055/s-0036-1571307, indexed in Pubmed: 26886396.
24. Pluta J, Nicińska B, Trzebicki J. Multiple electrode aggregometry as a method for platelet function assessment according to the European guidelines. *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2018; 50(3): 230–233, doi: 10.5603/AIT.a2018.0024, indexed in Pubmed: 30001456.
25. Navred K, Martin M, Ekdahl L, et al. A simplified flow cytometric method for detection of inherited platelet disorders-A comparison to the gold standard light transmission aggregometry. *PLoS One.* 2019; 14(1): e0211130, doi: 10.1371/journal.pone.0211130, indexed in Pubmed: 30673773.
26. Ver Donck F, Downes K, Freson K. Strengths and limitations of high-throughput sequencing for the diagnosis of inherited bleeding and platelet disorders. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(8): 1839–1845, doi: 10.1111/jth.14945, indexed in Pubmed: 32521110.
27. Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2022; 59(6): 405–444, doi: 10.1080/10408363.2022.2049199, indexed in Pubmed: 35341454.
28. Nurden P, Stritt S, Favier R, et al. Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy. *Haematologica.* 2021; 106(2): 337–350, doi: 10.3324/haematol.2020.248153, indexed in Pubmed: 33147934.
29. Platton S, McCormick Á, Bukht M, et al. A multicenter study to evaluate automated platelet aggregometry on Sysmex CS-series coagulation analyzers-preliminary findings. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018; 2(4): 778–789, doi: 10.1002/rth2.12140, indexed in Pubmed: 30349897.
30. Stratmann J, Karmal L, Zwinge B, et al. Platelet aggregation testing on a routine coagulation analyzer: a method comparison study. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019; 25: 1076029619885184, doi: 10.1177/1076029619885184, indexed in Pubmed: 31773967.

# Testy agregometrii optycznej w diagnostyce trombocytopatii

Daria Malarczyk , Edyta Odnoczko 

Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych  
 Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Malarczyk D, Odnoczko E. Light transmission aggregometry in the diagnosis of thrombocytopathy. *J Transf Med* 2023; 16 (3): 117–125. DOI: 10.5603/JTM.2023.0006.

Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

Zaburzenia funkcji płytek krwi (PFD) to rzadko występująca, a zarazem heterogenna grupa chorób należących do skaz krwotocznych. Kompleksowa diagnostyka nieprawidłowej funkcji płytek krwi (PLT), tzw. trombocytopatii — wymaga zastosowania specjalistycznych badań. Złotym standardem diagnostyki PFD jest agregometria optyczna oparta na pomiarze światła wiązki (LTA). Do próbki badanego osocza bagatopłytkowego dodawany jest w odpowiednim stężeniu określony agonista agregacji PLT (ADP, kwas arachidonowy, kolagen, rystocetyna, epinefryna). Na skutek interakcji z agonistą dochodzi do aktywacji i następczej agregacji płytek krwi. Powstawaniu agregatów płytkowych towarzyszy proporcjonalny wzrost przepuszczalności światła. W pracy przedstawiono zasadę metody LTA wraz z omówieniem podstawowego panelu agonistów agregacji płytek krwi. Ponadto scharakteryzowano mocne strony metody LTA i ograniczenia oraz porównano ją z pozostałymi alternatywnymi metodami diagnostyki PFD.

**Słowa kluczowe:** płytki krwi; trombocytopatie; agonista; diagnostyka laboratoryjna; agregometria optyczna; LTA

*J. Transf. Med.* 2023; 16: 126–135

## Wstęp

Nieprawidłowości dotyczące płytek krwi (PLT, *platelets*) obejmują zarówno zaburzenia ilościowe, jak i nieco rzadziej występujące zaburzenia pełnionej przez PLT funkcji w hemostazie. Trombocytopatie to grupa skaz krwotocznych, których przyczyną są wrodzone lub nabyte defekty płytek krwi upośledzające ich czynność w procesie krzepnięcia krwi. Wrodzone trombocytopatie mogą wynikać zarówno z nieprawidłowości strukturalnych płytek

krwi dotyczących ziarnistości płytkowych oraz receptorów i fosfolipidów błonowych, jak i z nieprawidłowej aktywacji PLT na skutek niewłaściwego przekazywania sygnału. Jednak znacznie częściej są rozpoznawane trombocytopatie nabyte, które są wynikiem stosowania niektórych leków oraz towarzyszą innym przewlekłym stanom chorobowym (np. nowotworom mieloproliferacyjnym, marskości wątroby itp.). Prawidłowe rozpoznanie wrodzonych trombocytopatii nierzadko bywa problematyczne ze względu na znaczną złożoność defektów płytko-

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Edyta Odnoczko, Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: eodnoczko@ihit.waw.pl

Nadesłano: 21.03.2023

Przyjęto do druku: 21.04.2023

Data pierwszej publikacji: 26.06.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.



wych. Dodatkowo diagnostyka tej grupy schorzeń często wiąże się z koniecznością przeprowadzenia szeregu skomplikowanych badań laboratoryjnych, często trudno dostępnych i dostarczających niejednoznacznych informacji [1].

Kompleksowa diagnostyka trombocytopatii — nieprawidłowej funkcji trombocytów, wymaga zastosowania specjalistycznych badań. Panel wykorzystywanych badań laboratoryjnych (zależnie od ich dostępności) obejmuje: ocenę mikroskopową rozmazu krwi obwodowej, pomiar czasu okluzji (CT, *closure time*) w analizatorze do badania funkcji płytek krwi (PFA-100/200, *platelet function analyser*), analizę stopnia agregacji PLT w obecności czynników agregujących, pomiar stężenia białek wewnątrzpłytkowych i ich metabolitów, cytometrię przepływową oceniającą białka (glikoproteiny) na powierzchni płytek krwi, a także coraz częściej wykonywane badania genetyczne [1].

Wśród tych specjalistycznych badań najczęściej wykorzystywane są tak zwane testy agregacji płytek krwi, które są zaliczane do swoistych testów hemostazy pierwotnej. Najpowszechniej stosowaną metodą prowadzenia testów agregacji PLT, a zarazem złotym standardem diagnostyki zaburzeń funkcji płytek krwi (PFD, *platelets function disorder*) jest agregometria optyczna oparta na pomiarze transmisji światła widzialnego (LTA, *light transmission aggregometry*). Po raz pierwszy metoda ta została opisana przez Borna i O'Briena około 50 lat temu, a do dziś jest uznanym narzędziem diagnostycznym dysfunkcji płytek krwi (wrodzonych oraz nabytych) w wielu specjalistycznych laboratoriach hemostazy [2, 3].

### Zasada metody transmisji światła widzialnego

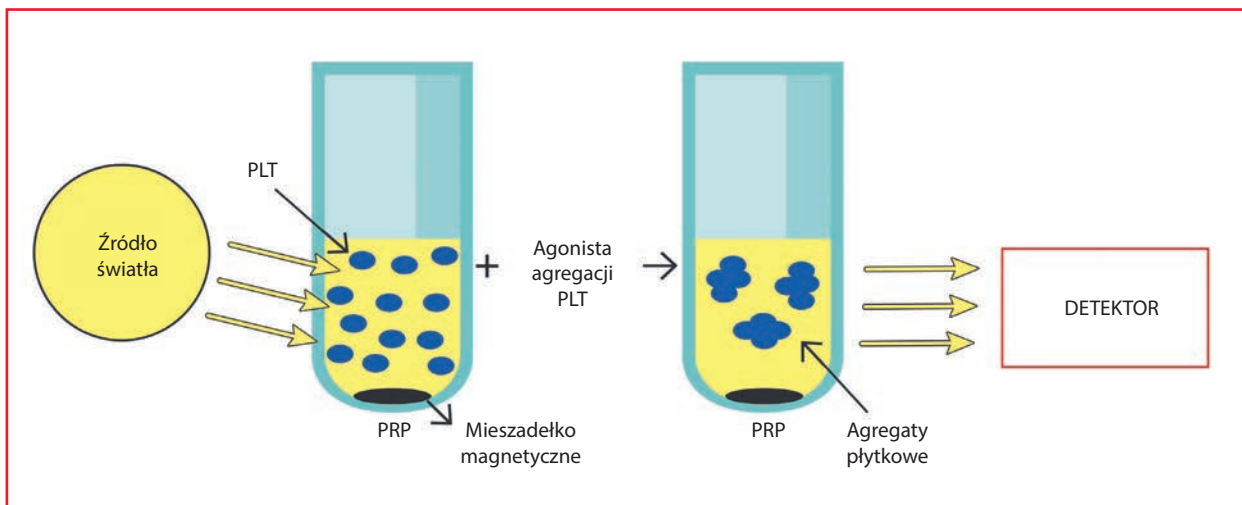
Ogólny mechanizm działania metody LTA opiera się na pomiarze zmian światła przechodzącego (tzw. transmitancji, T) przez dwie kuwety pomiarowe, z których jedna zawiera autologiczne osocze ubogopłytkowe (PPP, *platelet-poor plasma*) pełniące rolę wzorca (100% przepuszczalności światła). W drugiej kuwecie natomiast znajduje się analizowana próbka osocza bogatopłytkowego (PRP, *platelet-rich plasma*), do której dodawany jest agonista (aktywator) płytek krwi w odpowiednim stężeniu (w objętości nie większej niż 10% objętości badanej próbki osocza). Obserwowana agregacja (tworzenie agregatów) płytek krwi wynika z oddziaływania dodanego do PRP agonisty z właściwym, charakterystycznym dla danego związku powierzchniowym receptorem błonowym (GP, glikoproteina) PLT [4].

W czasie agregacji wewnątrz płytek krwi zachodzi szereg zmian zarówno biochemicznych, jak i strukturalnych na skutek pobudzenia różnych szlaków sygnałowych powiązanych z danym receptorem. Ostatecznie, niezależnie od mechanizmu działania agonisty, dochodzi do aktywacji receptora dla fibrynogenu (glikoproteina — GPIIb/IIIa), co powoduje wiązanie przez fibrynogen płytek krwi w sieć. Połączone ze sobą wzajemnie płytki krwi tworzą widoczne w osoczu bogatopłytkowym agregaty płytkowe (ryc. 1). Minimalny czas potrzebny do utworzenia agregatów wynosi około 3 minuty. Ze względu na wieloetapowość tego procesu, czas ten ulega wydłużeniu do 5 minut, a także w niektórych przypadkach do maksymalnie 10 minut. W czasie testu muszą zostać zapewnione określone warunki badania poprzez doprowadzenie badanej próbki osocza cytrynianowego do temperatury 37°C oraz zapewnienie stałych warunków mieszania osocza (umieszczenie mieszadełka magnetycznego). Ma to na celu stworzenie odpowiedniego środowiska dla płytek krwi, czyli możliwie najbardziej zbliżonego do warunków panujących w naczyniach krwionośnych [5]. Badanie przeprowadzane jest w sposób półautomatyczny na agregometrach (np. Chrono-log Corporation), bądź też w pełni zautomatyzowanych analizatorach koagulologicznych (np. Atellica COAG 360, Sysmex serii CS, Siemens Healthneers).

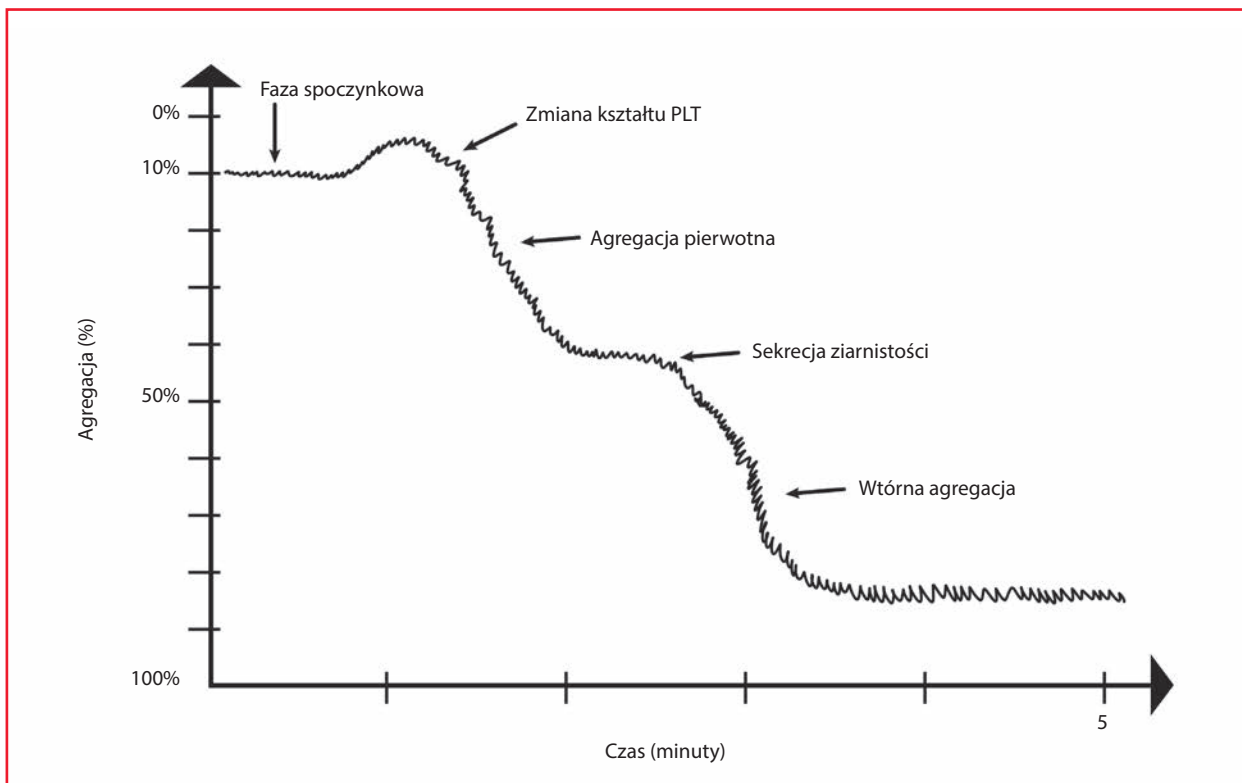
### Krzywa agregacji płytek krwi

Powstawaniu agregatów płytkowych towarzyszy wzrost przepuszczalności światła, który jest wynikiem zmniejszenia ilości cząsteczek zdolnych do jego rozproszenia [1]. Zarejestrowany przez detektor sygnał wyjściowy jest proporcjonalny do stale mierzonej różnicy przepuszczalności światła między analizowaną a wzorcową próbką. Następnie, sygnał ten wyrażany jest jako „procent agregacji [%]” PLT, co przedstawia krzywa zależności intensywności agregacji od czasu prowadzonej reakcji (ryc. 2). Wartości referencyjne zwykle zawierają się w przedziale 60–90% [7]. Krzywa agregacji jest zatem graficzną ilustracją tempa tworzenia i „jakości” agregatów płytkowych.

Na skutek interakcji z agonistą dochodzi do zmiany kształtu PLT, co obserwuje się w postaci niewielkiego piku na krzywej agregacji. Jeżeli bodziec pobudzający nie jest wystarczająco silny lub dochodzi do hamowania procesu agregacji na skutek obecności leków przeciwplateletowych, płytki krwi ulegają dezagregacji. Stężenie progowe danego agonisty wywołuje zmianę kształtu PLT



**Rycina 1.** Ogólna zasada metody transmisji światła widzialnego (opis w tekście) [6]; PLT (*platelets*) — płytki krwi, PRP (*platelet-rich plasma*) — osocze bogatopłytkowe



**Rycina 2.** Schemat krzywej agregacji (opis w tekście) [8]; PLT (*platelets*) — płytki krwi

z dyskooidalnej na kulistą z obecnymi pseudopodiami, czego wynikiem jest początkowe zmniejszenie przepuszczalności światła. Dalsze oddziaływanie agonisty na PLT powoduje, że zaczynają one do siebie przylegać i tworzyć agregaty, w związku z czym więcej światła przechodzi przez próbkę osocza bogatopłytkowego (agregacja pierwotna). Gdy bodziec pobudzający PLT jest wystarczająco

silny, dochodzi do uwolnienia zawartości ziarnistości PLT (odkształcenie krzywej), czego wynikiem jest wzmocnienie pierwotnej agregacji (agregacja wtórna). W przypadku niektórych silnych agonistów (np. kwas arachidonowy, trombina, kolagen) odkształcenie na krzywej nie jest odpowiednio widoczne, w związku z czym uzyskiwana jest tylko jedna faza agregacji [8].

Tabela 1. Optymalne wartości stężeń w zależności od zastosowanego agonisty agregacji płytek krwi [11]

Agonista agregacji płytek krwi	Stężenie optymalne	Zakres stężeń	Receptor płytkowy
Adenozynodifosforan	2–2,5 $\mu$ M	0,2–20 $\mu$ M	P2Y1, P2Y12
Kwas arachidonowy	1 mM	0,2–2,0 mM	TXA2
Kolagen	1–2 $\mu$ g/ml	1,0–5,0 $\mu$ g/ml	GPVI
Rystocetyna	1,2 mg/ml 0,5 mg/ml	1,0–1,5 mg/ml 0,5–0,7 mg/ml	GPIb
Epinefryna	5 $\mu$ M	0,5–10 $\mu$ M	$\alpha$ 2A
<b>Agoniści panelu rozszerzonego</b>			
Peptyd aktywujący receptor trombiny	10 $\mu$ M	10–100 $\mu$ M	TXA2
U46619	1 $\mu$ M	1–5 $\mu$ M	PAR-1
Peptyd związany z kolagenem	10 ng/ml	10–1000 ng/ml	GPVI

### Agoniści agregacji płytek krwi

W warunkach fizjologicznych, aby doszło do aktywacji i następczej adhezji oraz agregacji płytek krwi, niezbędny jest kolagen oraz czynnik von Willebranda (VWF, *von Willebrand factor*), natomiast w warunkach *in vitro* w tym celu można zastosować szereg związków wspólnie określanych mianem agonistów agregacji płytek krwi. Panel najczęściej stosowanych w diagnostyce PFD agonistów agregacji PLT obejmuje pięć związków: adenozynodifosforan (ADP, *adenosine diphosphate*), kwas arachidonowy (AA, *arachidonic acid*), kolagen, rystocetynę, a także epinefrynę [9]. Każdy z nich charakteryzuje odmienny przebieg procesu agregacji, tak zwany profil agregacji, co jest widoczne na krzywej zależności agregacji od czasu. Niezależnie od wyżej wymienionych substancji, które stanowią podstawowy wyjściowy panel agonistów, możliwe jest także zastosowanie w określonych przypadkach alternatywnych aktywatorów wchodzących w skład rozszerzonego panelu agonistów. Do tej grupy zaliczamy między innymi: peptyd aktywujący receptor trombiny (TRAP, *thrombin receptor activating peptide*), samą trombinę, tromboksan A2 (TXA2), jego odpowiednik U46619 oraz peptyd związany z kolagenem (CRP, *collagen related peptide*) [9]. Bardzo ważnym aspektem przy wyborze agonisty jest również ustalenie dla niego optymalnego stężenia działania (tab. 1), co pozwoli jak najbardziej wyeliminować wpływ zmienności osobniczej na uzyskany wynik badania. Nieprawidłowo dobrane stężenie agonisty prowadzi do zmienności w intensywności agregacji, co z kolei powoduje powstawanie fałszywych profili agregacji [10].

Ogromną zaletą stosowania różnorodnej liczby agonistów jest diagnostyka zróżnicowanych etiologii PFD w jednym badaniu. Interpretacja wyników LTA powinna uwzględniać profil agregacji w odpowiedzi na pojedynczy aktywator, a ponadto całościowe spojrzenie na zastosowany panel agonistów, gdyż wiele szlaków sygnałowych sprzężonych z receptorami na powierzchni PLT jest ze sobą wzajemnie powiązanych. Nieprawidłowa agregacja płytek krwi w odpowiedzi na określonego agonistę może sugerować specyficzne zaburzenia, co przedstawiono w tabeli 2.

### Rystocetyna

Dawniej rystocetyna (Ris, *ristocetin*) służyła jako antybiotyk podawany na zakażenia wywołane gronkowcami, natomiast obecnie wykorzystuje się jej zdolność *in vitro* do wywoływania aglutynacji płytek krwi pod warunkiem obecności w osoczu multimerów VWF. Zatem rystocetyna służy do diagnostyki niedoboru zarówno VWF, jak i jego receptora — glikoproteiny GP Ib/IX/V. Agregacja płytek krwi indukowana rystocetyną, czyli tak zwany test RIPA (*ristocetin-induced platelet aggregation*) polega na dodaniu rystocetyny do osocza bogato-płytkowego standardowo w stężeniu **1,2 mg/ml**. Dodatkowo, w celu dokładniejszej diagnostyki przeprowadza się także tak zwany test LD-RIPA (*low dose ristocetin-induced platelet aggregation*), w którym rystocetyna jest używana w niższym stężeniu — **0,5–0,7 mg/ml** [13]. W przypadku osób zdrowych uzyskuje się prawidłową odpowiedź na wyższe stężenie rystocetyny oraz brak agregacji w odpowiedzi na jej niskie stężenie, natomiast nadmierna agregacja po dodaniu rystocetyny w stężeniu niższym do PRP jest obserwowana w dwóch

**Tabela 2.** Przyczyny nieprawidłowej odpowiedzi płytek krwi w zależności od zastosowanego agonisty [12]

Agonista (panel podstawowy)	Przyczyny nieprawidłowej agregacji PLT
Adenozynodifosforan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Defekt receptora P2Y12</li> <li>• Zespół szarych płytek</li> <li>• Trombastenia Glanzmana</li> <li>• Zespół mielodysplastyczny, ostra białaczka szpikowa</li> <li>• Niedobór cytoplazmatycznej fosfolipazy A2</li> <li>• Choroba puli magazynowej</li> </ul>
Kwas arachidonowy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedobór COX-1</li> <li>• Defekt receptora tromboksanu</li> <li>• Trombastenia Glanzmana</li> <li>• Defekt receptora P2Y12</li> <li>• Choroba puli magazynowej</li> <li>• Zespół mielodysplastyczny</li> </ul>
Kolagen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Defekt receptora GPVI</li> <li>• Defekt receptora P2Y12</li> <li>• Choroba puli magazynowej</li> <li>• Trombastenia Glanzmana</li> <li>• Niedobór cytoplazmatycznej fosfolipazy A2</li> </ul>
Rystocetyna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Płytkowy typ choroby von Willebranda</li> <li>• Zespół Bernarda-Souliera</li> </ul>
Epinefryna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Defekt receptora <math>\alpha</math>2-adrenergicznego</li> <li>• Skaza płytkowa Quebec</li> <li>• Trombastenia Glanzmana</li> <li>• Zespół mielodysplastyczny</li> <li>• Choroba puli magazynowej</li> <li>• Niedobór cytoplazmatycznej fosfolipazy A2</li> </ul>

COX-1 (*cyclooxygenase 1*) — cyklooksigenaza-1

przypadkach, a mianowicie w przypadku choroby von Willebranda (VWD, *von Willebrand disease*) typu 2B oraz typu płytkowego (PT-VWD, *platelet-type von Willebrand disease*). Różnica między tymi jednostkami chorobowymi polega na tym, że w typie 2B VWD defekt dotyczy samego czynnika von Willebranda, w przeciwieństwie do PT-VWD, gdzie nieprawidłowości dotyczą płytkowego receptora GPIb, co powoduje zwiększone powinowactwo PLT do VWF. W diagnostyce różnicowej tych zaburzeń pomocne może być wykonanie testu polegającego na dodaniu do osocza badanego krioprecypitatu, gdyż tylko w przypadku PT-VWD dojdzie do agregacji PLT. Jeżeli chodzi o pozostałe typy VWD (typ 1, 2A, 2N, 2M), rutynowo przeprowadza się test z wyższym stężeniem rystocetyny, a uzyskany wynik może być zarówno obniżony, jak i prawidłowy [14]. Ponadto brak agregacji z rystocetyną lub obniżenie jej wartości jest charakterystycznym parametrem wrodzonego niedoboru kompleksu GP Ib/IX/V, który jest przyczyną zespołu Bernarda-Souliera

(BSS, *Bernard-Soulier syndrome*). W przypadku chorych na trombastenię Glanzmana nie dochodzi do agregacji PLT pod wpływem rystocetyny, natomiast zachowana jest prawidłowa agregacja z pozostałymi agonistami.

### Kolagen

Głównym receptorem na powierzchni płytek krwi dla cząsteczki kolagenu (Col, *collagen*) jest glikoproteina VI (GPVI). Izolowana upośledzona agregacja (całkowity brak lub obniżona) występująca po dodaniu kolagenu w stężeniu 2  $\mu$ g/ml do osocza bogatopłytkowego wskazuje na nieprawidłowości działania osi kolagen–receptor płytkowy GPVI. Stopień agregacji pod wpływem kolagenu w przypadku wrodzonego lub nabytego (autoimmunologicznego) niedoboru GPVI zależy od całkowitej liczby pozostałych receptorów na powierzchni PLT. Można również rozszerzyć diagnostykę odpowiedzi PLT na kolagen poprzez zastosowanie alternatywnych agonistów należących do panelu rozszerzonego,



takich jak konwulsyna oraz CRP [4]. Dodatkowo, brak hamowania procesu agregacji po dodaniu do osocza PRP kolagenu w niskim stężeniu jest również wskaźnikiem oporności laboratoryjnej na kwas acetylosalicylowy.

### Epinefryna

Aktywacja płytek krwi po dodaniu do osocza bogatopłytkowego epinefryny (EPI, *epinephrine*) w stężeniu 5–10  $\mu\text{M}$  jest wynikiem oddziaływania tej cząsteczki na jej płytkowy receptor adrenergiczny —  $\alpha 2\text{A}$ . Diagnostyka odpowiedzi PLT na epinefrynę bywa kłopotliwa ze względu na fakt, że często u osób zdrowych obserwuje się brak agregacji po stymulacji PLT epinefryną, co wynika ze zmienności osobniczej liczby receptorów płytkowych  $\alpha 2\text{A}$  [15]. Izolowany, nieprawidłowy wynik agregacji PLT po stymulacji epinefryną nie ma znaczenia klinicznego, jeżeli nie towarzyszą mu inne nieprawidłowości lub nie podejrzewa się konkretnej jednostki chorobowej. Przykładem takiego schorzenia, w którym obserwuje się nieprawidłowy profil agregacji z epinefryną, jest skaza płytkowa Quebec (QPD, *Quebec platelet disorder*).

### Kwas arachidonowy

Działanie kwasu arachidonowego (AA, *arachidonic acid*) na płytki krwi jest związane z jego przekształceniem przez cyklooksyzgenę 1 (COX-1) do między innymi tromboksanu A<sub>2</sub> — związku należącego do grupy prostanoidów. To właśnie ten metabolit AA wykazuje działanie proagregacyjne w wyniku aktywacji płytkowych receptorów TP $\alpha$  i TP $\beta$  (receptory sprzężone z białkiem G). Dodatkowo, aktywacja płytek krwi poprzez stymulację niskimi stężeniami kolagenu czy ADP wiąże się z uwolnieniem endogennego kwasu arachidonowego w wyniku działania enzymu — fosfolipazy A, który podlega metabolizmowi przez COX-1 do TXA<sub>2</sub>. Inhibitorem tego szlaku przemian jest kwas acetylosalicylowy, trwale hamujący działanie enzymu COX-1 [16]. Nieodwracalność tego procesu wynika z faktu, że płytki krwi nie zawierają jądra komórkowego i nie są w stanie wytworzyć nowej, poprawnie działającej cyklooksyzgenazy-1. Poza kwasem arachidonowym, który wchodzi w skład podstawowego panelu agonistów agregacji PLT, możliwe jest także zastosowanie innych alternatywnych związków (U46619 lub STA<sub>2</sub>) w przypadku trudności diagnostycznych. Brak agregacji pod wpływem tych związków wskazuje na defekt TXA<sub>2</sub>, natomiast prawidłowa agregacja przy braku odpowiedzi płytek na sam kwas arachidonowy świadczy o defekcie aspirynowym [1]. Upośledzona agregacja

po stymulacji kwasem arachidonowym może być związana z zaburzeniem przekształcania AA do TXA<sub>2</sub>. W tym właśnie przypadku pomocne staje się zastosowanie agonistów panelu rozszerzonego. Ponadto brak agregacji PLT może być wynikiem mutacji w genie kodującym receptor TP $\alpha$ .

### Adenozynodifosforan

Adenozynodifosforan (ADP, *adenosine diphosphate*) ADP jest naturalnym agonistą agregacji płytek krwi i aktywuje je poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami purynergicznymi — P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> oraz P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> [17]. Stymulacja płytek krwi za pomocą ADP (poprzez receptor P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>) początkowo prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) w cytoplazmie, czemu towarzyszy zahamowanie czynności cyklazy adenylowej (AC, *adenylyl cyclase*). W związku z powyższym nie dochodzi do syntezy inhibitora procesu agregacji — cyklicznego monofosforanu adenozyliny (cAMP, *cyclic-adenosine-mono-phosphate*). Za wewnątrzkomórkowy wzrost  $\text{Ca}^{2+}$  wywołany stymulacją ADP odpowiada aktywacja błonowych kanałów wapniowych (ich rolę pełni purynergiczny receptor P<sub>2</sub>X<sub>1</sub>) i napływ jonów wapnia ze środowiska zewnętrznego do cytoplazmy PLT. Jeżeli chodzi o odbiegające od normy wyniki agregacji po stymulacji ADP, to mogą one z jednej strony wynikać z wrodzonych wad receptorów purynergicznymi, a z drugiej — z zaburzeń przekazywania sygnałów wewnątrz płytek krwi. Ze względu na fakt, że ADP jest magazynowany w ziarnistościach gęstych PLT, w wyniku ich aktywacji dochodzi do uwolnienia zawartości ziarnistości (w tym ADP), które wzmacniają agregację i powodują powstanie drugiej fazy krzywej agregacji. Zaburzenia szlaku aktywacji PLT przez ADP powodują zatem nieprawidłową odpowiedź na pozostałych agonistów.

### Mocne strony i ograniczenia agregometrii optycznej

Agregometria optyczna stanowi uznane przez specjalistów narzędzie diagnostyczne dysfunkcji płytek krwi. Wynika to głównie z możliwości stosowania zróżnicowanych grup agonistów agregacji, stymulujących odmienne mechanizmy prowadzące do nieprawidłowej aktywacji PLT, które mogą zostać wykryte w jednym badaniu. Dodatkowo, oprócz diagnostyki PFD, metoda LTA znalazła także zastosowanie w monitorowaniu efektu leczenia przeciwplateletowego, niemniej jednak wymaga to dalszych analiz, aby mogła być zastosowana w innych celach niż naukowe (brak dokładnej współzależności pomiędzy obrazem

klinicznym a wynikami badań). Mimo że metoda LTA jest uznawana za złoty standard diagnostyki PFD, posiada również wiele ograniczeń. Zasadniczą wadą metody LTA jest brak odpowiedniej standaryzacji procedury oraz trudności w kontroli jakości prowadzonych badań [18]. Ze względu na złożoność etapu przedanalizy metody LTA, bardzo ważne jest prawidłowe przygotowanie zarówno próbek do badania, jak i samego pacjenta [5]. Ujednolicenie warunków technicznych ma na celu uzyskiwanie jak najbardziej powtarzalnych i wiarygodnych wyników oraz eliminację czynników wpływających na aktywację płytek krwi. Kolejnym istotnym ograniczeniem agregometrii optycznej jest czasochłonność procedury, zwłaszcza jeśli chodzi o właściwe przygotowanie próbek osocza bogato- oraz ubogopłytkowego, lecz należy podkreślić, że zautomatyzowanie tej metody w analizatorach koagulologicznych znacznie usprawnia procedurę jej wykonania. Ponadto zaleca się, aby próbki krwi oraz PRP odstąpiły do maksymalnie 30 minut przed rozpoczęciem odpowiednio wirowania i badania interakcji PLT z agonistą [19, 20]. Znacznie wydłuża to całość procedury badania LTA, przy czym całkowity czas badania nie powinien przekraczać 4 godzin (od momentu pobrania krwi) lub 2 godziny (od momentu przygotowania osocza). Zbyt długi czas trwania badania LTA prowadzi do uzyskiwania nieprawidłowych wyników — fałszywie zaniżonej agregacji, co wynika ze spadku aktywności PLT wraz z upływem czasu. Do przeprowadzania badania LTA wymagana jest odpowiednia ilość osocza, co wiąże się z pobraniem znacznej ilości krwi od pacjenta (nawet 20–25 ml) [7]. Dodatkowo wymagane są świeże próbki krwi, bez śladów hemolizy czy lipemii [19]. Nie zawsze jest możliwe uzyskanie tak dużej ilości próbek krwi, zwłaszcza w przypadku dzieci. Ważnym aspektem metody LTA jest także ilość PLT w osoczu bogatopłytkowym. Określenie liczby płytek krwi w próbce PRP zarówno badanego pacjenta, jak i osocza prawidłowego jest niezbędnym elementem badania LTA i stanowi wewnętrzną kontrolę warunków testu. Nie zaleca się wykonywania badania agregacji PLT, gdy ich liczba jest mniejsza niż 150 g/l. Wyklucza to możliwość zastosowania metody LTA do diagnostyki dysfunkcji płytek krwi z towarzyszącą małopłytkowością. Natomiast dyskusyjna pozostaje kwestia zbyt dużej liczby PLT. Rozcieńczanie PRP przy użyciu autologicznego PPP do pożądanego wartości stanowi wewnętrzną kontrolę warunków testu. Standaryzacja liczby PLT do pożądanego wartości 200–300 g/l może powodować nieprawidłową odpowiedź płytek krwi na zastosowanego agonistę i nie jest obecnie

zalecane. Jednak od lat standaryzowanie liczby płytek krwi było powszechnie wykonywaną procedurą podczas badania LTA [20, 21]. Diagnostyka PFD za pomocą metody LTA wymaga również właściwego przygotowania pacjenta do badania, tak aby wyeliminować wszystkie czynniki mogące wpływać na aktywność płytek krwi [19, 20]. Do czynników tych zaliczamy: aktywność fizyczną, używki, leki czy posiłek, a także rodzaj spożywanych pokarmów lub stosowanych używek [22]. Uważa się, że etap przedanalizy metody LTA jest najbardziej podatny na błędy. Z związku z powyższym tylko prawidłowe przygotowanie pacjenta do badania oraz właściwe obchodzenie się z pobranym materiałem pozwoli możliwie maksymalnie wyeliminować wpływ zmiennych przedanalizy na otrzymany wynik badania LTA. Interpretacja wyników testów agregacji płytek krwi może sprawiać wiele trudności, dlatego niezbędne jest doświadczenie osoby analizującej krzywe agregacyjne [7].

### **Pozostałe metody diagnostyki dysfunkcji płytek krwi**

Ze względu na liczne ograniczenia LTA bardzo ważne jest zastosowanie uzupełniających technik diagnostycznych służących ocenie funkcji płytek krwi. Wybór odpowiedniej metody pozwoli na potwierdzenie lub wykluczenie postawionej diagnozy w jak najkrótszym czasie, co odpowiednio umożliwi wdrożenie właściwego dla danej jednostki chorobowej leczenia, lub ukierunkuje dalszy proces diagnostyczny.

Szczególnie popularną oraz przesiewową metodą wykorzystywaną do oceny zaburzeń hemostazy pierwotnej jest badanie czasu okluzyj (CT) w aparacie PFA-100 lub PFA-200. Zasada metody PFA polega na ocenie czynności PLT w krwi pełnej, która przepływa przez otwór w błonie pokrytej odpowiednim agonistą agregacji (kolagenem i epinefryną lub kolagenem i ADP). Agoniści wywołują aktywację i agregację płytek, co powoduje zamknięcie otworu i prowadzi do ustania przepływu krwi. Ocenia się czas potrzebny do zamknięcia otworu błony poprzez tworzące się agregaty płytkowe. Badanie to jest bardzo użyteczne do diagnostyki ciężkich dysfunkcji płytek krwi (trombastenia Glanzmana czy zespół Bernarda-Souliera), natomiast wykazuje ograniczoną użyteczność w przypadku łagodniejszych trombocytopatii. Prawidłowy wynik badania PFA pozwala z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć poważne, wrodzone dysfunkcje PLT [23].

Tabela 3. Porównanie metod oceny zdolności płytek krwi do agregacji [6]

Metoda	Zasada metody	Agonista agregacji PLT	Badany materiał	Czas badania
LTA	Pomiar turbidymetryczny	AA, ADP, kolagen, epinefryna, rylostocetyna (dodatkowo agoniści panelu rozszerzonego)	PRP	1–2 godz.
PFA-100/200	Pomiar czasu CT	ADP, kolagen, epinefryna	Krew pełna	5–10 min
MEA	Pomiar impedancyjny	AA, kolagen, ADP, TRAP	Krew pełna	5–7 min

AA (*arachidonic acid*) — kwas arachidonowy, ADP (*adenosine diphosphate*) — adenozyndifosforan, CT (*closure time*) — czas zamknięcia, LTA (*light transmission aggregometry*) — agregometria oparta na transmisji światła widzialnego, MEA (*multi-electrode aggregometry*) — wieloelektrodowa agregometria, PFA-100/200 (*platelet function analyzer 100/200*) — analizator funkcji płytek krwi 100/200, PRP (*platelet-rich plasma*) — osocze bogatopłytkowe, TRAP (*thrombin receptor activating peptide*) — peptyd aktywujący receptor trombiny

Nieustanny postęp technologiczny diagnostyki dysfunkcji płytek krwi przyczynił się także do opracowania przyłóżkowych (POCT, *point-of-care testing*) metod oceny agregacji PLT. Zaliczamy do nich agregometrię opartą na zjawisku impedancji elektrycznej we krwi pełnej (MEA, *multiple electrode aggregometry*). Na zanurzonych w badanej próbce krwi elektrodach dochodzi do agregacji PLT na skutek interakcji z agonistą. Mierzona zmiana oporu elektrycznego (impedancji) jest wprost proporcjonalna do stopnia agregacji płytek krwi [24]. Do stymulacji krwinek płytkowych wykorzystuje się podstawowy panel czynników agregujących, choć w odmiennych stężeniach [7]. Warto podkreślić, że odpowiedź płytek krwi na te związki w przypadku LTA i agregometrii impedancyjnej jest różna, zwłaszcza w obecności ADP i epinefryny. Wynik pomiaru wyrażony w omach ( $\Omega$ ) może być konwertowany na arbitralne jednostki agregacji. W przeciwieństwie do metody LTA agregometria impedancyjna nie wymaga tak pracochłonnego przygotowania próbek, gdyż wykorzystuje próbkę krwi pełnej, co zdecydowanie znacznie skraca czas potrzebny do uzyskania wyniku oraz zmniejsza ryzyko aktywacji PLT przed przystąpieniem do badania. Wymagana jest także mniejsza ilość krwi w porównaniu z metodą LTA. Natomiast ograniczeniem agregometrii impedancyjnej jest jej zależność od liczby płytek krwi oraz wartości hematokrytu. Badanie agregacji PLT we krwi pełnej bardziej odzwierciedla warunki panujące *in vivo* w naczyniach krwionośnych, ze względu na obecność subpopulacji PLT oraz pozostałych elementów morfotycznych krwi. Jednakże badanie to nie uwzględnia wpływu śródbłonna naczyniowego oraz sił ścinających na aktywność płytek krwi. Porównanie powyższych metod oceny zdolności płytek krwi do agregacji w odpowiedzi na stymulację odpowiednim aktywatorem przedstawiono w tabeli 3. Metoda impedancyjna jest rzadziej stosowana w laboratoriach

hemostazy niż LTA. W piśmiennictwie brakuje szerzej zakrojonych badań porównawczych z LTA oraz doświadczeń klinicznych opisujących jej dokładną przydatność w diagnostyce zaburzeń funkcji płytek krwi [7].

Kolejną ważną dla diagnostyki PFD jest cytometria przepływowa (FCM, *flow cytometry*). Badanie to jest przede wszystkim wykonywane w celu ilościowej oceny (ekspresji) receptorów glikoproteinowych, których niedobory są przyczyną wrodzonych trombocytopatii [1]. Niewątpliwą zaletą tej metody jest możliwość kompleksowej oceny czynności płytek krwi, także wśród pacjentów z małopłytkowością. Dodatkowo, wymagana jest niewielka objętość krwi do badania [25]. Badanie cytometryczne GP płytkowych wykonuje się u pacjentów z odchyleniami w wynikach testów agregacji i/lub istotnym wywiadem klinicznym wskazującym na trombocytopatię. Dlatego FCM odgrywa ważną rolę w diagnostyce między innymi trombastenii Glanzmanna (niedobór lub brak GPIIb/IIIa) i zespołu Bernarda-Souliera (deficyt GPIb/IX/V) [7].

Coraz bardziej popularnym narzędziem diagnostycznym PFD stają się także badania molekularne. Zastosowanie technik sekwencjonowania nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*) pozwala na kompleksową analizę genów zaangażowanych w rozwój dysfunkcji płytek krwi. Dotychczas poznano ponad 80 genów, których mutacje odpowiadają za wystąpienie płytkowych skaz krwotocznych oraz skorelowano dany wariant patologiczny z prezentowanym fenotypem. Identyfikacja mutacji sprawczej pozwala na potwierdzenie postawionej diagnozy. Jednak ze względu na złożony charakter trombocytopatii wykrycie wariantu patogennego odpowiedzialnego za rozwój choroby staje się niekiedy problematyczne. Dodatkowo istnieje także możliwość wykrycia licznych wariantów o nieznannej etiologii (VUS, *variants of uncertain clinical*



*significance*). Ze względu na złożony charakter płytkowych skaz krwotocznych takie warianty wymagają dalszej analizy oraz ciągłej aktualizacji powszechnie używanych baz danych mutacji, aby mogły zostać uznane za łagodne lub patogenne [26]. Nieliczne laboratoria wykonują badania genetyczne w kierunku dysfunkcji płytek krwi, co stanowi znaczne ograniczenie tej metody w diagnostyce skaz krwotocznych. Mając na uwadze fakt, że płytkowe skazy krwotoczne to bardzo heterogenna grupa schorzeń, badania molekularne są głównie wykonywane w przypadku dobrze poznanych skaz płytkowych, takich jak: trombostenia Glanzmanna, zespół Bernarda-Souliera czy płytkowy typ choroby von Willebranda. Diagnostyka molekularna PFD nie jest zalecana jako badanie pierwszego wyboru, natomiast wyjątek stanowią niektóre rzadkie zaburzenia, które trudno zdiagnozować w inny sposób (jak np. QPD), a także stany w przypadku których istnieje kliniczne podejrzenie określonej PFD [27]. W takich sytuacjach wstępna analiza DNA może znacznie zaoszczędzić czas w uzyskaniu właściwego rozpoznania. Dlatego NGS stanowi skuteczne narzędzie diagnostyczne PFD, niemniej jednak niezbędne jest dokładne poznanie podłoża molekularnego płytkowych skaz krwotocznych, aby metoda ta mogła być rutynowo stosowana [28].

### Podsumowanie

Badanie LTA stanowi uznane przez specjalistów narzędzie diagnostyczne w ocenie dysfunkcji płytek krwi. Jednak brak standaryzacji procedury wykonania badania, pracochłonność i czasochłonność metody LTA czynią tę technikę dość podatną na błędy przedanalizacyjne, analityczne i interpretacyjne. Pomimo wielu podjętych prób standaryzacji procedury procesy analityczne nadal różnią się między laboratoriami, a interpretacja danych wymaga specjalistycznej wiedzy. Istotnym problemem w diagnostyce PFD jest ograniczenie dostępności LTA tylko do wysokospecjalistycznych laboratoriów hemostazy. Podjęte w ciągu ostatnich kilku lat i zakończone sukcesem próby automatyzacji LTA z wykorzystaniem analizatorów koagulologicznych (Siemens, Sysmex serii CS, Atellica) stanowią zatem przełom w dostępności tych testów i upraszczają wykonywanie w laboratorium i zlecanie testów LTA przez klinicystów [29]. Jak wykazały badania porównawcze tych analizatorów ze standardowym agregometrem, metoda zautomatyzowana charakteryzuje się wysoką powtarzalnością oraz zdecydowanie krótszym czasem przetwarzania próbek. Potrzebne są także dalsze badania wyżej

wymienionych analizatorów koagulologicznych w szerszym zakresie użyteczności, na przykład z użyciem alternatywnych agonistów agregacji płytek krwi lub u pacjentów z rzadkimi wrodzonymi zaburzeniami funkcji PLT, by w pełni ocenić ich wydajność i przydatność [30]. Warto również podkreślić, że ścisła współpraca klinicysty/hematologa z personelem laboratorium jest niezbędnym elementem we właściwej interpretacji wyników LTA i rozpoznaniu tak trudnych chorób hematologicznych, jakimi są trombocytopenie.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### Piśmiennictwo

- Odnoczko E, Baran B, Windyga J. Z hemostazą na „Ty”. Wyd. Bio-Ksel, Grudziądz 2016; 75-90.
- Paniccia R, Priora R, Liotta AA, et al. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015; 11: 133–148, doi: 10.2147/VHRM.S44469, indexed in Pubmed: 25733843.
- Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, et al. Advances in platelet function testing-light transmission aggregometry and beyond. *J Clin Med.* 2020; 9(8), doi: 10.3390/jcm9082636, indexed in Pubmed: 32823782.
- Alessi MC, Sié P, Payrastré B. Strengths and weaknesses of light transmission aggregometry in diagnosing hereditary platelet function disorders. *J Clin Med.* 2020; 9(3), doi: 10.3390/jcm9030763, indexed in Pubmed: 32178287.
- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013 [Epub ahead of print], doi: 10.1111/jth.12231, indexed in Pubmed: 23574625.
- Grove EL, Storey RF, Würtz M. Platelet function testing in atherothrombotic disease. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(33): 5379–5391, doi: 10.2174/138161212803251862, indexed in Pubmed: 22724414.
- Odnoczko E, Baran B, Windyga J. Zasady rozpoznawania skaz krwotocznych ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki laboratoryjnej. *Hematologia.* 2017; 7(4): 303–311, doi: 10.5603/hem.2016.0029.
- Frontroth JP. Light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2013; 992: 227–240, doi: 10.1007/978-1-62703-339-8\_17, indexed in Pubmed: 23546717.
- Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, et al. High-dose epinephrine enhances platelet aggregation at the expense of procoagulant activity. *Thromb Haemost.* 2021; 121(10): 1337–1344, doi: 10.1055/a-1420-7630, indexed in Pubmed: 33690868.
- Hvas AM, Favaloro EJ. Platelet function analyzed by light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 321–331, doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1\_25, indexed in Pubmed: 28804839.
- Israels SJ. Laboratory testing for platelet function disorders. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37 Suppl 1: 18–24, doi: 10.1111/ijlh.12346, indexed in Pubmed: 25976956.
- Gresele P. Subcommittee on platelet physiology of the international society on thrombosis and hemostasis. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH.

- J Thromb Haemost. 2015; 13(2): 314–322, doi: 10.1111/jth.12792, indexed in Pubmed: 25403439.
13. Fronthoff JP, Favaloro EJ. Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 473–494, doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1\_35, indexed in Pubmed: 28804849.
  14. Odnoczko E. Diagnostyka laboratoryjna choroby von Willebrand. *J Transf Med* 2012; 5(3): 103-107.
  15. Lin TM, Lin JS, Tseng JY, et al. Impaired responsiveness of platelets to epinephrine due to  $\alpha$ 2A adrenoreceptor deficiency in Male Chinese. *Platelets.* 2016; 27(2): 149–154, doi: 10.3109/09537104.2015.1049137, indexed in Pubmed: 26083800.
  16. Kubica J, Kozłowski M, Grzešek G. Mechanizmy działania leków przeciwplateletowych. *Folia Cardiologica Excerpta* 2009; 4: 1: 10–17.
  17. Abe H, Endo K, Shiba M, et al. Correlation between platelet thrombus formation on collagen-coated beads and platelet aggregation induced by ADP. *Transfus Apher Sci.* 2020; 59(1): 102560, doi: 10.1016/j.transci.2019.06.001, indexed in Pubmed: 31204292.
  18. Althaus K, Zieger B, Bakchoul T, et al. THROMKID-Plus Studiengruppe der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Standardization of Light Transmission Aggregometry for Diagnosis of Platelet Disorders: An Inter-Laboratory External Quality Assessment. *Thromb Haemost.* 2019; 119(7): 1154–1161, doi: 10.1055/s-0039-1688791, indexed in Pubmed: 31154663.
  19. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, et al. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J.* 2016; 14: 49, doi: 10.1186/s12959-016-0123-z, indexed in Pubmed: 27999475.
  20. Favaloro EJ. More on preanalytical variables affecting platelet function testing using light transmittance aggregometry. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49(4): 737–739, doi: 10.1515/CCLM.2011.112, indexed in Pubmed: 21275810.
  21. Ling LQ, Liao J, Niu Q, et al. Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets.* 2017; 28(7): 712–719, doi: 10.1080/09537104.2016.1265923, indexed in Pubmed: 28150526.
  22. Brennan Y, Levade M, Ward CM. Acquired platelet function disorders. *Thromb Res.* 2020; 196: 561–568, doi: 10.1016/j.thromres.2019.06.009, indexed in Pubmed: 31229273.
  23. Lassila R. Platelet Function Tests in Bleeding Disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2016; 42(3): 185–190, doi: 10.1055/s-0036-1571307, indexed in Pubmed: 26886396.
  24. Pluta J, Nicińska B, Trzebicki J. Multiple electrode aggregometry as a method for platelet function assessment according to the European guidelines. *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2018; 50(3): 230–233, doi: 10.5603/AIT.a2018.0024, indexed in Pubmed: 30001456.
  25. Navred K, Martin M, Ekdahl L, et al. A simplified flow cytometric method for detection of inherited platelet disorders-A comparison to the gold standard light transmission aggregometry. *PLoS One.* 2019; 14(1): e0211130, doi: 10.1371/journal.pone.0211130, indexed in Pubmed: 30673773.
  26. Ver Donck F, Downes K, Freson K. Strengths and limitations of high-throughput sequencing for the diagnosis of inherited bleeding and platelet disorders. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(8): 1839–1845, doi: 10.1111/jth.14945, indexed in Pubmed: 32521110.
  27. Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2022; 59(6): 405–444, doi: 10.1080/10408363.2022.2049199, indexed in Pubmed: 35341454.
  28. Nurden P, Stritt S, Favier R, et al. Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy. *Haematologica.* 2021; 106(2): 337–350, doi: 10.3324/haematol.2020.248153, indexed in Pubmed: 33147934.
  29. Platton S, McCormick Á, Bukht M, et al. A multicenter study to evaluate automated platelet aggregometry on Sysmex CS-series coagulation analyzers-preliminary findings. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018; 2(4): 778–789, doi: 10.1002/rth2.12140, indexed in Pubmed: 30349897.
  30. Stratmann J, Karmal L, Zwinge B, et al. Platelet aggregation testing on a routine coagulation analyzer: a method comparison study. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019; 25: 1076029619885184, doi: 10.1177/1076029619885184, indexed in Pubmed: 31773967.



# Acquired haemophilia A treated with recombinant factor VIIa by an infusion pump and midline catheter

Wiktoria Ryzewska<sup>1</sup>, Michał Witkowski<sup>2</sup> , Tadeusz Robak<sup>2, 3</sup> 

<sup>1</sup>Students' Scientific Circle at the Department of Haematology of the Medical University of Łódź, Poland

<sup>2</sup>Department of General Haematology, Copernicus Memorial Hospital, Łódź, Poland

<sup>3</sup>Hematology Clinic, Medical University in Łódź, Poland

## Summary

*Acquired haemophilia A is an autoimmune bleeding disorder treated with immunosuppression and bypassing agents such as recombinant factor VIIa (rFVIIa). The half time of rFVIIa is short, which requires frequent bolus injections in order to maintain hemostasis. Providing a continuous pump infusion instead of bolus injections could not only be more time and cost-efficient but also safer by maintaining a constant level of the bypassing agent.*

*rFVIIa is administered intravenously usually through a peripheral venous catheter. In patients with prolonged intravenous treatment or difficult-to-access peripheral vasculature, midline long peripheral intravenous catheters are an interesting alternative. They have favourable dwell times and failure rates while maintaining the same risk of infection as other peripherally inserted central catheters. This technique has the potential to reduce the costs as well as risk to the patients.*

*Herein, we report a case of a patient with AHA, who was treated with rFVIIa by an infusion pump and midline catheter.*

**Keywords:** acquired haemophilia A; infusion pump; recombinant factor VIIa; midline catheter

*J. Transf. Med. 2023; 16: 136–140*

## Introduction

Acquired haemophilia A (AHA) is a bleeding disorder caused by an autoimmune reaction between the autoantibodies (inhibitors) and factor VIII (FVIII). It occurs mainly in elderly patients with comorbidities as well as women around their pregnancy, often causing severe and prolonged bleeding [1, 2].

Acquired haemophilia A is a rare but severe bleeding disorder. There is no strict relationship between the activity of FVIII in plasma and the severity of hemorrhagic diathesis. The treatment of choice is the use of bypassing agents such as recombinant factor VIIa (rFVIIa), activated prothrombin complex concentrate (aPCC) or a relatively new treatment option — recombinant porcine factor VIII (rpFVIII) along with immunosuppressants

**Correspondence address:** dr n. med. Michał Witkowski, Department of General Hematology, Copernicus Memorial Hospital, ul. Pabianicka 62, 93–513 Łódź, Polska; tel: +48 426 895 191, e-mail: [michal.witkowski@fundacja.hematologiczna.org](mailto:michal.witkowski@fundacja.hematologiczna.org)  
Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 24.03.2023

Accepted: 26.06.2023

Early publication date: 14.07.2023

This article is available in open access under Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

such as prednisone, cyclophosphamide or rituximab [3].

The half time of bypassing agents, such as rFVIIa, is short (2.8 h in vivo for rFVIIa), which requires frequent bolus injections in order to maintain hemostasis [4]. There are studies discussing the use of infusion pump instead of bolus injections in AHA patients [4–6]. Providing a continuous pump infusion for patients with AHA could not only be more time-efficient but also safer by maintaining a constant level of the bypassing agent [4–6].

rFVIIa is administered intravenously usually through a peripheral venous catheter. When the patient requires prolonged intravenous treatment or the placement of a peripheral venous catheter is impossible, midline long peripheral venous catheters (MC) can be a good alternative [7]. They can be inserted at the patient's bedside, require no radiological verification and their bleeding safety profile does not differ from other venous catheters [8].

Herein, we report patient with AHA, who was treated with rFVIIa by an infusion pump and midline catheter.

### Case report

A 74-year-old Caucasian female was admitted to the General Haematology Inpatient Clinic due to ecchymoses of the upper and lower limbs, which had been occurring for several days. Prior to admission, patient was hospitalized due to sepsis and referred from county hospital with suspicion of AHA.

The patient had a history of *Escherichia coli* septic infection, pneumonia, urinary tract infection, chronic kidney disease, hypertension, chronic heart failure, atherosclerosis, bronchial asthma, hypothyroidism, depression, extrapyramidal symptoms and folic acid deficiency.

On admission, patient in average overall condition with extensive subcutaneous ecchymoses on the upper and lower limbs as well as lateral sides of thorax (Fig. 1–3). Laboratory studies revealed prolonged activated partial thromboplastin time (aPTT) of 104.9 s (normal range 25.4–36.9 s). There were no signs of thrombocytopenia, international normalized ratio (INR) and thrombin time (TT) were within the range. The level of factor VIII was less than 1% and inhibitor titer against human factor VIII was 4.9 j.B/ml (norm < 0.5 j.B/ml).

Patient was diagnosed with AHA and the following treatment was implemented: bypassing agent — recombinant human coagulation factor



**Figure 1.** Extensive ecchymosis of the left upper limb



**Figure 2.** Extensive ecchymosis of the right upper limb

VIIa — eptacog alfa (0.09 mg/kg intravenously (iv) in infusion pump with bolus intervals of 3 hours) and eradication of inhibitor — prednisone (1 mg/kg per day). Due to the fact that the placement of a peripheral venous catheter was not possible, a midline long peripheral venous catheter was placed.

The frequency of rFVIIa administration was being progressively prolonged to respectively 4 h and 6 h bolus intervals and ultimately the treatment was switched from infusion pump to bolus injections. Hemostatic treatment was then changed to porcine factor, and due to the intensification of anemia and increased demand for factor VIII, Anti-



**Figure 3.** Echymosis of the lower limb

-Inhibitor Coagulant Complex (Feiba) was applied. The treatment eradicating the inhibitor was also extended with cyclophosphamide, and then with rituximab, resulting in the elimination of the inhibitor and an increase in the value of factor VIII.

## Discussion

The administration of rFVIIa using an infusion pump is a novel but promising method. There are studies presenting the favorability of hemostatic effects in patients who are administered factor products, such as factor VIII or rFVIIa in infusion instead of intermittent bolus injections [9]. The dosage of rFVIIa is more precise when it is administered through an infusion pump. While administering a bolus injection, the dosage of rFVIIa is rounded to the closest number. Whereas through the pump, patients can be provided a precise fixed dose [6]. The precision of a dosage enables reduction of the expenses related to patient's treatment. It is also more convenient for the patient who is not woken up at night for bolus injection [6].

Fixed doses and intervals do not only offer more accurate, efficient and reliable administration but can also reduce burden on nursing staff and thus minimize the risk of human error [5]. According to study conducted by Pollard et al., the overall nursing time involved in reconstituting and administering rFVIIa can be reduced from 3–6 hours a day to 1–2 hours per day just by switching the

rFVIIa administration method from bolus to pump infusion [6].

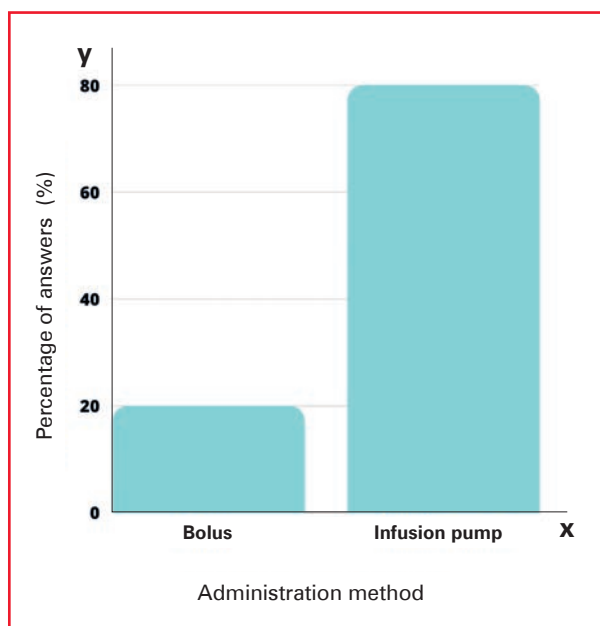
In terms of nursing time, an infusion pump of rFVIIa is also more favourable in comparison to recombinant porcine factor VIII (rpFVIII), which is a relatively new bypassing agent [3]. The dosage of rpFVIII should correspond to the FVIII levels, which ought to be closely monitored throughout the treatment. Therefore, in order to adjust the dosage of rpFVIII, patients require multiple factor VIII measurements [10]. rFVIIa is physically and chemically stable for over 24 hours when administered in an infusion pump, thus only one factor measurement daily is required in those patients [11].

We have conducted a survey among 10 nursing staff members working at the Department of General Hematology in Łódź with the aim to assess their preferences of rFVIIa administration. 80% of interviewees pointed to rFVIIa in infusion pump as more comfortable treatment method than 4h interval boluses. Half of the surveyed nursing staff members assessed infusion pump administration of rFVIIa as very easy (1 out of 5 points) while only 10% evaluated it as very difficult (5 out of 5 points). Amongst the advantages of the bolus administration over pump infusions, the majority defined lack of patient's permanent connection to the infusion pump. While as the greatest advantage of the infusion pump, 60% pointed to the administration of the drug at precise time intervals (Fig. 4–5).

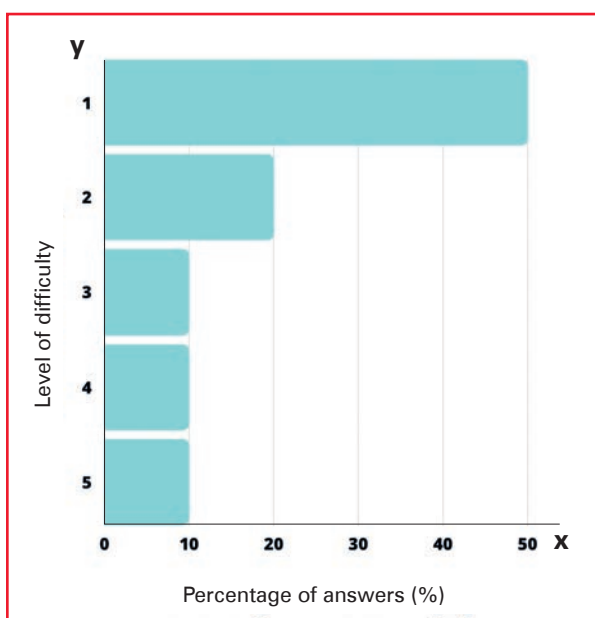
Intravenous infusion of rFVIIa can be administered through peripheral venous catheter. However in situation of prolonged intravenous treatment or difficult-to-access peripheral vasculature, patients are eligible for MC insertion [7]. MCs have favourable dwell times and failure rates against other types of catheters. They can be inserted at the patient's bedside and require no radiological verification [8]. They have a high rate of first-attempt placements as well as low complication rate. The risk of catheter-related bloodstream infections was proven not to be significantly different between MCs and PICCs (peripherally inserted central catheters) [12]. They have favourable dwell times and failure rates while maintaining the same risk of infection as other PICCs. This technique has potential to reduce the costs as well as risk to the patients [13–14].

## Conclusions

Administration of rFVIIa in infusion pump outweighs bolus intermittent injections in terms of accuracy and reliability. It is favoured amongst



**Figure 4.** Graph presenting the nursing staff's preferences regarding the way of recombinant factor VIIa administration. The x axis corresponds to the administration method. The y axis indicates the percentage of answers



**Figure 5.** Graph presenting the nursing staff's assessment of level of difficulty recombinant factor VIIa administration by infusion pump. The x axis corresponds to the percentage of answers. The y axis indicates the level of difficulty (from 1 — very easy to 5 — very difficult)

nursing staff and can have significant influence on minimizing the risk of human error. In patients with prolonged intravenous treatment or difficult-to-access peripheral vasculature, MCs are an interesting alternative.

**Conflict of interest:** none declared

**Authors contributions:** MW and TR proposed the idea of the case report. MW managed the patient. WR, MW contributed to writing the article. All authors (WR, MW, TR) contributed to revising and editing the manuscript.

## References

1. Webert KE. Acquired hemophilia A. *Semin Thromb Hemost.* 2012; 38(7): 735–741, doi: 10.1055/s-0032-1326779, indexed in Pubmed: 22941793.
2. Kruse-Jarres R, St-Louis J, Greist A, et al. Efficacy and safety of OBI-1, an antihaemophilic factor VIII (recombinant), porcine sequence, in subjects with acquired haemophilia A. *Haemophilia.* 2015; 21(2): 162–170, doi: 10.1111/hae.12627, indexed in Pubmed: 25623166.
3. Tiede A, Collins P, Knoebl P, et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *Haematologica.* 2020; 105(7): 1791–1801, doi: 10.3324/haematol.2019.230771, indexed in Pubmed: 32381574.
4. Bonde C, Jensen MB. Continuous infusion of recombinant activated factor VII: stability in infusion pump systems. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998; 9 Suppl 1: S103–S105, indexed in Pubmed: 9819038.
5. Négrier C, Chamouard V, Lienhart A, et al. A novel protocol for accurate and reliable postoperative bolus administration of recombinant factor VIIa using an automated mini-pump system. *Haemophilia.* 2019; 25(6): 1020–1027, doi: 10.1111/hae.13863, indexed in Pubmed: 31769912.
6. Pollard D, Subel B, Chowdhary P, et al. Use of an innovative syringe pump to deliver bolus rFVIIa for patients with haemophilia and inhibitors undergoing surgery. *J Haem Pract.* 2018; 4(1): 35–39, doi: 10.17225/jhp00093.
7. Bing S, Smotherman C, Rodriguez RG, et al. PICC versus midlines: Comparison of peripherally inserted central catheters and midline catheters with respect to incidence of thromboembolic and infectious complications. *Am J Surg.* 2022; 223(5): 983–987, doi: 10.1016/j.amjsurg.2021.09.029, indexed in Pubmed: 34600737.
8. Moulin V, Monti M. Central venous catheter, PICC-line or Midline: which catheter for my patient? *Rev Med Suisse.* 2022; 18(766): 121–125, doi: 10.53738/REVMED.2022.18.766.121, indexed in Pubmed: 35084138.
9. Stachnik JM, Gabay MP. Continuous infusion of coagulation factor products. *Ann Pharmacother.* 2002; 36(5): 882–891, doi: 10.1345/aph.1A338, indexed in Pubmed: 11978168.
10. Tarantino MD, Cuker A, Hardesty B, et al. Recombinant porcine sequence factor VIII (rpFVIII) for acquired haemophilia A: practical clinical experience of its use in seven patients. *Haemophilia.* 2017; 23(1): 25–32, doi: 10.1111/hae.13040, indexed in Pubmed: 27511890.
11. Rexen P, Jensen JT, Schwerin NB, et al. Eptacog Alfa (Activated) Is physically and chemically stable over 24 hours when administered as bolus injections in an automated infusion pump. *TH Open.* 2019; 3(1): e45–e49, doi: 10.1055/s-0039-1678684, indexed in Pubmed: 31249981.
12. Lu H, Hou Y, Chen J, et al. Risk of catheter-related bloodstream infection associated with midline catheters compared with peripherally inserted central catheters: A meta-analysis. *Nurs*



- Open. 2021; 8(3): 1292–1300, doi: 10.1002/nop2.746, indexed in Pubmed: 33372316.
13. Adams DZ, Little A, Vinsant C, et al. The midline catheter: a clinical review. *J Emerg Med.* 2016; 51(3): 252–258, doi: 10.1016/j.jemermed.2016.05.029, indexed in Pubmed: 27397766.
  14. Tripathi S, Kumar S, Kaushik S. The practice and complications of midline catheters: a systematic review. *Crit Care Med.* 2021; 49(2): e140–e150, doi: 10.1097/CCM.0000000000004764, indexed in Pubmed: 33372744.

# Nabyta hemofilia A leczona rekombinowanym czynnikiem VIIa z użyciem pompy infuzyjnej i wkłucia pośredniego

Wiktoria Ryzewska<sup>1</sup>, Michał Witkowski<sup>2</sup> , Tadeusz Robak<sup>2, 3</sup> 

<sup>1</sup>Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Hematologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

<sup>2</sup>Oddział Hematologii Ogólnej, Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii im. Mikołaja Kopernika, Łódź

<sup>3</sup>Klinika Hematologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

## Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Ryzewska W, Witkowski M, Robak T. Acquired haemophilia A treated with recombinant factor VIIa by an infusion pump and midline catheter. *J Transf Med* 2023; 16 (3): 136–140. DOI: 10.5603/JTM.2023.0007.

Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

*Nabyta hemofilia A to skaza krwotoczna o podłożu autoimmunologicznym, której leczenie obejmuje immunosupresję i leczenie omijające inhibitor, między innymi rekombinowanym czynnikiem VIIa (rFVIIa). Czas półtrwania rFVIIa jest krótki, co wymaga częstej podaży leku w celu utrzymania hemostazy. Zapewnienie ciągłego wlewu z pompy infuzyjnej zamiast podaży bolusów może się okazać nie tylko korzystne czasowo i finansowo, ale również bardziej bezpieczne dla pacjenta ze względu na możliwość utrzymania stałego poziomu czynnika omijającego inhibitor.*

*Zazwyczaj rFVIIa jest podawany dożylnie poprzez cewnik wprowadzany obwodowo. Ciekawą alternatywę dla pacjentów poddawanych leczeniu dożylnemu lub dla osób z trudnym dostępem naczyniowym stanowi wkłucie pośrednie (midline insertion). Złożenie takiego wkłucia jest bezpieczniejsze dla pacjenta, a ryzyko infekcji można porównać z ryzykiem przy zastosowaniu innych obwodowych cewników żylnych. Zastosowanie techniki wkłucia pośredniego stanowi mniejsze zagrożenie dla pacjentów i pozwala obniżyć koszty leczenia.*

*W niniejszym artykule przedstawiono przypadek pacjentki z nabytą hemofilią A, której podawano rFVIIa przez cewnik pośredni (midline) przy użyciu pompy infuzyjnej.*

**Słowa kluczowe:** nabyta hemofilia A; pompa infuzyjna; rekombinowany czynnik VIIa; wkłucie pośrednie (*midline*)

*J. Transf. Med.* 2023; 16: 141–145

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Michał Witkowski, Oddział Hematologii Ogólnej, Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii im. Mikołaja Kopernika, ul. Pabianicka 62, 93–513 Łódź; tel. 426 895 191, e-mail: [michal.witkowski@fundacja.hematologiczna.org](mailto:michal.witkowski@fundacja.hematologiczna.org)

Nadesłano: 24.03.2023

Przyjęto do druku: 21.04.2023

Data pierwszej publikacji: 26.06.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

## Wstęp

Nabyta hemofilia A (AHA, *acquired haemophilia A*) jest skazą krwotoczną spowodowaną reakcją autoimmunologiczną pomiędzy autoprzeciwciałami (inhibitorami) a czynnikiem VIII (FVIII). Występuje głównie u pacjentów w podeszłym wieku z chorobami współistniejącymi, a także u kobiet w okresie okołociążowym, często powodując ciężkie i długotrwałe krwawienia [1, 2].

Nabyta hemofilia A jest rzadkim, ale ciężkim zaburzeniem krzepnięcia. Nie ma ścisłej zależności pomiędzy aktywnością czynnika VIII w osoczu a intensywnością skazy krwotocznej. Leczeniem z wyboru jest stosowanie czynników omijających, takich jak rekombinowany czynnik VIIa (rFVIIa, *recombinant factor VIII*), koncentrat aktywowanego kompleksu protrombiny (aPCC, *activated prothrombin complex concentrate*) lub stosunkowo nowa opcja lecznicza — rekombinowany wieprzowy czynnik VIII (rpFVIII, *recombinant porcine factor VIII*) wraz z lekami immunosupresyjnymi, takimi jak prednizon, cyklofosfamid lub rytuksymab [3].

Ze względu na krótki czas półtrwania czynników omijających, takich jak rFVIIa (2,8 h *in vivo* dla rFVIIa), utrzymanie hemostazy wymaga częstego podawania leku w bolusach [4]. W niektórych badaniach autorzy omawiają zastosowanie pompy infuzyjnej do automatycznego podawania bolusów u chorych na AHA [4–6]. Zapewnienie ciągłego podawania bolusów pacjentom z AHA może się okazać nie tylko bardziej efektywne czasowo, ale również bezpieczniejsze dla pacjenta, ponieważ umożliwia utrzymanie stałego poziomu środka omijającego w ustroju [4–6].

Rekombinowany czynnik VIIa jest podawany dożylnie zazwyczaj przez obwodowy cewnik żylny. Jeśli pacjent wymaga przedłużonego leczenia dożylnego lub jeśli założenie obwodowego cewnika żylnego nie jest możliwe, dobrym rozwiązaniem może być tak zwane wkłucie pośrednie *midline* (MC, *midline catheter*) [7]. Założenie takiego cewnika przy łóżku chorego nie wymaga kontroli radiologicznej, a profil bezpieczeństwa krwawienia nie odbiega od profilu bezpieczeństwa dla innych cewników żylnych [8].

W niniejszej pracy przedstawiono przypadek chorej na AHA, u której zastosowano rFVIIa podawany przez cewnik pośredni (wkłucie pośrednie *midline*) i przy użyciu pompy infuzyjnej.

## Opis przypadku

Kobietę rasy kaukaskiej, w wieku 74 lat, przyjęto na Oddział Hematologii Ogólnej z powodu obserwowanych od kilku dni wybroczyn kończyn górnych i dolnych. Przed przyjęciem na oddział pacjentka przebywała w szpitalu powiatowym z powodu sepsy i została przekierowana ze względu na podejrzenie AHA.

W wywiadzie stwierdzono: zakażenie *Escherichia coli*, zapalenie płuc, zakażenie dróg moczowych, przewlekłą chorobę nerek, nadciśnienie tętnicze, przewlekłą niewydolność serca, miażdżycę, astmę oskrzelową, niedoczynność tarczycy, depresję, objawy zespołu pozapiramidowego oraz niedobór kwasu foliowego.

Przy przyjęciu stwierdzono rozległe podskórne wybroczyny na kończynach górnych i dolnych oraz po bokach klatki piersiowej (ryc. 1–3). W badaniach laboratoryjnych stwierdzono wydłużony czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT, *activated partial thromboplastin time*) wynoszący 104,9 s (zakres normy 25,4–36,9 s). Nie stwierdzono małopłytkowości, międzynarodowy współczynnik znormalizowany (INR, *international normalized ratio*) i czas trombinowy (TT, *thrombin time*) były w zakresie normy. Poziom czynnika VIII był poniżej 1%, a miano inhibitora wobec ludzkiego czynnika VIII wynosiło 4,9 j.B/ml (norma < 0,5 j.B/ml).

U pacjentki rozpoznano AHA i wdrożono następujące leczenie: czynnik omijający — rekombinowany ludzki czynnik krzepnięcia VIIa — *eptacog alfa* (0,09 mg/kg dożylnie [*i.v.*, *intravenous*]) podawany przy użyciu pompy infuzyjnej, z 3-godzinnymi odstępami pomiędzy bolusami, oraz eliminację inhibitora — prednizon (1 mg/kg dziennie). Ze względu na brak możliwości założenia obwodowego cewnika żylnego posłużono się cewnikiem pośrednim *midline*.

Odstępy pomiędzy dawkami rFVIIa stopniowo zwiększano do 4 godzin i 6 godzin, a ostatecznie zaczęto podawać lek w pojedynczych bolusach. W leczeniu hemostatycznym wprowadzono czynnik wieprzowy i preparat zespołu czynników krzepnięcia przeciw inhibitorowi czynnika VIII ze względu na nasilenie niedokrwistości i zwiększone zapotrzebowanie na czynnik VIII. Leczenie eradykujące rozszerzono również o cyklofosfamid, a następnie o rytuksymab, co pozwoliło wyeliminować inhibitor i uzyskać wzrost wartości czynnika VIII.



**Rycina 1.** Rozległa wybroczyna lewej kończyny górnej



**Rycina 3.** Rozległa wybroczyna kończyny dolnej



**Rycina 2.** Rozległa wybroczyna prawej kończyny górnej

## Dyskusja

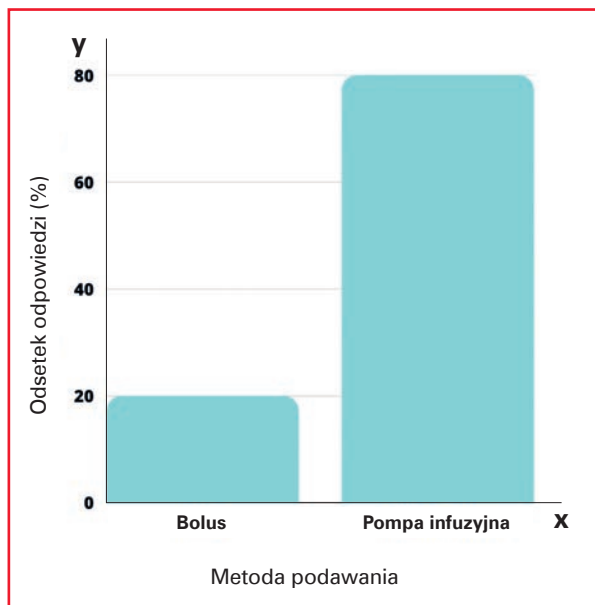
Podaż rFVIIa za pomocą pompy infuzyjnej jest metodą nowatorską, ale obiecującą. W wielu badaniach przedstawiono korzystne efekty hemostatyczne u pacjentów, którym podaje się czynniki krzepnięcia, takie jak czynnik VIII lub rFVIIa, za pomocą pompy infuzyjnej zamiast w postaci bolusów w odpowiednich odstępach [9]. Dawkowanie rFVIIa przez pompę infuzyjną jest bardziej precyzyjne. Podawanie rFVIIa w postaci wstrzyknięć (w bolusie) wiąże się z zaokrągleniem dawki do najbliższej liczby całkowitej, natomiast przy zastosowaniu pompy infuzyjnej pacjenci otrzymują

precyzyjnie wyliczoną, stałą dawkę preparatu [6]. Precyzyjnie wyliczona dawka przekłada się na zmniejszenie wydatków związanych z terapią, a dla pacjenta jest to bardzo korzystne, ponieważ nie trzeba go wybudzać w nocy po to, by wstrzyknąć kolejną dawkę leku [6].

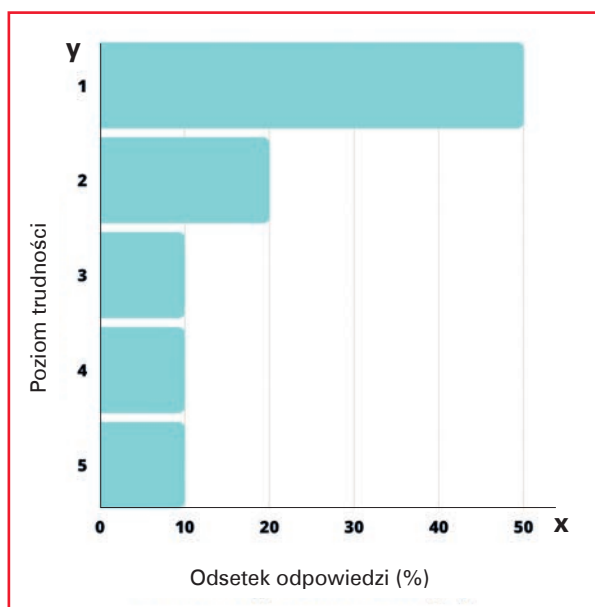
Stale dawki i odstępy czasowe nie tylko zapewniają dokładniejsze, bardziej skuteczne i pewne podawanie leków, ale również odciążają personel szpitalny w ich pracy, a tym samym przyczyniają się do zminimalizowania ryzyka wystąpienia błędu ludzkiego [5]. Zgodnie z badaniem Pollarda i wsp., całkowity czas pracy pielęgniarki związany z rekonstruowaniem i podawaniem rFVIIa można zredukować do 1–2 godzin dziennie (zamiast 3–6 godzin) wyłącznie dzięki zamianie metody podawania rFVIIa (użycie pompy infuzyjnej zamiast jednorazowych wstrzyknięć) [6].

Pod względem czasu poświęconego opiece nad pacjentem, podawanie rFVIIa przez pompę infuzyjną jest również korzystniejsze w odniesieniu do rpFVIII, który jest stosunkowo nowym środkiem omijającym [3]. Dawka rpFVIII powinna odpowiadać poziomowi FVIII, który należy monitorować w trakcie leczenia. W celu dostosowania dawki rpFVIII należy dokonać wielokrotnych pomiarów czynnika VIII [10]. Rekombinowany czynnik VIIa podawany w pompie infuzyjnej jest stabilny pod względem fizycznym i chemicznym przez okres ponad 24 godzin, dlatego pomiar tego czynnika u pacjenta wystarczy zrobić raz dziennie [11].





**Rycina 4.** Preferencje personelu pielęgniarskiego dotyczące sposobu podaży rekombinowanego czynnika VIIa. Oś x odpowiada metodzie podawania, a oś y odpowiada procentowi odpowiedzi



**Rycina 5.** Ocena personelu pielęgniarskiego dotycząca skali trudności podaży rekombinowanego czynnika VIIa przez pompę infuzyjną. Oś x odpowiada procentowi odpowiedzi, a oś y odpowiada poziomowi trudności (od 1—bardzo łatwy do 5 —bardzo trudny)

Autorzy niniejszego artykułu przeprowadzili ankietę wśród 10 członków personelu pielęgniarskiego zatrudnionego na Oddziale Hematologii Ogólnej w Łodzi w celu oceny ich preferencji dotyczących sposobu podawania rFVIIa. Osiemdzie-

siąt procent ankietowanych uznało, że podawanie rFVIIa w pompie infuzyjnej jest wygodniejsze niż stosowanie bolusów w odstępie 4 godzin. Połowa ankietowanych oceniła podawanie rFVIIa w pompie infuzyjnej jako metodę bardzo prostą (1/5 pkt), natomiast tylko 10% oceniło ją jako bardzo trudną (5/5 pkt). Wśród zalet podawania bolusa w porównaniu z użyciem pompy infuzyjnej większość ankietowanych wymieniła brak stałego podłączenia pacjenta do pompy infuzyjnej, natomiast 60% wskazało podawanie leku w ściśle określonych odstępach czasu jako największą zaletę pompy infuzyjnej (ryc. 4–5).

Rekombinowany czynnik VIIa można podawać przez wkłucie obwodowe, jednak w sytuacji przedłużającego się dożylnego leczenia lub trudnego dostępu do naczyń obwodowych chorych kwalifikuje się do wkłucia pośredniego (MC) [7]. Cewniki pośrednie charakteryzują się dłuższym czasem użytkowania i rzadziej ulegają awarii w porównaniu z innymi rodzajami cewników. Można je zakładać przy łóżku chorego, nie wymagają kontroli rentgenowskiej [8] i cechują się wysokim odsetkiem udanych pierwszorazowych prób zakładania oraz niskim odsetkiem powikłań. Wykazano, że ryzyko zakażeń krwi związane z MC nie różni się w istotny sposób od cewników centralnych wprowadzanych obwodowo (PICC, *peripherally inserted central catheters*) [12]. Charakteryzują się one dłuższym czasem użytkowania i mniejszym odsetkiem niepowodzeń przy zachowaniu takiego samego ryzyka zakażenia jak przy innych PICC. Technika ta pozwala obniżyć koszty leczenia jak również ryzyko zakażeń u pacjentów [13–14].

## Wnioski

Podawanie rFVIIa przy użyciu pompy infuzyjnej przewyższa wstrzyknięcia w bolusie w odstępach czasowych pod względem dokładności i niezawodności. Jest ono preferowane przez personel pielęgniarski i ma istotny wpływ na ograniczenie ryzyka błędu ludzkiego. U pacjentów z przedłużającym się leczeniem dożylnym lub z trudnym dostępem do naczyń obwodowych MC stanowią ciekawą alternatywę.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

**Wkład autorów:** MW i TR zaproponowali pomysł opisu przypadku. MW prowadził pacjentkę; WR, MW przyczynili się do napisania artykułu.

Wszyscy autorzy (WR, MW, TR) przyczynili się do weryfikacji i edycji manuskryptu.

## Piśmiennictwo

1. Webert KE. Acquired hemophilia A. *Semin Thromb Hemost.* 2012; 38(7): 735–741, doi: 10.1055/s-0032-1326779, indexed in Pubmed: 22941793.
2. Kruse-Jarres R, St-Louis J, Greist A, et al. Efficacy and safety of OBI-1, an antihaemophilic factor VIII (recombinant), porcine sequence, in subjects with acquired haemophilia A. *Haemophilia.* 2015; 21(2): 162–170, doi: 10.1111/hae.12627, indexed in Pubmed: 25623166.
3. Tiede A, Collins P, Knoebl P, et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *Haematologica.* 2020; 105(7): 1791–1801, doi: 10.3324/haematol.2019.230771, indexed in Pubmed: 32381574.
4. Bonde C, Jensen MB. Continuous infusion of recombinant activated factor VII: stability in infusion pump systems. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998; 9 Suppl 1: S103–S105, indexed in Pubmed: 9819038.
5. Négrier C, Chamouard V, Lienhart A, et al. A novel protocol for accurate and reliable postoperative bolus administration of recombinant factor VIIa using an automated mini-pump system. *Haemophilia.* 2019; 25(6): 1020–1027, doi: 10.1111/hae.13863, indexed in Pubmed: 31769912.
6. Pollard D, Subel B, Chowdary P, et al. Use of an innovative syringe pump to deliver bolus rFVIIa for patients with haemophilia and inhibitors undergoing surgery. *J Haem Pract.* 2018; 4(1): 35–39, doi: 10.17225/jhp00093.
7. Bing S, Smotherman C, Rodriguez RG, et al. PICC versus midlines: Comparison of peripherally inserted central catheters and midline catheters with respect to incidence of thromboembolic and infectious complications. *Am J Surg.* 2022; 223(5): 983–987, doi: 10.1016/j.amjsurg.2021.09.029, indexed in Pubmed: 34600737.
8. Moulin V, Monti M. Central venous catheter, PICC-line or Midline: which catheter for my patient? *Rev Med Suisse.* 2022; 18(766): 121–125, doi: 10.53738/REVMED.2022.18.766.121, indexed in Pubmed: 35084138.
9. Stachnik JM, Gabay MP. Continuous infusion of coagulation factor products. *Ann Pharmacother.* 2002; 36(5): 882–891, doi: 10.1345/aph.1A338, indexed in Pubmed: 11978168.
10. Tarantino MD, Cuker A, Hardesty B, et al. Recombinant porcine sequence factor VIII (rpFVIII) for acquired haemophilia A: practical clinical experience of its use in seven patients. *Haemophilia.* 2017; 23(1): 25–32, doi: 10.1111/hae.13040, indexed in Pubmed: 27511890.
11. Rexen P, Jensen JT, Schwerin NB, et al. Eptacog Alfa (Activated) Is physically and chemically stable over 24 hours when administered as bolus injections in an automated infusion pump. *TH Open.* 2019; 3(1): e45–e49, doi: 10.1055/s-0039-1678684, indexed in Pubmed: 31249981.
12. Lu H, Hou Y, Chen J, et al. Risk of catheter-related bloodstream infection associated with midline catheters compared with peripherally inserted central catheters: A meta-analysis. *Nurs Open.* 2021; 8(3): 1292–1300, doi: 10.1002/nop.2.746, indexed in Pubmed: 33372316.
13. Adams DZ, Little A, Vinsant C, et al. The midline catheter: a clinical review. *J Emerg Med.* 2016; 51(3): 252–258, doi: 10.1016/j.jemermed.2016.05.029, indexed in Pubmed: 27397766.
14. Tripathi S, Kumar S, Kaushik S. The practice and complications of midline catheters: a systematic review. *Crit Care Med.* 2021; 49(2): e140–e150, doi: 10.1097/CCM.0000000000004764, indexed in Pubmed: 33372744.

# Issues related to artificial tears were discussed at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023

Katarzyna Chmielewska , Joanna Janus , Jolanta Antoniewicz-Papis 

Department of Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

Serum-based artificial tears are becoming increasingly popular worldwide. During the ISBT (International Society of Blood Transfusion) congress held in Gothenburg, Sweden, in 2023, research centers from various countries shared their experiences on the topic. Artificial tears are primarily used in the treatment of dry eye syndrome (DES), a condition associated with abnormal secretion of the tear film. Visual disturbances and headaches associated with DES have a negative impact on every day activity. In his 2021 study, Papis states that the prevalence of DES is growing and currently affects nearly 10% of the global population [1]. Because the procedure of collecting blood from older individuals or persons undergoing cancer treatment may often prove problematic, more attention is focused on allogeneic tears which are becoming increasingly popular.

During the first day of the ISBT congress, which was dedicated to Scandinavia (Nordic Day), Sofia Frändberg from Sahlgrenska Universitetssjukhuset in Sweden presented the activities of her centre as regards the preparation of serum-based eye drops. The centre has been involved in the preparation of autologous serum-based tears since 2016. Three types of eye drops are produced: 100% and 20% serum-based eye drops and eye drops with platelet-rich plasma (PRP). The eye drops are prepared following orders from ophthalmic clinics. The COL 10/20 system from Biomed Device is used for capsule portioning, and then

the eye drops are frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until release, which occurs when microbiological tests prove negative. The amount of capsules issued is sufficient for a 2-month treatment of DES. Between 2019 and 2020, the number of referrals for artificial tears at Sahlgrenska Universitetssjukhuset increased by 45%, which only confirms the growing interest in serum-based artificial tears [2].

During the poster session, as many as 7 posters were dedicated to artificial tears. Specialists from various countries presented their own experiences on the topic. The Rambam Health Care Campus in Israel described their experience from the preparation of autologous artificial tears. The procedure was implemented in 2022, when the Israeli Ministry of Health entrusted the supervision and production of artificial tears to blood banks. Patients received a 20% or 50% concentration of serum eye drops to be administered 4 to 8 times daily for 2 to 3 months. During 12 months of their activity, 135 patients benefited from autologous serum tears. The main indications for treatment were: dry eye syndrome (DES) associated with Graft-versus-Host Disease (GvHD) and corneal neuralgia. The procedure was implemented in blood banks and this move resulted in a widespread adoption of the method and an easier access for Israel patients to artificial tear drops [3].

The scientists from Uniklinik Köln in Germany presented their 11-year experience related to the preparation of autologous eye drops. As it

---

**Correspondence address:** mgr Katarzyna Chmielewska, Department of Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, Polska, tel: +48 22 34 96 388, e-mail: kchmielewska@ihit.waw.pl  
 Translation: mgr Krystyna Dudziak

Received: 29.08.2023

Accepted: 14.09.2023

Early publication date: 27.09.2023

This article is available in open access under Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

was sometimes difficult to obtain samples of whole blood from patients, the research team also concentrated on the production of allogeneic tears and presented their 6-year experience in the field. In total, the Uniklinik Köln produced 2466 preparations of autologous and allogeneic tears. Between 2017 and 2022, 556 allogeneic tear products were prepared for 140 patients, children included. For allogeneic tear production, it was necessary to find a suitable donor eligible for whole blood donation. The donor was selected for a specific recipient based on ABO blood group and Rh antigen (D antigen) compatibility. The tear drops were issued once a negative microbiological test result became available. The entire procedure however, (starting with suitable donor search) is time-consuming and that may be a problem for patients who require urgent intervention [4].

Storage and issue of serum eye drops may pose a challenge for many centres. Because of the excellent treatment outcomes with both autologous and allogeneic tears, centres worldwide are striving to find the most convenient method for capsule storage. No preservatives are added to serum and the shelf life of thawed serum is short, therefore the system used for portioning and application must be adapted to serve only several applications. The volume of serum in the capsule should not be too large so as to avoid wastage and, most importantly, to prevent bacterial contamination of artificial tears. One of the topics discussed at the poster session of the ISBT congress was the use of the Meise Medizintechnik GmbH system by the Australian Red Cross Lifeblood in Australia for the preparation of serum tears. In May 2020, the Australian Red Cross Lifeblood introduced the packaging process for artificial tears using Meise technology. A specific group of patients received tears packaged in the new vials and were asked to complete questionnaires to assess improvement or deterioration of their health condition as well as their experience using the Meise system. The patients used the eye drops approximately five times daily. The centre also shared the results obtained from patients treated with autologous and allogeneic serum. Surveys were collected from 24 patients who had previously received autologous tears, as well as from 40 new patients. Additionally, feedback was obtained from 10 regular patients and 8 new patients who used allogeneic tears. The average age was 57 years ( $\pm 13$ ) for patients using autologous tears and 70–74 years ( $\pm 11$ ) for those applying allogeneic tears. The results obtained for Australian patients indicate better efficacy of

autologous tears. The Meise system was positively evaluated; however, some patients reported difficulties with opening and closing the vials [5].

The Institute of Hematology and Transfusion Medicine (IHTM) presented three posters devoted to autologous and allogeneic artificial tears. The statistical data from IHTM included 1493 autologous donations for the production of artificial tears. Both adults and paediatric patients benefited from the use of the artificial tears. Over the course of 3 years since 2019 when allogeneic tears were first introduced, 114 patients had benefited. An analysis of the medical conditions for which patients sought treatment with artificial tears was also presented. The most common indication for the use of artificial tears was dry eye syndrome (DES), including DES of various aetiologies: Sjögren's syndrome, Graft-versus-Host Disease (GvHD), cataracts, glaucoma, and corneal damage resulting from mechanical trauma or surgical procedures. The analysis also included the assessment of the Ocular Surface Disease Index (OSDI) in patients participating in the study devoted to the use of allogeneic tears. Between 2019 and 2022, 51 patients returned completed OSDI questionnaires. The average OSDI score before the use of allogeneic serum tears was 67.94. After the use of allogeneic serum tears without any additional processing, the OSDI score was reduced to 51.60. The OSDI score after the use of inactivated allogeneic serum tears was 44.75. In all three cases, the eye drops were used for one month. The effect of using the eye drops was reported to be very good, with the questionnaires indicating a significant improvement in the patients' health condition [6].

The IHTM also highlighted the stability of vitamin A in artificial tears, which is essential for the proliferation and proper functioning of corneal epithelial cells. For healthy individuals, the reference range for serum vitamin A concentration is typically 0.2–0.43 mg/L. On average, the initial concentration of vitamin A in the samples was 0.33 mg/L. After a 6-month storage period, the average concentration of vitamin A was 0.36 mg/L. According to the presented findings, vitamin A in serum remains stable for up to 6 months if stored under standard conditions for this preparation, which is typically at  $-18^{\circ}\text{C}$  [7].

The IHTM conducted another study in which the concentrations of interleukins IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, IL-10, and vascular endothelial growth factor (VEGF) were examined. The analysis included 38 serum samples collected from autologous donors and 10 serum samples collected from 7 do-



**Table 1.** Information on artificial tears. Data from the ISBT congress held in Goteborg (Sweden) in 2023

Medium	Serum dilution (%)	The system used for instillation	Dosage	Application
Sahlgrenska Universitetssjukhuset (Gothenburg, Sweden)	100% 20%	COL system (Biomed)	Not specified	DES and DES of various etiologies: GvHD, Sjögren's syndrome, mechanical corneal injury
Rambam Health Care Campus (Haifa, Israel)	50% 20%	COL system (Biomed)	4–8 times daily	DES, DES associated with GvHD, corneal neuralgia
Uklinik Köln (Cologne, Germany)	Not specified	Meise system (Meise Medizintechnik GmbH)	Not specified	DES, DES associated with GvHD
Australian Red Cross Lifeblood (Australia)	Not specified	Meise system (Meise Medizintechnik GmbH)	5 times daily	Not specified
Institute of Hematology and Transfusion Medicine (Warsaw, Poland)	100%	Long Drains (Technochemistry)	2–6 times daily	DES of various etiologies: Sjögren's syndrome, GvHD, cataracts, glaucoma, mechanical damage to the cornea, or damage resulting from surgical procedures

GvHD — graft-versus-host disease; DES — dry eye syndrome

nors. The cytokine concentrations in the 6 samples from allogeneic donors were significantly lower than in the autologous samples, with the exception of IL-2. During the study, very high levels of cytokines IL-1 $\beta$  (47.26 pg/mL), IL-2 (0.49 pg/mL), IL-6 (55.60 pg/mL), IL-10 (34.83 pg/mL), and VEGF (63.86 pg/mL) were observed in one of the donors, with negative impact on the efficacy of their serum for patients. The patients reported improvement in eye condition, although not as satisfactory as in the case of eye drops prepared from the serum of other donors. The high cytokine levels in the “outlier” donor may indicate the onset of an infection, recent surgical procedure, or the early stages of an autoimmune disease. During the screening of blood donors for the preparation of allogeneic artificial tears, it may be beneficial to expand the medical interview and include cytokine profiling as part of the examination [8].

The Blood Services and Apheresis Institute in Israel presented the protocol of preparing eye drops from fresh frozen plasma dedicated to individuals with DES associated with GvHD. The patients were treated for three months only with FFP eye drops. The eye drops were prepared from apheresis plasma. The plasma was aliquoted using the COL system by Biomed. Patients were asked to complete the OSDI questionnaire, they had the fluorescein eye stain test, and were provided with a questionnaire to assess the quality of life after

using the eye drops. The eye drops were compatible with the patients' blood groups and only one AB blood type patient received group A eye drops. 25 individuals were enrolled in the study. One of them reported ocular irritation after using the tear drops for 2 months but the irritation resolved when a different batch of eye drops was used. No other adverse reactions were reported. This prospective phase II study demonstrated that the treatment of chronic GVHD with drops prepared from allogeneic fresh frozen plasma is safe and effective. This therapy is beneficial in the case of GVHD, because allogeneic FFP contains no pro-inflammatory cytokines and immunological factors that may be present in autologous serum or plasma [29].

The growing interest in the use of artificial tears, has led to increasingly high numbers of products prepared in centres which implement new formulas and procedures for autologous and allogeneic artificial tears. Indeed, the current situation calls for development of standardized procedures to ensure that the treatment with artificial tears meets the specific needs of patients.

Treatment with both autologous and allogeneic artificial tears gives very good results in the therapy of the dry eye syndrome (DES) as well as in the treatment of patients with DES associated with graft-versus-host disease (GVHD). One of the challenges that the centres face is the lack of standardized procedures for producing highest

possible quality tears. Preparation stages such as clotting, centrifugation, or dilution, may have impact on the biochemical properties of artificial tears. According to a study conducted by Jaksche A. in 2005, undiluted serum provided slightly better results than diluted serum [10]. It seems necessary to establish a working group that would be responsible for developing guidelines for the preparation of both autologous and allogeneic artificial tears. Table 1 shows the collected data from the ISBT congress in Sweden and presents the differences in the methodology of preparing artificial tears in different countries.

Development of a standardized patient eligibility protocol and selection of the appropriate source material (serum/PRP, autologous/allogeneic) would facilitate the implementation of the procedure in a greater number of centres, thus improving access to treatment. The above mentioned centres report an increase in the number of patients, which further confirms the need to establish uniform standards and to continue research on artificial tears.

**Conflict of interest:** none declared

### References

1. Papas EB. The global prevalence of dry eye disease: A Bayesian view. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2021; 41(6): 1254–1266, doi: 10.1111/opo.12888, indexed in Pubmed: 34545606.
2. Frändberg S, Persson I. Autologous serum eye drops, experiences drawn from implementation and production of a novel blood component at university hospital in Sweden. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 12: LD03–L03.
3. Bonstein L, Smarktin K, Benaim I, et al. Treatment satisfaction and prescription refills among ocular surface disease patients treated with autologous serum: Data from the first Israeli study of blood bank-produced serum eye drops. *Vox Sanguinis Vox Sang.* 2023; 118(S1): 209: P192.
4. Pamuk A, Katardzic Ha, Störmer M, et al. Serum Eye drop experience in manufacturing: 11 years autologous and for 6 year allogeneic. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 213: P200.
5. Hirani R, Mondy P, Gemelli C, et al. Patient reported outcomes of serum eye drops manufactured from Australian blood donations and packaged using MEISE vials. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 208: P191.
6. Janus J, Chmielewska K, Mikołowska A, et al. Experience with autologous and allogeneic serum eyedrops. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 137: P040.
7. Janus J, Chmielewska K, Mikołowska A, et al. Stability of vitamin A in allogeneic serum-based eyedrops. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 212: P198.
8. Chmielewska K, Janus J, Mikołowska A, et al. High cytokine levels in donors who donate blood for allogeneic artificial tears. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 213: P199.
9. Yahalom V, Nahum Y, Sarsur A, et al. Allogeneic fresh frozen plasma preparation for the treatment of ocular GVHD. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 211: P196.
10. Jaksche A, Sbeity Z, Domeier E, et al. Undiluted versus Diluted Autologous Serum Eye Drops (ASED): A prospective, randomized, double-blind study in patients with refractory dry eye-syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(13): 2045.

# Zagadnienia dotyczące sztucznych łez poruszone na 33. Regionalnym Kongresie *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku

Katarzyna Chmielewska , Joanna Janus , Jolanta Antoniewicz-Papis 

Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Chmielewska K, Janus J, Antoniewicz-Papis J. Issues related to artificial tears were discussed at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023. *J Transf Med* 2023; 16 (3): 146–149. DOI: 10.5603/jtm.97618. Należy cytować wersję pierwotną.

Sztuczne łzy z surowicy cieszą się coraz większą popularnością na całym świecie. Podczas kongresu *International Society of Blood Transfusion (ISBT)*, który odbył się w Göteborgu (Szwecja) w 2023 roku, ośrodki z różnych krajów podzieliły się swoimi doświadczeniami w tym temacie. Sztuczne łzy są wykorzystywane głównie w leczeniu zespołu suchego oka (ZSO). Schorzenie to wiąże się z nieprawidłowym wydzielaniem filmu łzowego. Zaburzenie ostrości widzenia lub bóle głowy związane z ZSO wpływają negatywnie na codzienne funkcjonowanie wielu osób. Papis w swojej pracy z 2021 roku podaje, iż częstość występowania ZSO wzrasta i na ten moment dotyka prawie 10% światowej populacji [1]. Ze względu na trudności w pobraniu krwi od osób starszych lub po leczeniu onkologicznym popularne stają się również łzy allogeniczne.

Podczas pierwszego dnia kongresu ISBT, który był poświęcony Skandynawii (*Nordic Day*), Sofia Frändberg z *Sahlgrenska Universitetssjukhuset* w Szwecji przedstawiła działalność swojego ośrodka w zakresie kropli do oczu z surowicy. Ośrodek zajmuje się sztucznymi łzami autologicznymi od 2016 roku. Wykonywane są w nim trzy rodzaje kropli do oczu: ze 100% surowicy, 20% surowicy oraz krople z osocza bogatopłytkowego (PRP, *platelet rich plasma*). Krople są wykonywane na

podstawie skierowań z klinik okulistycznych. Do porcjowania kapsułek jest wykorzystywany system COL 10/20 firmy Biomed Device, następnie krople są zamrażane i przechowywane w temperaturze –20°C do momentu zwolnienia, który następuje po otrzymaniu ujemnych wyników badań mikrobiologicznych. Wydawana liczba kapsułek wystarcza na 2 miesiące leczenia ZSO. Liczba skierowań w latach 2019–2020 na wykonanie sztucznych łez w *Sahlgrenska Universitetssjukhuset* wzrosła o 45%, co potwierdza zwiększone zainteresowanie sztucznymi łzami z surowicy [2].

Podczas sesji plakatowej w trakcie Kongresu aż 7 plakatów dotyczyło tematu sztucznych łez. Specjaliści z różnych krajów przedstawili swoje doświadczenia w tym temacie. *Rambam Health Care Campus* w Izraelu opisał doświadczenia związane z wykonywaniem sztucznych łez autologicznych. Procedura została wdrożona w 2022 roku, kiedy Izraelskie Ministerstwo Zdrowia powierzyło nadzór oraz wykonywanie sztucznych łez bankom krwi. Pacjenci otrzymywali rozcieńczoną surowicę: 20% lub 50%. Dozowanie kropli następowało 4–8 razy dziennie przez okres 2–3 miesięcy. Przez 12 miesięcy działalności z łez z surowicy autologicznej skorzystało 135 pacjentów. Głównymi wskazaniami do leczenia był: ZSO związany z chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD, *graft-versus-host*

**Adres do korespondencji:** mgr Katarzyna Chmielewska, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indyry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel. +48 22 34 96 388, e-mail: kchmielewska@ihit.waw.pl

Nadesłano: 29.08.2023

Przyjęto do druku: 14.09.2023

Data pierwszej publikacji: 27.09.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

disease) oraz neuralgia rogówki. Wdrożenie procedury w bankach krwi pozwoliło na rozpowszechnienie metody i łatwiejszy dostęp dla pacjentów na terenie Izraela [3].

Zespół z *Uniklinik Köln* z Niemiec przedstawił swoje 11-letnie doświadczenie w wykonywaniu kropli autologicznych. Ze względu na problemy z pobraniem krwi pełnej pacjentów zaprezentowano również 6-letnie doświadczenie w wykonywaniu łez allogenicznych. Łącznie w *Uniklinik Köln* uzyskano 2466 preparatów. W latach 2017–2022 wykonano 556 preparatów allogenicznych dla 140 pacjentów. Wśród pacjentów korzystających z kropli allogenicznych znalazły się również dzieci. W celu wykonania sztucznych łez allogenicznych należało znaleźć odpowiedniego dawcę, który po pozytywnej kwalifikacji lekarskiej został dopuszczony do oddania krwi pełnej. Dawca był dobierany do konkretnego biorcy pod względem zgodności grupy krwi w układzie ABO oraz antygenu D z układu Rh. Po pobraniu, wykonaniu łez oraz uzyskaniu ujemnego wyniku mikrobiologicznego preparat był gotowy do wydania. Niestety cała procedura, łącznie z szukaniem odpowiedniego dawcy, jest bardzo czasochłonna, co stało się problematyczne w przypadku pacjentów potrzebujących pilnej interwencji [4].

Przechowywanie oraz wydawanie kropli z surowicy stanowi wyzwanie dla wielu ośrodków. Ze względu na bardzo dobre wyniki leczenia sztucznymi łzami autologicznymi oraz allogenicznymi ośrodki na całym świecie próbują znaleźć najwygodniejszy sposób przechowywania kapsulek. Z powodu braku substancji konserwujących dodawanych do surowicy oraz krótkiego terminu przydatności rozmrożonej surowicy system użyty do porcjowania i zakraplania musi zostać przystosowany do maksymalnie kilkukrotnego użycia przez pacjenta. Objętość surowicy w fiolce/drenie nie może być duża, aby uniknąć strat oraz, co najważniejsze, zakażenia bakteriami sztucznych łez. Jednym z tematów poruszonych na sesji plakatowej kongresu ISBT było użycie systemu *Meise Medizintechnik GmbH* przez *Australian Red Cross Lifeblood* w Australii w procedurze wykonywania łez z surowicy. *Australian Red Cross Lifeblood* w maju 2020 roku wprowadził proces pakowania sztucznych łez w technologii *Meise*. Określona grupa pacjentów otrzymała łzy zapakowane w nowe fiolki oraz została poproszona o wypełnienie kwestionariuszy, które dotyczyły oceny poprawy lub pogorszenia stanu zdrowia oraz użytkowania systemu *Meise*. Pacjenci stosowali krople około 5 razy dziennie. Ośrodek podzielił się również wynikami uzyskanymi od pacjentów po

leczeniu surowicą autologiczną oraz allogeniczną. Uzyskano ankiety od 24 pacjentów przyjmujących już wcześniej krople autologiczne oraz od 40 nowych pacjentów, a także od 10 stałych i 8 nowych pacjentów przyjmujących łzy allogeniczne. Średnia wieku wynosiła 57 lat ( $\pm 13$ ) dla pacjentów przyjmujących krople autologiczne i 70–74 lat ( $\pm 11$ ) dla pacjentów przyjmujących krople allogeniczne. W przypadku pacjentów z Australii uzyskane wyniki wskazują na lepsze działanie łez autologicznych. Zastosowany system *Meise* został pozytywnie oceniony, jednak niektórzy pacjenci zwrócili uwagę na trudność w otwieraniu i zamykaniu fiolek [5].

Instytut Hematologii i Transfuzjologii przedstawił 3 plakaty, które dotyczyły sztucznych łez autologicznych oraz allogenicznych. Przedstawiono dane statystyczne Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, w których uwzględniono 1493 pobrane donacje autologiczne w celu wykonania sztucznych łez. Z łez korzystali dorośli oraz pacjenci pediatryczni. W 2019 roku wprowadzono łzy allogeniczne, z których w ciągu 3 lat skorzystało 114 pacjentów. Przedstawiono również analizę jednostek chorobowych, z którymi zgłaszali się pacjenci. Najczęstszym wskazaniem do wykonania sztucznych łez był ZSO, jak również ZSO o różnej etiologii: zespół Sjögrena, GvHD oraz zaćma, jaskra i uszkodzenie rogówki mechaniczne lub w wyniku operacji chirurgicznej. Przeanalizowano również wskaźnik choroby powierzchni oka (OSDI, *ocular surface diseases index*) pacjentów biorących udział w badaniu dotyczącym zastosowania kropli allogenicznych. W latach 2019–2022 51 pacjentów zwróciło wypełnione kwestionariusze OSDI. Średni wynik OSDI przed zastosowaniem kropli z surowicy allogenicznej wynosił 67,94. Po zastosowaniu allogenicznych kropli z surowicy niepoddawanych żadnej dodatkowej preparatyce wynosił 51,60. Wskaźnik choroby powierzchni oka po zastosowaniu inaktywowanych allogenicznych kropli z surowicy wynosił 44,75. We wszystkich trzech przypadkach krople do oczu stosowano przez miesiąc. Efekt stosowania kropli był bardzo dobry, formularze wskazywały na dużą poprawę stanu zdrowia pacjentów [6].

Instytut Hematologii i Transfuzjologii zwrócił również uwagę na stabilność witaminy A w sztucznych łzach, która jest niezbędna do proliferacji i prawidłowego funkcjonowania komórek nabłonka rogówki. Dla osób zdrowych zakres referencyjny stężenia witaminy A w surowicy wynosi 0,2–0,43 mg/l. Początkowe stężenie witaminy A w próbkach wynosiło średnio 0,33 mg/l. Po okresie 6-miesięcznego przechowywania średnie stężenie



**Tabela 1.** Informacje o sztucznych łzach. Dane pochodzą z kongresu ISBT (Goteborg [Szwecja] 2023 r.)

Ośrodek	Rozcieńczenie surowicy (%)	System użyty do zakraplania	Dawkowanie	Zastosowanie
Sahlgrenska Universitetssjukhuset (Goteborg, Szwecja)	100% 20%	COL system (Biomed)	Nie podano	ZSO, ZSO o różnej etiologii: GvHD, zespół Sjogrena, mechaniczne uszkodzenie rogówki
Rambam Health Care Campus (Haifa, Izrael)	50% 20%	COL system (Biomed)	4–8 razy dziennie	ZSO, ZSO związane z GvHD, neuralgią rogówki
Uniklinik Köln (Kolonja, Niemcy)	Nie podano	<i>Meise system (Meise Medizintechnik GmbH)</i>	Nie podano	ZSO, ZSO związane z GvHD
Australian Red Cross Lifeblood (Australia)	Nie podano	<i>Meise system (Meise Medizintechnik GmbH)</i>	5 razy dziennie	Nie podano
Instytut Hematologii i Transfuzjologii (Warszawa, Polska)	100%	Długie dreny (Technochemia)	2–6 razy dziennie	ZSO o różnej etiologii: zespół Sjogrena, GvHD, zaćma, jaskra, uszkodzenie rogówki mechaniczne lub w wyniku operacji chirurgicznej

ZSO — zespół suchego oka; GvHD (*graft-versus-host disease*) — choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi

wynosiło 0,36 mg/l. W surowicy przechowywanej w standardowych dla tego preparatu warunkach (–18°C) witamina A jest stabilna przez 6 miesięcy od pobrania i zamrożenia materiału [7].

Kolejna praca Instytutu Hematologii i Transfuzjologii dotyczyła badania stężenia interleukin IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, IL-10 oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*). Analizie poddano 38 próbek surowicy pobranych od dawców autologicznych oraz 10 próbek surowicy pobranych od 7 dawców. Stężenia cytokin w 6 próbkach pochodzących od dawców allogenicznych były znacznie niższe niż w próbkach autologicznych z wyjątkiem IL-2. W trakcie badań stwierdzono bardzo wysokie wartości cytokin IL-1B (47,26 pg/ml), IL-2 (0,49 pg/ml), IL-6 (55,60 pg/ml), IL-10 (34,83 pg/ml) i VEGF (63,86 pg/ml) u jednego z dawców, co miało negatywny wpływ na efekty stosowania jego surowicy u pacjentów. Pacjenci zgłaszali poprawę stanu oczu, ale nie była ona tak zadowalająca jak w przypadku kropli przygotowanych z surowicy pozostałych dawców. Poziom cytokin u „odstającego” dawcy może świadczyć o rozpoczynającej się infekcji, niedawnym zabiegu chirurgicznym lub początkach choroby autoimmunologicznej. Podczas screeningu dawców oddających krew służącą do przygotowania sztucznych łez allogenicznych może się okazać wskazane rozszerzenie wywiadu lekarskiego oraz zakresu badań, między innymi o profil cytokinowy [8].

*Blood Services and Apheresis Institute* w Izraelu przedstawił wykorzystanie osocza świeżo mrożo-

nego jako krople do oczu stosowane u osób z zespołem suchego oka związanym z GvHD. Pacjenci byli leczeni 100% kroplami z FFP przez 3 miesiące. Krople były przygotowane z osocza uzyskanego metodą aferezy. Osocze było porcjowane z wykorzystaniem systemu COL firmy Biomed. Pacjentów proszono o uzupełnienie formularza OSDI, przeprowadzono u nich także badanie z fluoresceiną oraz przekazano kwestionariusz oceniający jakość życia po zastosowaniu kropli. Krople podawano zgodnie z grupą krwi pacjentów z wyjątkiem jednego pacjenta z grupą krwi AB, który otrzymał krople grupy krwi A. W badaniu uczestniczyło 25 osób. U jednego pacjenta wystąpiło podrażnienie gałki ocznej po 2 miesiącach leczenia, które ustąpiło po podaniu innej partii kropli. Nie zgłoszono żadnych innych reakcji niepożądanych. To prospektywne badanie II fazy wykazało, że leczenie przewlekłej GVHD kroplami z allogenicznego osocza świeżo mrożonego jest bezpieczne i skuteczne. W przypadku GVHD terapia ta ma tę zaletę, że allogeniczne FFP nie zawiera cytokin prozapalnych i czynników odpornościowych, które mogą być obecne w autologicznej surowicy lub osoczu [9].

Ze względu na rosnące zainteresowanie stosowania sztucznych łez zwiększa się liczba wykonywanych preparatów oraz ośrodków, które wdrażają nowe procedury dotyczące sztucznych łez zarówno autologicznych, jak i allogenicznych. Taka sytuacja wymaga wprowadzenia standaryzacji procedury tak, aby leczenie sztucznymi łzami jak najlepiej odpowiadało potrzebom pacjentów.

Leczenie sztucznymi łzami autologicznymi oraz allogenicznymi daje bardzo dobre rezultaty w ZSO, jak również u pacjentów z ZSO związanym z GvHD. Jednym z problemów, z jakim mierzą się ośrodki, jest brak ujednoczonych procedur, które pozwoliłyby na otrzymywanie preparatu o jak najlepszych właściwościach. Etapy wytwarzania, takie jak krzepnięcie, wirowanie czy rozcieńczanie, mogą wpływać na właściwości biochemiczne sztucznych łez. Z przeprowadzonych badań w 2005 roku przez Jaksche wynika, że surowica nierozcieńczana dawała nieco lepsze efekty od surowicy rozcieńczonej [10]. Koniecznym wydaje się stworzenie grupy roboczej, która zajęłaby się przygotowaniem wytycznych do wykonywania sztucznych łez zarówno autologicznych, jak i allogenicznych. W tabeli 1 przedstawiono dane z kongresu ISBT w Szwecji, które pokazują różnice w metodyce przygotowania sztucznych łez w różnych krajach.

Stworzenie jednolitego schematu działania podczas kwalifikacji pacjentów, doboru preparatu (surowica/PRP oraz autologiczne/allogeniczne) pozwoliłoby na wdrożenie procedury w większej liczbie ośrodków i dzięki temu łatwiejszy dostęp do leczenia. Wyżej wspomniane ośrodki wskazują na wzrost liczby pacjentów, co tylko potwierdza konieczność wypracowania jednolitych standardów i prowadzenia dalszych badań nad sztucznymi łzami.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### **Piśmiennictwo**

1. Papas EB. The global prevalence of dry eye disease: A Bayesian view. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2021; 41(6): 1254–1266, doi: 10.1111/opo.12888. indexed in Pubmed: 34545606.
2. Frändberg S, Persson I. Autologous serum eye drops, experiences drawn from implementation and production of a novel blood component at university hospital in Sweden. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 12: LD03–L03.
3. Bonstein L, Smarktin K, Benaim I, et al. Treatment satisfaction and prescription refills among ocular surface disease patients treated with autologous serum: Data from the first Israeli study of blood bank-produced serum eye drops. *Vox Sanguinis Vox Sang.* 2023; 118(S1): 209: P192.
4. Pamuk A, Katardzic Ha, Störmer M, et al. Serum Eye drop experience in manufacturing: 11 years autologous and for 6 year allogeneic. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 213: P200.
5. Hirani R, Mondy P, Gemelli C, et al. Patient reported outcomes of serum eye drops manufactured from Australian blood donations and packaged using MEISE vials. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 208: P191.
6. Janus J, Chmielewska K, Mikołowska A, et al. Experience with autologous and allogeneic serum eyedrops. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 137: P040.
7. Janus J, Chmielewska K, Mikołowska A, et al. Stability of vitamin A in allogeneic serum-based eyedrops. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 212: P198.
8. Chmielewska K, Janus J, Mikołowska A, et al. High cytokine levels in donors who donate blood for allogeneic artificial tears. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 213: P199.
9. Yahalom V, Nahum Y, Sarsur A, et al. Allogeneic fresh frozen plasma preparation for the treatment of ocular GVHD. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 211: P196.
10. Jaksche A, Sbeity Z, Domeier E, et al. Undiluted versus Diluted Autologous Serum Eye Drops (ASED): A prospective, randomized, double-blind study in patients with refractory dry eye-syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(13): 2045.

# Selected issues regarding cell therapies in light of reports presented at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023

Joanna Janus , Katarzyna Chmielewska , Jolanta Antoniewicz-Papis 

Department of Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

## Introduction

The International Society of Blood Transfusion (ISBT) is a leading society combining a global community of professionals who share the knowledge on clinical and laboratory transfusion, as well as the safety of blood and blood components for the welfare of blood donors and patients. Every two years ISBT organizes international and regional congresses. On June 17–21, the 33<sup>rd</sup> Regional Congress was hosted by Göteborg (Sweden). This congress was organized jointly with the Swedish Society for Clinical Immunology and Transfusion Medicine (KITM, Svensk Förening för Klinisk Immunologi och Transfusionsmedicin). The congress agenda included: Nordic Day (June 17), during which reports from five Scandinavian countries were presented, Academy Day (June 18), during which educational lectures covering practical aspects of the most recent topics in transfusion medicine were presented, three days (June 19–21) of sessions presenting the latest reports in the field of transfusion medicine and the related fields. This paper presents some selected issues related to cell therapies presented during the Congress.

## Cell therapies

Three lecture sessions and part of the poster session of this year's ISBT Regional Congress were devoted to cell therapies, including hematopoietic stem cell (HSC) transplantation and chimeric

antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy. One of the ISBT working parties is dedicated to cell therapies and its purpose is to increase awareness of cell therapies, to support their advancement and to improve the quality of cell therapies for the benefit of patients. The group has 4 projects underway: artificial tears (EDHO, Eye Drops of Human Origin), platelet lysates (Human Platelet Lysate — Current Standards and Future Developments workshop), cell therapies with unproven effectiveness (Unproven Cellular Therapies) and a sub-group dealing with the development of guidelines for stem cell processing based on GMP (Guide to set up a GMP facility for Stem Cell Processing). One of the great advantages of the stationary Congress was the possibility of networking with practitioners dealing with cell therapies on daily basis, who also operate within the aforementioned working group. On Academic Day, the ISBT Young Professionals Council (YPC) hosted a Young Professionals networking breakfast during which groups divided by fields of interest discussed various aspects of their scientific activity with experts and other young professionals. As many as two of the six groups were focused on the topic of cell therapies and shared their experience under the supervision of Denese Marks and Katharina Schallmoser who acted as experts. The first day of the main scientific program was opened by Meet the Experts sessions — Cellular Therapies led by Reinhard Henschler and Mickey Koh. The topics discussed included, among others, the current state and advances in

**Correspondence address:** mgr Joanna Janus, Department of Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, Polska, tel: +48 22 34 96 388, e-mail: [jjanus@ihit.waw.pl](mailto:jjanus@ihit.waw.pl)

Received: 31.08.2023

Accepted: 14.09.2023

Early publication date: 27.09.2023

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

cell therapy and new cell therapy products based on various blood components. Many of the papers presented at the Congress, mentioned the COVID-19 pandemic in reference to the difficulties in performing blood collection, transplantation or donor recruitment procedures.

Abstracts on cell therapies submitted to the Congress were divided into 4 groups: 1) stem cell and tissue banking, including umbilical cord blood, 2) collection, processing, storage and issue, 3) clinical applications, 4) tissue compatibility in stem cell transplantation.

Due to the large number of reports both in the lecture and poster sessions, this paper focuses only on the most interesting works devoted to hematopoietic stem cell transplantation, CAR-T, modern cell therapies and hematopoietic cell donors.

### Lecture sessions

One of the sessions organized by ISBT in cooperation with the AABB (Association for the Advancement of Blood & Biotherapies) concerned the harmonization of apheresis material for use in cell therapies.

Schwartz (Tampa, USA) drew attention to the differences in the requirements for cell harvesting for the purpose of obtaining lymphocytes for CAR-T therapy. More and more clinical trials are conducted worldwide to test the effectiveness of CAR. There are also newly registered CAR-T drugs for various indications (in the USA there are currently 6 products approved by the FDA). One of the key elements related to CAR-T is the effective collection of lymphocytes as well as the problem of no well-defined apheresis criteria [1]. Schwartz presented the results of a study initiated, among others, by the American Society for Apheresis — the analysis included 621 clinical trials using CAR-T therapy. The aim of the analysis was to collect and evaluate the variability of descriptions referring to collection of material by apheresis. Apheresis as such was mentioned in only 51.9% of study reports. There are also discrepancies in the guidelines regarding the procedure of apheresis — some sponsors/manufacturers require apheresis to be based on a specific duration of the procedure (apheresis), total blood volume (TBV), leukocyte (WBC) count or CD3+ lymphocyte count. The laboratory parameters mentioned in the descriptions and checked in the collected preparation included WBC (100 tests), absolute neutrophil count (220 tests), absolute lymphocyte count (102 tests), CD3+ cells (38 tests), hemoglobin (233 tests)

and platelets (269 tests). Laboratory parameters useful for apheresis cell collection described in the analysed studies vary and are inconsistent with current practices [2]. Each company responsible for a given Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) or CAR-T medicinal product has its own quality control criteria. Only a small percentage of centres determine CD3+ cell yield in the final product and this parameter seems to be crucial for product quality. Schwartz pointed to the need of studying the expression of the CD3 surface antigen as the best indicator of the quality of the material collected for CAR-T.

During Schwartz's lecture, a discussion ensued on logistical problems of centres which collect cells for CAR-T therapy, the differences in cell cryopreservation methods and quality tests as well as the multitude of audits, and also protocols/procedures for each ATMP/CAR-T medicinal product. Moreover, preparations that serve as material for CAR-T are marked with various ISBT128 codes. All these aspects complicate the work of the manufacturing centres and cell banks involved in the procedure and may contribute to higher risk of error. It seems necessary therefore to develop a uniform standard for collecting material for CAR-T production in order to facilitate the work of the collecting and/or processing staff as well as to minimize the risk of error and to limit the scope of documentation related to a given ATMP/medicinal product.

It was interesting to listen to Schafer's (Freiburg, Germany) lecture on the collection of material from allogeneic donors. Currently, lymphocytes/mononuclear cells as the starting material for the production of CAR-T, are obtained mainly from autologous donors — patients suffering from haematological and oncological malignancies. Such procedure of collecting the material from the patient has however numerous drawbacks and is work-intensive and costly. Therefore new methods of producing CAR-T from allogeneic donors are being developed. Precise genome editing may lead to the production of allogeneic immune cell therapies. During Schafer's presentation, the impact of the patient's and donor's health status and individual characteristics on the quality of product were discussed, as well as the practical issues related to donor management (intervals between donations, deferrals or donor identification and eligibility). Additionally, some aspects of material collection techniques for bone marrow-derived cell therapies were discussed as well as the need for cryopreservation and its impact on the quality of



the material [3]. Two studies by Mauer et al. were also presented during this session. They described a lower incidence of GvHD (graft-versus-host disease) after transplantation of cryopreserved allogeneic HSCs from an unrelated donor. The study also demonstrated an insignificant effect of cryopreservation on the quality of HSCs and the final effect of transplantation. The study was performed after the implementation of guidelines on obligatory cryopreservation of allogeneic graft material as consequence of the COVID-19 pandemic [4, 5].

During the other sessions devoted to cell therapies, reports on new therapies were presented. Since the discovery of CAR, which is one of the greatest achievements of the last decade, still ongoing is the search for new methods of CAR therapy in hematological, oncological and other diseases. There is a lot of talk about CAR-NK, which makes use of natural killer (NK) cells instead of T cells. Since NK cell-based immunotherapy requires a relatively large number of cells, which is not so easily done, attempts have been made to develop new methods of obtaining the material. Moazzeni et al. (Tehran, Iran) suggested isolating NK cells from leukoreduction filters (LRF) to recover CAR-NK cells directed against the B-cell maturation antigen (BCMA) used in multiple myeloma patients. The cells retained in the filters are usually disposed of together with the filter. In their study, leukocytes were isolated from the LRF using a special wash and NK cells were purified using the MACS column separation kit. After isolation, the proliferative capacity and cytotoxic effect of the obtained NK cells as well as the presence of surface antigens were assessed. NK cells were then modified by lentiviral transduction with vectors comprising the second-generation anti-BCMA CAR construct. The rate of transduction and the anti-BCMA construct expression on transduced NK cells were assessed using appropriate antibodies. The expression of CD107a, CD16, CD56, IFN- $\gamma$  and granzyme B was performed by flow cytometry and PCR. The isolation yield was  $85 \times 10^6 \pm 5.7$  cells/filter, which is a satisfactory result. The isolated cells were of good quality with highly preserved NK cell proliferation and cytotoxic capacity [6].

Fernandez-Rodriguez (Oviedo, Spain) presented the results of the Phase II clinical trial EudraCT 2008-003015-12, which focused on the treatment of pressure ulcers/sores with the ATMP product containing mononuclear cells (MNC). Bedsores are defined as local damage to the skin and subcutaneous tissue that occurs as a result of intense and

prolonged pressure and/or friction. Because of high infection risk, these wounds are a significant cause of mortality among immobile people. The typical method of treatment is surgery but it is burdened with the risk of failure or recurrence. The clinical trial was designed to evaluate the safety and efficacy of cell therapy in 92 patients with stage III/IV bedsores. Autologous bone marrow was collected from patients for obtaining ATMP and diluted 1:1 in saline with 100 UI/ml heparin and MNCs were isolated using Ficoll. At least  $50 \times 10^6$  MNCs were thus obtained, which were then resuspended in heparinized saline and subjected to filtration. The material (volume of 10–12 ml) was applied to the sutured wound, which had been cleaned of necrotic tissue. The average number of MNC cells in the product was  $104.42 \times 10^6$ . Significant differences were observed between the control group (surgical treatment only) and the study group (ATMP) in the percentage of wound dehiscence at 6 months and 1 year after surgery. The comparison was in favour of conventional treatment and the mean hospital stay was in favour of ATMP. Mononuclear cell treatment minimizes the length of hospital stay, which is cost savings, but long-term results still show conventional treatment to be more effective [7].

Khan (Birmingham/Oxford, UK) presented the outcome of his study during which he created a model of a bone marrow organoid that faithfully mimics human tissue. Such models are used to study normal and pathological haematopoiesis in vitro in the bone marrow microenvironment. The model of the marrow organoid was derived from human induced pluripotent stem cells. The resulting cytokine-exposed cell cultures contained inter alia stromal cells, myeloid cells and their progenitors cells. Cells grown in this way included megakaryocytes, erythroid cells, monocytes and granulocyte progenitors. The resulting stroma comprised a branched, three-dimensional network of endothelial cells supported by fibroblasts and mesenchymal-stromal cells. The model not only allowed to test the impact of inflammatory stimuli on the medullary cavity, but also to implement cells from healthy donors and patients with hematologic malignancies (including multiple myeloma, myelofibrosis and acute lymphoblastic leukaemia) in order to create an ex vivo system for the study of haematopoiesis [8].

## Poster session

During the congress, the discussions covered many topics related to blood donor recruitment,

eligibility and safety as well as quality of haematopoietic cells. One of the posters presented the results of follow-up of 56 peripheral blood stem cell (PBSC) and bone marrow (BM) donors (23 women and 17 men; median age 36 years (22–52)). Prior to collection, PBSC donors were mobilized with G-CSF at a dose of 12 µg/kg/day; in 86% it was a 5-day mobilization. The most commonly reported symptoms associated with the donation were: systemic and local myalgia, nausea, and pain at the puncture site. Poor exercise capacity and weakness were also observed (more common in BM than PBSC donors). One month after donation, 14% of BM donors and 13% of PBSC donors still complained of moderate pain. 95% of PBSC donors reported no symptoms after 1–5 days of recovery. In the group of bone marrow donors, it was 6–15 days [9].

The Korean Red Cross Blood Service (KRCBS) team presented the results of a 4-year analysis of hematopoietic cell donor recruitment. Since the establishment of Korean stem cell donor registry in 1994, a total of 420,217 potential stem cell donors have been registered 37.8% of which were donors registered with KRCBS. In 2022, 50.9% of qualified donors came from the KRCBS registry. KRCBS focuses on the so-called individual recruitment conducted by qualified nursing staff in blood donation centres. This program is targeted at repeat blood donors — 99.9% of registered potential stem cell donors were also blood donors. The study includes an analysis of the effectiveness of the individual recruitment program as compared to group recruitment and a comparison of KRCBS results with that of other organizations recruiting donors in the years 2019–2022. During the pandemic, organizations relying on group recruitment demonstrated lower effectiveness, which is why KRCBS played a significant role in recruiting new potential stem cell donors when group recruitment was limited due to the COVID-19 pandemic [10].

Useini et al. (Skopje, North Macedonia) presented their experience in collecting PBSC by apheresis from both patients and healthy donors. Patients and donors were mobilized with G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor). The minimum target of apheresis was to collect  $2 \times 10^6$ /kg CD34+ cells or  $2 \times 10^8$ /kg MNCs. PBSC separation was carried out using Baxter CS3000, COBE Spectra and Spectra Optia cell separators with ACD-A anticoagulant. The TBV processed during apheresis was within the range of 2.0–2.5. Between 2000 and 2022, their centre performed 977 PBSC (Peripheral Blood Stem Cell) apheresis

procedures, of which 81% were for autologous patients and 19% for healthy donors, including 5 unrelated donors. A single apheresis procedure lasted from 180 to 270 minutes, and the volume of preparations ranged from 50 to 400 ml. The most common indications for autologous transplantation were multiple myeloma (51.1%), acute myeloid leukaemia (18.5%), non-Hodgkin's lymphoma (13.6%), and Hodgkin's lymphoma (13.4%) while the indications for allogeneic transplantation were mainly: acute myeloid leukaemia (55.8%), acute lymphoblastic leukaemia (14.2%), chronic myelogenous leukaemia (7.5%), severe aplastic anaemia (5.8%), myeloproliferative diseases (5%) [11].

The routinely applied method of maintaining cell viability for an extended period is the aforementioned method of stem cell cryopreservation. For this purpose, a cryoprotective mixture is added to the cells to protect them from extracellular and intracellular crystal formation. This mixture typically contains a 5–10% concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO) as cryoprotectant, along with plasma, albumin, or hydroxyethyl starch (HES), depending on the protocol used in that particular centre. Due to either temporary market shortages of certain reagents or following changes in guidelines, centres are focused on developing new methods of cryopreservation. Pursuant to suspension of HES production by EU countries, Jacobsen et al. (Trondheim, Norway) decided to validate the cryopreservation process at freezing conditions different from the previously used. The aim of the validation procedure was to establish freezing curves for the cryopreservation method with 5% DMSO with no HES in a –80°C freezer, and to compare the results for cell viability in frozen samples with HES. Prior to thawing and analysis the material and samples were stored in liquid nitrogen vapor for a week. After thawing, the cell viability in the stem cell preparations and the collected samples was examined. The cell viability averaged 99.9% and 98.5% in the products and samples frozen with 5% DMSO and HES respectively and 99.7% and 98.8% when they were frozen using 5% DMSO. The obtained results confirm that both freezing methods yield similar and high cell viability [12].

The toxic effects of DMSO and the numerous side effects observed in patients after transplantation of cryopreserved stem cells encourage cell banks to improve their preparation procedures. This includes testing various modifications of the qualitative and quantitative composition of cryoprotective mixtures, as well as the solution used for DMSO rinsing after thawing. In their

study, the Al-Mozain team (Riyadh, Saudi Arabia) attempted to assess the impact of reduced DMSO concentration (from 10% to 5%) in the cryoprotective mixture on cell viability. The study was performed on 10 random preparations of PBSC (Peripheral Blood Stem Cells) and bone marrow. Each donation was subjected to cryopreservation in two variants: using 5% and 10% DMSO concentrations. The qualitative parameters assessed in the products before cryopreservation and at 2, 4, and 8 weeks after thawing were: WBC count, total number of CD34+ cells, and cell viability. The results at 2, 4, and 8 weeks after cryopreservation clearly indicated that in preparations with lower DMSO concentrations, cell viability was higher. The validation results encouraged the centre to consider the 5% DMSO method as the new standard for cryopreservation of paediatric stem cell preparations; the potential adverse effects of large amounts of dimethyl sulfoxide can be particularly serious in paediatric patients [13].

The administration of thawed stem cell preparations with DMSO as a cryoprotectant is recommended within 10–15 minutes of thawing because at room temperature, dimethyl sulfoxide may adversely affect the cells. For this reason, many centres remove DMSO before administering stem cells to the patient. Some of the methods of DMSO removal include rinsing with human serum albumin (HSA) and dextran or albumin and HES. In their study, Larrea et al. (Valencia, Spain), described only HSA used for rinsing stem cells because of the aforementioned market shortages of HES and dextran. The study included 26 stem cell preparations destined for disposal. All of them met the criteria of final cell concentration of  $< 3 \times 10^8$  cells/ml as well as cryopreservation with 10% DMSO within 24 hours of collection under controlled freezing conditions. The containers were thawed in a water bath at 37°C. After thawing, a rinsing solution containing HES-HSA (control group) or HSA solution (experimental group) was added to the stem cells. In each final product, the total nucleated cell (TNC) count, viability, and clonogenicity were assessed immediately after rinsing and 60 minutes later. No significant differences in the quality parameters of the tested preparations were observed between the groups, thus the HSA solution was deemed equivalent to the HSA-HES mixture [14].

### Summary

Numerous reports presented during the 33<sup>rd</sup> ISBT Regional Congress demonstrate the dynamic

changes in the field of cell therapies and show how much still requires investigation. Every year brings a growing number of reports on the improvement or development of new life-saving cell therapies. Centres involved in the collection and processing of material must be prepared for dynamic changes related to evolving standards, material and reagent shortages, as well as necessity to ensure adequate quality and safety measures. Standardization is also required in the area of guidelines related to lymphocyte collection for CAR-T therapy, which is still a significant challenge for laboratory, nursing, and medical staff. A critical aspect of allogeneic material collection is the donor himself who needs to be well-guided throughout the entire process, from recruitment to post-donation.

**Conflict of interest:** none declared

### References

- Schwartz J. Growing variations in cell collections requirements. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 95, PA27–L02.
- Thibodeaux S, Aqui N, Park Y, et al. Lack of defined apheresis collection criteria in publicly available CAR T cell clinical trial descriptions: Comprehensive review of over 600 studies. *J Clin Apher.* 2022; 37(3): 223–236, doi: 10.1002/jca.21964, indexed in Pubmed: 35085413.
- Schafer R. Managing PBMC donors during increasing demand for cell therapeutics. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 95, PA27–L01.
- Maurer K, Kim HT, Garrity HM, et al. Lower incidence of chronic GVHD observed after transplantation with cryopreserved unrelated allogeneic stem cells. *Blood Adv.* 2023; 7(11): 2431–2435, doi: 10.1182/bloodadvances.2022009231, indexed in Pubmed: 36595453.
- Maurer K, Kim HT, Kuczmarowski TM, et al. Impact of cryopreservation and transit times of allogeneic grafts on hematopoietic and immune reconstitution. *Blood Adv.* 2021; 5(23): 5140–5149, doi: 10.1182/bloodadvances.2021005139, indexed in Pubmed: 34581754.
- Moazzeni A, Kheirandish M, Khamisipour G, et al. Leukoreduction filters (LRFs) as a novel source of CAR-NK cell based immunotherapy. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 46, PA09–L02.
- Perez-Lopez S, Alvarez-Viejo M, Perez-Basterrechea M, et al. Pressure ulcer treatment with autologous bone-marrow mononuclear stem cells. EudraCT 2008-003015-12 results. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 110, A32–L03.
- Khan A, Rodriguez-Romera A, Reyat J, et al. Bone marrow organoids. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 47, PA09–L04.
- Rangel M, Pinho C, Bordalo F, et al. Real World Evidence (RWE) to assess effectiveness and safety of donors during and after cell and bone marrow collection. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 368, P532.
- Kim N, Park S, Kwon S, et al. Unrelated hematopoietic stem cell donor recruitment of the Korean Red Cross Blood Services (2019-2022): The effect of repeat blood donor targeted recruitment. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 365, P526.
- Useini S, et al. Grubovic Rastvorceva R, Stojanoski Z. Overview of apheresis collection of peripheral blood stem cells in hema-

- tologic patients and healthy donors. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 365, 528.
12. Jacobsen B, Teigum I, Gravås M. Validation of cryopreservation method for autologous hematopoietic stem cells without hydroxyethyl starch. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 366, P529.
  13. Al-Mozain N, Al-Alem S, Al-Madhi S. Reducing the DMSO concentration in the cryopreservation mixture from 10% to 5% improves cell viability, results of a validation study. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 369, P537.
  14. Larrea L, Vaya M, Vera B. An alternative washing solution for the thawing of cryopreserved hematopoietic stem cells. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 367, P530.



# Wybrane zagadnienia dotyczące terapii komórkowych w świetle doniesień prezentowanych na 33. Regionalnym Kongresie *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* w Göteborgu, 17–21 czerwca 2023 roku

Joanna Janus , Katarzyna Chmielewska , Jolanta Antoniewicz-Papis 

Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

## Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Janus J, Chmielewska K, Antoniewicz-Papis J. Selected issues regarding cell therapies in light of reports presented at the 33<sup>rd</sup> Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in Gothenburg, June 17–21, 2023. *J Transf Med* 2023; 16 (3): 154–159. DOI: 10.5603/jtm.97617. Należy cytować wersję pierwotną.

## Wstęp

Międzynarodowe Towarzystwo Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*) jest wiodącym towarzystwem łączącym w sobie zagadnienia transfuzjologii klinicznej, laboratoryjnej czy bezpieczeństwa krwi i jej składników. Co 2 lata ISBT organizuje międzynarodowe i regionalne kongresy. W tym roku w dniach 17–21 czerwca gospodarzem 33. Regionalnego Kongresu był Göteborg (Szwecja). Kongres ten przygotowano wspólnie ze Szwedzkim Towarzystwem Immunologii Klinicznej i Medycyny Transfuzjologicznej (KITM, *Svensk Förening för Klinisk Immunologi och Transfusionsmedicin*). Kongres obejmował: *Nordic Day* (17 czerwca), podczas którego były prezentowane doniesienia z pięciu krajów skandynawskich, *Academy Day* (18 czerwca), w ramach którego były prezentowane wykłady edukacyjne obejmujące praktyczne aspekty dotyczące najbardziej aktualnych tematów w transfuzjologii oraz 3 dni (19–21 czerwca) sesji prezentujących najnowsze doniesienia z zakresu transfuzjologii oraz dziedzin pokrewnych. Niniejsza praca dotyczy wybranych zagadnień związanych

z terapiami komórkowymi przedstawionymi podczas Kongresu.

## Terapie komórkowe

Trzy sesje wykładowe oraz część sesji plakatowej tegorocznego Regionalnego Kongresu ISBT zostały poświęcone terapiom komórkowym, w tym przeszczepianiu komórek krwiotwórczych (KK) oraz terapii CAR-T (*chimeric antigen receptor T-cell*). W ramach ISBT działa grupa robocza ds. terapii komórkowych, której celem jest podnoszenie świadomości na temat terapii komórkowych, wspieranie ich rozwoju oraz podnoszenie jakości w zakresie wykorzystania komórek do leczenia pacjentów. Grupa ma aktualnie rozpoczęte 4 projekty dotyczące: sztucznych łez (EDHO, *Eye Drops of Human Origin*), lizatów płytkowych (*Human Platelet Lysate – Current Standards and Future Developments workshop*), terapii komórkowych o nieudowodnionej skuteczności (*Unproven Cellular Therapies*) oraz podgrupę zajmującą się utworzeniem wytycznych dotyczących przetwarzania komórek macierzystych w ośrodkach stosujących GMP (*Guide to set up a GMP facility for Stem Cell Processing*). Jedną z ogromnych zalet stacjonarnego

**Adres do korespondencji:** mgr Joanna Janus, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel. +48 22 34 96 388, e-mail: [jjanus@ihit.waw.pl](mailto:jjanus@ihit.waw.pl)

Nadesłano: 31.08.2023

Przyjęto do druku: 14.09.2023

Data pierwszej publikacji: 27.09.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

Kongresu była możliwość networkingu z praktykami zajmującymi się na co dzień terapiami komórkowymi, którzy również działają w ramach wspomnianej grupy roboczej. Podczas *Academic Day* Rada Młodych Profesjonalistów ISBT (*The ISBT Young Professionals Council, YPC*) zorganizowała wydarzenie *Young Professionals networking breakfast*, podczas którego grupy podzielone według dziedziny dyskutowały o różnych aspektach swojej pracy z ekspertami z danej dyscypliny oraz innymi młodymi profesjonalistami. Aż dwie z sześciu grup zajmowały się tematem szeroko pojętych terapii komórkowych pod opieką ekspertek Denese Marks oraz Kathariny Schallmoser. Pierwszy dzień głównego programu naukowego otworzyła sesja *Meet the Experts sessions — Cellular Therapies* prowadzona przez Reinharda Henschlera i Mickey Koha. Poruszane tematy obejmowały między innymi aktualny stan i postępy w terapii komórkowej oraz nowe produkty terapii komórkowej powstające na bazie różnych preparatów krwi. W wielu pracach na Kongresie wspomniana była pandemia COVID-19 w nawiązaniu do utrudnień w wykonywaniu procedur pobierania, przeszczepienia czy rekrutacji dawców.

Zgłaszane na Kongres abstrakty z zakresu terapii komórkowych były podzielone na 4 grupy: 1) bankowanie komórek macierzystych i tkanek, w tym krwi pępowinowej, 2) pobieranie, przetwarzanie, przechowywanie i zwalnianie, 3) zastosowania kliniczne, 4) zgodność tkankowa w przeszczepianiu komórek macierzystych.

Ze względu na dużą liczbę doniesień zarówno w sesjach wykładowych, jak i plakatowej, w niniejszej pracy skupiono się tylko na najciekawszych pracach dotyczących przeszczepiania krwiotwórczych komórek macierzystych, CAR-T, nowoczesnych terapii komórkowych oraz dawców komórek krwiotwórczych.

## Sesje wykładowe

Jedną z sesji organizowaną przez ISBT we współpracy z *Association for the Advancement of Blood & Biotherapies (AABB)* dotyczyła harmonizacji materiału z aferezy do wykorzystania w terapiach komórkowych.

Schwartz (Tampa, Stany Zjednoczone) zwrócił uwagę na różnice w wymaganiach dotyczących pobierania komórek w celu uzyskania limfocytów do terapii CAR-T. Na świecie jest prowadzonych coraz więcej badań klinicznych sprawdzających skuteczność CAR. Pojawiają się także nowe zarejestrowane leki CAR-T w różnych wskazaniach (w Stanach

Zjednoczonych obecnie jest to już 6 preparatów zatwierdzonych przez Agencję Żywności i Leków [FDA, Food and Drug Administration]). Jednym z kluczowych elementów związanych z wytworzeniem CAR-T jest przeprowadzenie efektywnego pobrania limfocytów oraz problem związany z brakiem dobrze zdefiniowanego kryterium aferezy [1]. Schwartz przedstawił wyniki badania zainicjowanego między innymi przez *American Society for Apheresis* — analiza obejmowała 621 badań klinicznych wykorzystujących terapię komórkami CAR-T, której celem było zebranie i ocena zmienności opisów pobierania materiału metodą aferezy. O samej aferezie wspomniano jedynie w 51,9% opisach badań. Obserwuje się także rozbieżności w wytycznych dotyczących samej aferezy — niektórzy sponsorzy/producenci wymagają przeprowadzenia aferezy na podstawie określonego czasu trwania aferezy, całkowitej objętości krwi (TBV, *total blood volume*), oznaczenia leukocytów (WBC) czy oznaczenia limfocytów CD3+. Wymienione w opisach parametry laboratoryjne sprawdzane w pobranym preparacie obejmowały WBC (100 badań), bezwzględną liczbę neutrofilii (220 badań), bezwzględną liczbę limfocytów (102 badania), komórki CD3+ (38 badań), hemoglobinę (233 badania) i płytki krwi (269 badań). Parametry laboratoryjne przydatne do pobierania komórek metodą aferezy opisywane w analizowanych badaniach są zmienne i niespójne z obecnymi praktykami [2]. Każda firma odpowiedzialna za dany Produkt Lecznicy Terapii Zaawansowanej (ATMP, *Advanced Therapy Medicinal Product*) lub produkt leczniczy CAR-T wypracowuje własne kryteria odnośnie kontroli jakości materiału. Jedynie niewielki procent ośrodków oznacza w materiale końcowym komórki CD3+, które to badanie okazuje się kluczowym parametrem jakościowym preparatu. Schwartz wskazywał na konieczność badania ekspresji antygenu powierzchniowego CD3 jako najlepszego wskaźnika jakości materiału pobranego do CAR-T.

Podczas wykładu Schwartza wywiązała się także dyskusja dotycząca problemów logistycznych ośrodków pobierających komórki do terapii CAR-T, różnic w metodach krioprezerwacji komórek, badań jakościowych preparatów, a także mnogości audytów, tworzenia wielu procedur — osobnych dla każdego ATMP/produktu leczniczego CAR-T. Preparaty będące materiałem do produkcji CAR-T są oznaczane także różnymi kodami ISBT128. Wszystkie te aspekty utrudniają pracę ośrodkom pobierającym oraz zaangażowanym w procedurę bankom komórek i mogą stwarzać ryzyko błędów. Konieczne okazuje się wypracowanie jednolitego

standardu pobierania materiału do wytworzenia CAR-T, aby ułatwić pracę personelowi pobierającemu i/lub przetwarzającemu materiał, a także zminimalizować ryzyko popełnienia błędu oraz zredukować ilość tworzonej dokumentacji związanej z danym ATMP/produktem leczniczym.

Interesujący był wykład Schafera (Freiburg, Niemcy) dotyczący pobierania materiału od dawców allogenicznych. Obecnie wyjściowy materiał do produkcji CAR-T stanowią limfocyty/komórki jednojądrzaste jest uzyskiwany głównie od dawców autologicznych — pacjentów cierpiących na nowotwory hematologiczne. Jednak procedura pobrania materiału od pacjenta jest narażona na liczne niepowodzenia, ponadto jest pracochłonna i kosztochłonna. Dlatego są opracowywane nowe metody wytwarzania CAR-T od dawców allogenicznych. Precyzyjna edycja genomu może pozwolić na opracowanie koncepcji produkcji allogenicznych immunologicznych terapii komórkowych. Podczas prezentacji omówiono potencjalne znaczenie stanu zdrowia i osobniczych cech pacjentów i dawców na jakość preparatów, a także praktyczne kwestie zarządzania dawcami, w tym odstępy między pobraniami, dyskwalifikacje czy identyfikację i kwalifikację dawcy. Ponadto w nawiązaniu do pracy Schwartza zostały omówione aspekty technik pobierania materiału dla terapii komórkowych wytwarzanych ze szpiku. Poruszona została także potrzeba krioprezervacji i jej wpływ na jakość materiału [3]. Podczas tej sesji zostały zaprezentowane również dwa badania Mauer i wsp. opisujące mniejszą częstość występowania przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD, *graft-versus-host disease*) po transplantacji kriokonserwowanych allogenicznych KK od dawcy niespokrewnionego. W badaniu opisano także niewielki wpływ krioprezervacji na jakość KK i finalny efekt transplantacji. Badanie zostało przeprowadzone po wprowadzeniu wytycznych dotyczących obowiązkowej krioprezervacji allogenicznego materiału przeszczepowego w związku z pandemią COVID-19 [4, 5].

Podczas pozostałych sesji dotyczących terapii komórkowych zostały przedstawione doniesienia dotyczące nowych terapii. Od czasu wynalezienia CAR, które są jednym z największych osiągnięć ostatniej dekady w medycynie, wciąż są poszukiwane nowe metody opracowania CAR w leczeniu chorób hematologicznych i nie tylko. Coraz więcej mówi się o CAR-NK, które zamiast limfocytów T wykorzystują komórki NK (*ang. natural killers*). Ponieważ immunoterapia oparta na komórkach NK wymaga stosunkowo dużej liczby komórek, co nie jest łatwo osiągalne, podjęto próby opracowania

nowych metod pozyskiwania materiału. Moazzeni i wsp. (Teheran, Iran) w swojej pracy zaproponowali izolację komórek NK z filtrów do usuwania leukocytów (LRF, *leukoreduction filters*) w celu odzyskania komórek CAR-NK skierowanych przeciwko antygenowi dojrzewania komórek B (BCMA, *B-cell maturation antigen*), wykorzystywanych u pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Zatrzymane w filtrach komórki zwykle są utylizowane wraz z filtrem. W badaniu leukocyty wyizolowano z LRF przy użyciu specjalnego płukania, a komórki NK oczyszczono przy użyciu zestawu do separacji kolumnowej MACS. Po izolacji została oceniona zdolność proliferacyjna i efekt cytotoksyczny otrzymanych komórek NK oraz obecność antygenów powierzchniowych. Komórki NK zostały następnie transdukowane wektorami lentiwirusowymi zawierającymi konstrukt CAR anty-BCMA drugiej generacji. Oceniono szybkość transdukcji i ekspresję konstrukt anty-BCMA na transdukowanych komórkach NK przy użyciu odpowiednich przeciwciał. Badania ekspresji CD107a CD16, CD56, IFN- $\gamma$  i granzymu B wykonano metodami cytometrii przepływowej i metodą PCR. W wyniku izolacji uzyskano  $85 \times 10^6 \pm 5,7$  komórek/filtr, co jest satysfakcjonującym wynikiem. Wyizolowane komórki były dobrej jakości z wysoce zachowaną proliferacją i zdolnością cytotoksyczną komórek NK [6].

Fernandez-Rodriguez (Owiedo, Hiszpania) przedstawiła wyniki badania klinicznego II fazy EudraCT 2008-003015-12, które dotyczyło leczenia odleżyn za pomocą produktu ATMP zawierającego komórki jednojądrzaste (MNC, *mononuclear cells*). Odleżyna definiuje się jako miejscowe uszkodzenie skóry i tkanki podskórnej, które pojawia się w wyniku intensywnego i długotrwałego ucisku i/lub tarcia. Z uwagi na wysokie ryzyko infekcji rany te stanowią istotne źródło śmiertelności wśród osób unieruchomionych. Tradycyjnie metoda leczenia opiera się na zabiegu chirurgicznym, który jest opatrzony ryzykiem niepowodzenia lub nawrotu. Badanie kliniczne miało na celu ocenę bezpieczeństwa i skuteczności terapii komórkowej u 92 pacjentów z odleżynami III/IV stopnia. W celu uzyskania produktu ATMP od pacjentów pobrano autologiczny szpik, który następnie rozcieńczono w stosunku 1: 1 w soli fizjologicznej z heparyną 100 UI/ml i wyizolowano MNC z wykorzystaniem Ficollu. W ten sposób uzyskano co najmniej  $50 \times 10^6$  MNC, które ponownie zawieszano w heparynizowanej soli fizjologicznej, a następnie przefiltrowano. Tak przygotowany preparat (w objętości 10–12 ml) nanoszono na zamkniętą szwem oczysz-



czoną z tkanki martwiczej ranę. Średnia liczba komórek MNC w preparacie wynosiła  $104,42 \times 10^6$ . Zaobserwowano istotne różnice między grupą kontrolną (leczenie wyłącznie chirurgiczne) i grupą badaną (ATMP) w odsetku rozejścia się rany po 6 miesiącach i roku po operacji na korzyść konwencjonalnego leczenia oraz średniego czasu hospitalizacji na korzyść ATMP. Leczenie z wykorzystaniem komórek jednojądrzastych minimalizuje długość hospitalizacji, co skutkuje zmniejszeniem kosztów, lecz wyniki długoterminowej obserwacji wciąż wskazują konwencjonalne leczenie jako bardziej efektywne [7].

Khan (Birmingham/Oxford, Wielka Brytania) przedstawił prowadzone przez jego zespół badania nad wytworzeniem modelu organoidu szpiku, który wiernie odzwierciedla ludzką tkankę. Modele te są wykorzystywane do badań prawidłowej i patologicznej hematopoezy *in vitro* w mikrośrodowisku szpiku. Stworzony przez zespół model organoidu szpiku pochodził z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Uzyskane hodowle komórek poddawane ekspozycji na cytokiny zawierały między innymi komórki zrębu, komórki mieloidalne i ich progenitory. Wyhodowane tym sposobem komórki obejmowały megakariocyty, komórki erytroidalne, monocyty i progenitory granulocytów. Wytworzony zrąb obejmował rozgałęzioną, trójwymiarową sieć komórek śródbłonna wspieraną przez fibroblasty i komórki mezenchymalno-zrębowe. Powstały model oprócz możliwości testowania wpływu bodźców zapalnych na jamę szpikową umożliwia również wszczepianie komórek od zdrowych dawców i pacjentów z nowotworami krwi (w tym szpiczakiem mnogim, zwłóknieniem szpiku i ostrą białaczką limfoblastyczną), umożliwiając powstanie systemu *ex vivo* do badania hematopoezy [8].

### Sesja plakatowa

Podczas kongresu poruszano wiele tematów z zakresu kwalifikacji, rekrutacji oraz bezpieczeństwa dawcy krwi oraz komórek krwiotwórczych. Jeden z plakatów przedstawiał wyniki obserwacji 56 dawców komórek macierzystych z krwi obwodowej (PBSC, *peripheral blood stem cell*) i szpiku (BM, *bone marrow*) (23 kobiety i 17 mężczyzn z medianą wieku 36 lat (22–52)). Dawcy PBSC przed pobraniem byli poddawali mobilizacji czynnika stymulującego kolonie granulocytów (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*) w dawce  $12 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ , w 86% była to mobilizacja 5-dniowa. Najczęściej zgłaszanymi objawami związanymi

z pobraniem były: ogólnoustrojowy i miejscowy ból mięśni, nudności, ból w miejscu wkłucia. U dawców zaobserwowano również słabą wydolność fizyczną i osłabienie (częściej u dawców BM niż PBSC). Po 1 miesiącu od pobrania 14% dawców BM i 13% dawców PBSC nadal skarżyło się na umiarkowany ból. Dziewięćdziesiąt pięć procent dawców PBSC już po 1–5 dniach rekonwalescencji nie zgłaszało żadnych objawów. W grupie dawców szpiku okres ten wynosił 6–15 dni [9].

Praca zespołu z Koreańskiego Czerwonego Krzyża (KRCBS) przedstawiła wyniki 4-letniej analizy rekrutacji dawców komórek krwiotwórczych. W koreańskim rejestrze dawców od początku jego istnienia, tj. 1994 roku, zarejestrowano 42 0217 potencjalnych dawców KK, spośród których 37,8% byli to dawcy zarejestrowani w KRCBS. W 2022 roku 50,9% dawców faktycznych pochodziło z rejestru KRCBS. Rejestr ten skupia się na tak zwanej rekrutacji indywidualnej prowadzonej przez wykwalifikowany personel pielęgniarski w ośrodkach krwiodawstwa. Program ten skierowany jest do wielokrotnych dawców krwi — 99,9% zarejestrowanych potencjalnych dawców KK było jednocześnie dawcami krwi. W pracy zawarto analizę skuteczności programu rekrutacji indywidualnej w porównaniu z rekrutacją grupową oraz porównanie wyników KRCBS z innymi organizacjami rekrutującymi dawców w latach 2019–2022. W czasie pandemii organizacje polegające na grupowych rekrutacjach wykazywały mniejszą skuteczność, przez co KRCBS odegrało istotną rolę w rekrutacji nowych potencjalnych dawców KK, gdy rekrutacja grupowa była ograniczona z powodu pandemii COVID-19 [10].

Useini i wsp. (Skopje, Macedonia Północna) w swojej pracy przedstawili doświadczenia ośrodka w pobieraniu PBSC metodą aferezy u pacjentów i zdrowych dawców. Pacjenci i dawcy byli mobilizowani czynnikiem G-CSF. Minimalnym celem aferezy było pobranie  $2 \times 10^6/\text{kg}$  komórek CD34+ cells lub  $2 \times 10^8/\text{kg}$  MNC. Separacja PBSC odbywała się za pomocą separatorów komórkowych Baxter CS3000, COBE Spectra oraz Spectra Optia z antykoagulantem ACD-A. Całkowita objętość krwi przetwarzana podczas aferezy mieściła się w zakresie 2,0–2,5. W latach 2000–2022 ośrodek wykonał 977 aferez PBSC, z czego 81% dotyczyło pacjentów autologicznych, a 19% zdrowych dawców, w tym 5 dawców niespokrewnionych. Pojedynczy zabieg aferezy trwał 180–270 minut, a objętość preparatów wynosiła 50–400 ml. Najczęstszymi wskazaniami do przeszczepienia autologicznego były: szpiczak mnogi (51,1%), ostra białaczka szpikowa (18,5%),



chłoniak nieziarniczny (13,6%), chłoniak Hodgkina (13,4%), natomiast wskazaniami do przeszczepienia allogenicznego były głównie: ostra białaczka szpikowa (55,8%), ostra białaczka limfoblastyczna (14,2%), przewlekła białaczka szpikowa (7,5%), ciężka anemia aplastyczna (5,8%), choroby mielo-proliferacyjne (5%) [11].

Metodą rutynowo stosowaną w celu utrzymania żywotności komórek przez dłuższy czas jest wspomniana krioprezerwacja KK. W tym celu do komórek jest dodawana mieszanina kriochronna chroniąca komórki przed tworzeniem się zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych kryształów. Mieszanina ta zawiera zazwyczaj odczynnik DMSO (dimetylosulfotlenek) w stężeniu 5–10% oraz w zależności od ośrodka osocze, albuminę lub hydroksyetylowaną skrobię (HES, *hydroxyethyl starch*). W związku z czasowymi brakami niektórych odczynników na rynku lub zmianą wytycznych ośrodki wypracowują nowe metody krioprezerwacji. W następstwie wstrzymania przez kraje UE produkcji HES, Jacobsen i wsp. (Trondheim, Norwegia) postanowili wykonać walidację procesu krioprezerwacji przy innych niż dotychczas stosowanych warunkach zamrażania. Celem walidacji było ustalenie krzywych zamrażania dla metody kriokonserwacji z 5-procentowym DMSO bez HES w zamrażarce  $-80^{\circ}\text{C}$  oraz porównanie żywotności komórek w preparatach zamrożonych z dodatkiem HES. Materiał i pobrane próbki przed rozmrożeniem i analizą przechowywano w parach ciekłego azotu przez tydzień. Po rozmrożeniu zbadano żywotność komórek w preparatach KK i pobranych próbkach. Żywotność komórek wynosiła średnio 99,9% i 98,5% w produktach i próbkach zamrożonych przy użyciu 5-procentowego DMSO i HES oraz 99,7% i 98,8% przy zamrożeniu przy użyciu 5-procentowego DMSO. Uzyskane wyniki potwierdzają, że obie metody zamrażania dają podobną, odpowiednio wysoką żywotność komórek [12].

Toksyczne działanie DMSO oraz liczne skutki uboczne obserwowane u pacjentów po przeszczepieniu krioprezerwowanych KK skłaniają banki komórek do ulepszania swoich procedur preparatyki, w tym testowania różnych modyfikacji składu jakościowego i ilościowego mieszaniny kriochronnej czy roztworu stosowanego do odplukiwania DMSO po rozmrożeniu. W swoim badaniu zespół Al-Mozain (Rijad, Arabia Saudyjska) próbował ocenić wpływ zmniejszenia stężenia DMSO z 10% do 5% w mieszaninie kriochronnej na żywotność komórek. Badanie przeprowadzono na 10 losowych preparatach PBSC i szpiku. Każda donacja została poddana kriokonserwacji w dwóch

wariantach: dla stężeń 5% i 10% DMSO. Parametrami jakościowymi ocenianymi w preparatach przed kriokonserwacją oraz 2, 4 i 8 tygodni po rozmrożeniu były WBC, całkowita liczba komórek CD34+ i żywotność. Wyniki po 2, 4 i 8 tygodniach od kriokonserwacji wyraźnie wskazywały, że w preparatach o niższym stężeniu DMSO żywotność komórek była wyższa. W wyniku tej walidacji ośrodek uznał metodę z 5-procentowym DMSO za nowy standard krioprezerwacji preparatów KK od pacjentów pediatrycznych, u których skutki podania dużej ilości dimetylosulfotlenku mogą być bardzo poważne [13].

Podanie rozmrożonych preparatów KK z DMSO jako krioprotektantem zalecane jest w ciągu 10–15 minut od rozmrożenia, ponieważ w temperaturze pokojowej dimetylosulfotlenek wpływa niekorzystnie na komórki. Dlatego wiele ośrodków stosuje metody usunięcia DMSO przed podaniem KK pacjentowi. Jednymi z takich metod jest płukanie ludzką albuminą (HSA, *human albumin solution*) i dekstranem lub albuminą i HES. Larrea i wsp. (Walencja, Hiszpania) w swojej pracy opisali zastosowanie wyłącznie HSA jako środka wykorzystanego podczas płukania KK z powodu wspomnianych już niedoborów HES oraz dekstranu na rynku. Do badania wykorzystano 26 preparatów KK przeznaczonych do utylizacji. Wszystkie preparaty spełniały kryteria: końcowe stężenie komórek  $< 3 \times 10^8$  komórek/ml, kriokonserwacja przy użyciu 10% DMSO w ciągu 24 godzin od pobrania w warunkach kontrolowanego mrożenia. Pojemniki były rozmrażane w łaźni wodnej o temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrożeniu do KK dodawano roztwór płuczący zawierający HES-HSA (grupa kontrolna) lub roztwór HSA (grupa badana). W każdym końcowym produkcie bezpośrednio po płukaniu i po 60 minutach sprawdzano zawartość całkowitej liczby komórek jądrowych (TNC), żywotność i klonogenność. Nie stwierdzono istotnej różnicy w parametrach jakościowych badanych preparatów między grupami, więc uznano roztwór HSA za równoważny mieszaninie HSA-HES [14].

## Podsumowanie

Liczne doniesienia prezentowane podczas 33. Regionalnego Kongresu ISBT pokazują, jak dynamicznie zmieniają się terapie komórkowe oraz jak wiele wciąż pozostaje do zbadania i potwierdzenia. Z każdym rokiem pojawia się coraz więcej doniesień o udoskonaleniu lub tworzeniu nowych terapii komórkowych ratujących życie pacjentów. Ośrodki pobierające i przetwarzające materiał muszą być

przygotowane na dynamiczne zmiany, takie jak zmiany standardów, braki materiałów i odczynników, oraz zapewnienie odpowiedniego bezpieczeństwa i jakości komórek. Ujednolicenia wymagają także wytyczne dotyczące pobierania limfocytów do terapii CAR-T, która nadal jest sporym wyzwaniem zarówno dla personelu laboratoryjnego, pielęgniarskiego oraz lekarskiego. Kluczowym aspektem pobrania materiału allogenicznego jest także sam dawca, który musi być dobrze przeprowadzony przez cały proces od rekrutacji aż do okresu po oddaniu KK.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### Piśmiennictwo

1. Schwartz J. Growing variations in cell collections requirements. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 95, PA27–L02.
2. Thibodeaux S, Aqui N, Park Y, et al. Lack of defined apheresis collection criteria in publicly available CAR–T cell clinical trial descriptions: Comprehensive review of over 600 studies. *J Clin Apher.* 2022; 37(3): 223–236, doi: 10.1002/jca.21964, indexed in Pubmed: 35085413.
3. Schafer R. Managing PBMC donors during increasing demand for cell therapeutics. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 95, PA27–L01.
4. Maurer K, Kim HT, Garrity HM, et al. Lower incidence of chronic GVHD observed after transplantation with cryopreserved unrelated allogeneic stem cells. *Blood Adv.* 2023; 7(11): 2431–2435, doi: 10.1182/bloodadvances.2022009231, indexed in Pubmed: 36595453.
5. Maurer K, Kim HT, Kuczmarowski TM, et al. Impact of cryopreservation and transit times of allogeneic grafts on hematopoietic and immune reconstitution. *Blood Adv.* 2021; 5(23): 5140–5149, doi: 10.1182/bloodadvances.2021005139, indexed in Pubmed: 34581754.
6. Moazzeni A, Kheirandish M, Khamisipour G, et al. Leukoreduction filters (LRFs) as a novel source of CAR-NK cell based immunotherapy. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 46, PA09–L02.
7. Perez-Lopez S, Alvarez-Viejo M, Perez-Basterrechea M, et al. Pressure ulcer treatment with autologous bone-marrow mononuclear stem cells. EudraCT 2008-003015-12 results. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 110, A32–L03.
8. Khan A, Rodriguez-Romera A, Reyat J, et al. Bone marrow organoids. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 47, PA09–L04.
9. Rangel M, Pinho C, Bordalo F, et al. Real World Evidence (RWE) to assess effectiveness and safety of donors during and after cell and bone marrow collection. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 368, P532.
10. Kim N, Park S, Kwon S, et al. Unrelated hematopoietic stem cell donor recruitment of the Korean Red Cross Blood Services (2019–2022): The effect of repeat blood donor targeted recruitment. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 365, P526.
11. Useini S, et al. Grubovic Rastvorceva R, Stojanoski Z. Overview of apheresis collection of peripheral blood stem cells in hematologic patients and healthy donors. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 365, 528.
12. Jacobsen B, Teigum I, Gravås M. Validation of cryopreservation method for autologous hematopoietic stem cells without hydroxyethyl starch. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 366, P529.
13. Al-Mozain N, Al-Alem S, Al-Madhi S. Reducing the DMSO concentration in the cryopreservation mixture from 10% to 5% improves cell viability, results of a validation study. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 369, P537.
14. Larrea L, Vaya M, Vera B. An alternative washing solution for the thawing of cryopreserved hematopoietic stem cells. *Vox Sang.* 2023; 118(S1): 367, P530.