proLékaře.cz | 20.11.2026

doi: 10.48095/cctahd202617

Hodnocení morfologických změn trombocytů v trombocytových transfuzních přípravcích během skladování

Evaluation of morphological changes in platelets during storage of platelet concentrates

Jakůbková Š.[1], Heczková B.[2], Matoušek P.[3], Jenčová V.[4], Andrýs C.[5], Suchý T.[6], Šlouf M.[7], Procházková R.[1,8]

[1] *Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec, a.s.*
[2] *Oddělení klinické hematologie, Krajská nemocnice Liberec, a.s.*
[3] *Oddělení klinické biochemie, Krajská nemocnice Liberec, a.s.*
[4] *Fakulta přírodovědně-humanitní a pedagogická, Technická univerzita v Liberci*
[5] *ÚKIA FN Hradec Králové*
[6] *Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v.v.i., Praha*
[7] *Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha*
[8] *Fakulta zdravotnických studií, Technická univerzita v Liberci*

SOUHRN: **Úvod:** V průběhu výroby a skladování podléhají trombocyty morfologickým a metabolickým změnám, které limitují jejich skladovatelnost. Cílem této práce bylo zhodnotit možnost posuzování kvality trombocytů v průběhu skladování mikroskopickým hodnocením jejich morfologických změn pomocí tzv. Kunického skóre. **Materiál a metoda:** Pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) jsme posoudili morfologii trombocytů 1., 3. a 7. den skladování u 20 vzorků trombocytů z *buffy-coatu* směsných deleukotizovaných v náhradním roztoku (TBSDR) a vypočítali jsme morfologické skóre. Výsledky jsme porovnali s parametry jakosti trombocytového transfuzního přípravku (obsah trombocytů, MPV), s markery buněčného poškození trombocytů (pH, hladina glukózy a laktátu), s markery aktivace trombocytů (sP-selectin) a s výsledky testů funkce trombocytů (agregometrie). Pro posouzení korelace mezi morfologickým skóre a ostatními parametry byl použit Spearmanův korelační koeficient (r). Pro statistické hodnocení bylo použito neparametrických metod a statistická významnost byla posouzena na hladině $p < 0,05$. **Výsledky:** Vypočítané skóre vykazuje v průběhu skladování sestupný trend odpovídající morfologickým změnám směrem k aktivovaným formám trombocytů (den 1: 273,3 ± 39,4; den 3: 175,8 ± 16,8; den 7: 153,3 ± 16,4). S morfologickým hodnocením významně koreluje stanovení koncentrace glukózy ($r = 0,7696$; $p < 0,0001$), laktátu ($r = –0,7881$; $p < 0,0001$) a sP-selectinu ($r = –0,7537$; $p < 0,0001$). O statisticky významné korelace se jedná i u stanovení obsahu trombocytů ($r = 0,4348$; $p = 0,0009$), MPV ($r = –0,2594$; $p = 0,0493$) a agregací s indukcí kyselinou arachidonovou ($r = –0,4917$; $p < 0,0001$) a kolagenem ($r = 0,4612$; $p = 0,0003$). Korelace mezi morfologickým skóre a hodnotou pH nebyla prokázána ($r = 0,1528$; $p = 0,2521$). **Závěr:** Morfologické hodnocení pomocí Kunického skóre lze využít pro posouzení kvality trombocytů během skladování např. v případně validace nových procesů výroby. Vzhledem k náročnosti této metodiky a požadavku na speciální vybavení je vhodnější využití silně korelujících parametrů, které zahrnují stanovení koncentrace glukózy, laktátu, sP-selectinu a jsou výrazně dostupnější.

KLÍČOVÁ SLOVA: trombocytový transfuzní přípravek – morfologie – mikroskopie – kontrola jakosti

ÚVOD

Trombocyty obsažené v trombocytových transfuzních přípravcích (TP) podléhají v průběhu výroby a skladování morfologickým a metabolickým změnám, které limitují jejich skladovatelnost [1–6]. Na uvedený proces má navíc vliv vysoká senzitivita trombocytů na stimuly během procesu přípravy a jejich schopnost aktivace. Tyto změny, tzv. skladovací léze, mohou mít vliv na životaschopnost trombocytů a jejich hemostatické funkce [5–9]. Morfologické změny trombocytů se projevují změnou diskoidního tvaru ve sférický, vznikem aktivovaných forem s dendritickými výběžky a případně ztrátou schopnosti udržet osmotický gradient za vzniku velkých balónovitých struktur [2,5]. Metabolické alterace trombocytů se odráží ve změnách pH, ve zvýšení LDH v supernatantu, konsumpci glukózy a produkci laktátu. Dochází k uvolnění řady cytokinů, TGF-β, externalizaci fosfatidylserinu na povrch

proLékaře.cz | 20.11.2026

SUMMARY: **Introduction:** During production and storage, platelets undergo morphological and metabolic changes that limit their shelf life. The aim of this study was to evaluate the possibility of assessing the quality of platelets during storage by microscopic evaluation of their morphological changes using the Kunicki score. **Material and method:** We evaluated platelet morphology on days 1, 3 and 7 of storage in 20 samples of buffy coat-derived platelet concentrates in additive solution, using scanning electron microscopy (SEM), and calculated the morphological score. We compared these results with platelet concentrates quality parameters (platelet count, MPV), markers of platelet cellular damage (pH, glucose and lactate levels), markers of platelet activation (sP-selectin) and platelet function tests (aggregometry). Spearman's correlation coefficient (r) was used to assess the correlation between morphological scores and other parameters. Non-parametric methods were used for the evaluation and statistical significance was assessed at the level of $P < 0.05$. **Results:** The calculated score showed a decreasing trend during storage, corresponding to morphological changes towards activated platelet forms (day 1: 273.3 ± 39.4; day 3: 175.8 ± 16.8; day 7: 153.3 ± 16.4). Glucose ($r = 0.7696$; $P < 0.0001$), lactate ($r = –0.7881$; $P < 0.0001$) and sP-selectin ($r = –0.7537$; $P < 0.0001$) concentrations correlated significantly with morphological evaluation. Statistically significant correlations were also found for platelet count ($r = 0.4348$; $P = 0.0009$), MPV ($r = –0.2594$; $P = 0.0493$), and aggregation with arachidonic acid induction ($r = –0.4917$; $P < 0.0001$) and collagen induction ($r = 0.4612$; $P = 0.0003$). No correlation was found between morphological score and pH ($r = 0.1528$; $P = 0.2521$). **Conclusion:** Morphological evaluation using the Kunicki score can be used to assess platelet quality during storage, for example in the validation of new manufacturing processes. Given the complexity of this methodology and the requirement for special equipment, it is more appropriate to use strongly correlated parameters, which include the determination of glucose, lactate, and sP-selectin concentrations and are significantly more affordable.

KEY WORDS: platelet concentrate – morphology – microscopy – quality control

buněčné membrány a k expresi markerů aktivace (např. sP-selectin) [3,6,7,9]. Ve studiích zabývajících se funkcí trombocytů je jednou z možných vyšetřovacích metod agregometrie [4,5,10]. Standardně se pro hodnocení jakosti trombocytových TP používá stanovení počtu trombocytů a hodnota pH na konci skladování, avšak pro účely validací nových procesů je doporučováno hodnocení širšího spektra parametrů. Posouzení morfologických parametrů může být jedním z nich. V této práci bylo zvoleno mikroskopické hodnocení morfologie trombocytů během skladování a výsledek byl vyjádřen pomocí tzv. Kunického skóre [11].

MATERIÁL A METODIKA

V prospektivní studii jsme zhodnotili 20 vzorků trombocytů z *buffy-coatu* (BC) směsných deleukotizovaných v náhradním roztoku (TBSDR) 1., 3. a 7. den skladování. Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu jsme posoudili morfologii trombocytů a následně jsme vypočítali morfologické skóre (Kunicki 1975) [11–15]. Pozorované morfologické typy trombocytů v našich vzorcích jsou označeny na obr. 1. Hodnocení morfologie bylo provedeno na 200 buňkách, bylo vypočítáno procentuální zastoupení morfologických typů trombocytů a dopočítáno skóre dle vzorce: disky (%)*4 + sféry (%)*2 + dendrity (%)*1 + balóny (%)*0 [11]. V případě vzorku, který obsahuje výhradně neaktivované trombocyty diskovitého tvaru, by bylo dle výše uvedeného vzorce dosaženo maximální hodnoty Kunického skóre 400 [11].

Tyto výsledky byly porovnány se standardními parametry jakosti trombocytového TP (obsah trombocytů, MPV), s markery buněčného poškození trombocytů (pH, hladina glukózy a laktátu), s markery aktivace trombocytů (sP-selectin) a s výsledky testů funkce trombocytů (agregometrie) a byla zhodnocena jejich vzájemná korelace.

Výběr vyšetřovacích metod byl proveden na podkladě literárních údajů a vlastních výzkumných zkušeností [3,6,9,16,17].

Studie byla provedena ve spolupráci s katedrou chemie FP TUL v Liberci, kde byla provedena fixace, imobilizace a mikroskopické hodnocení vzorků. Metodika přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopii byla konzultována s pracovníky mikroskopického pracoviště ÚMCH AV ČR [2].

Statistické hodnocení

Statistické hodnocení získaných dat bylo provedeno doc. Ing. Tomášem Suchým, Ph.D. (ÚSMH AVČR). Normalita dat byla ověřena kvantil-kvantilovými grafy (Q-Q) a Shapiro-Wilkovým testem. Pro statistické hodnocení souborů s nepotvrzenou normalitou dat byly použity neparametrické metody. Hodnocení vývoje sledovaných parametrů v průběhu skladování TP bylo provedeno pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu s následným *post hoc* testem podle Dunnové s korekcí pro vícenásobné porovnání. K posouzení vhodnosti použitých vyšetřovacích metod k hodnocení změn v průběhu skladování byl využit koeficient kvartilové variace. Pro posouzení korelace mezi morfologickým skóre a ostatními parametry byl použit Spearmanův korelační koeficient. Statistická významnost byla posouzena na hladině $p < 0,05$.

VÝROBA TBSDR

TBSDR byly vyrobeny ze 450 ± 10 % ml plné krve odebrané do čtyřváků (CompoFlow 4F, Fresenius Kabi AG) s antikoagulačním roztokem CPD v poměru 1 : 7. Vaky s plnou krví byly centrifugovány velkoobjemovou centrifugou (Cryofuge 16, Thermo Electron LED GmbH: 3250 rpm, 14 min., teplota 22 °C, zrychlení 6, brzda 6) a zpracovány na automatickém lisu (Compomat G5, Fresenius Kabi AG). BC byly skladovány do druhého dne při teplotě 20–24 °C a nepřetržitém míchání rychlostí 60 kyvů za minutu (agitátor RL-45B a thermobox TB-80N, TOOL s.r.o.). Čtyři BC a náhradní roztok (Intersol, Fresenius Kabi AG) byly smíchány v setu pro výrobu

proLékaře.cz | 20.11.2026

TBSDR (Teruflex, Terumo BCT). Směsný BC byl centrifugován (Cryofuge 16, Thermo Electron LED GmbH: 1 150 rpm, 8 min, teplota 22 °C, zrychlení 7, brzda 4) a na trombocyty bohatý supernatant byl odseparován přes deleukotizační filtr na automatickém lisu (Compomat G5, Fresenius Kabi AG). Vyrobený TBSDR byl skladován při teplotě 20–24 °C za konstantní agitace.

ODBĚRY A VYŠETŘENÍ VZORKŮ

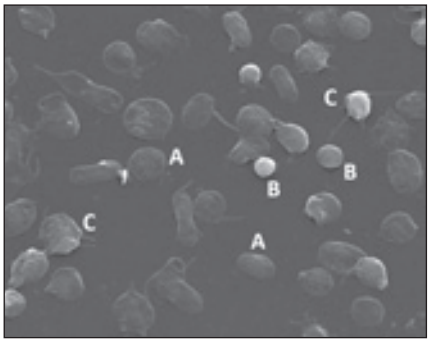
Z TP byly v den 1 (den výroby TBSDR), 3 a 7 odebrány vzorky pro mikroskopické hodnocení, vyšetření jakosti trombocytových TP, markerů buněčného poškození, markerů aktivace trombocytů a vyšetření agregometrie. Vzorky byly odebírány v den 1 a 3 ze sterilně navařeného transfervaku (objem cca 30 ml), sedmý den byl použit zbytek TBSDR. Přibližně 1 ml přípravku byl odebrán do suché zkumavky pro vyšetření pH, další 2 ml do suché zkumavky s EDTA pro vyšetření počtu trombocytů a MPV, 2 ml byly odebrány do zkumavky bez aditiv pro vyšetření agregace a 3 ml do zkumavky bez aditiv pro mikroskopické vyšetření. Zbytek odebraného vzorku TBSDR byl centrifugován (Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific: 5 min, 4 500 × g) pro získání supernatantu, který byl rozplněn do zkumavek a mikrozkumavek, přibližně 1,5 ml bylo použito k vyšetření glukózy a laktátu a 3–4 mikrozkumavky po cca 1 ml byly zamraženy při teplotě –20 °C pro následné vyšetření sP-selectinu.

Vyšetření pH bylo provedeno na acidobazickém analyzátoru (ABL 835 FLEX, Radiometer), fotometricky byla stanovena koncentrace glukózy (Glucose HK Gen. 3, Cobas Pro, Roche) a laktátu (Lactate Gen. 2, Cobas Pro, Roche), vše na oddělení klinické biochemie KNL, a.s. Počet trombocytů a MPV byl stanoven na transfuzním oddělení KNL, a.s., na hematologickém analyzátoru (XN-1000, Sysmex), agregace trombocytů byla vyšetřena na oddělení klinické hematologie KNL, a.s., metodou optické agregometrie (APACT, Haemochrom Diagnostika GmbH). Vyšetření sP-selectinu bylo provedeno v sérii v ÚKIA FN Hradec Králové metodou ELISA (Human P-Selectin/CD62P Immunoassay, R&D Systems, Inc).

PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII

Příprava mističek s polylysinovým filmem

Skleněné mističky o objemu přibližně 70 µl, které byly vyrobeny v ÚMCH AV ČR, byly naplněny roztokem 0,01 % polylysinu (Poly-L-Lysine, Sigma: P4707) a inkubovány 15 min. Po odstranění roztoku polylysinu následovala tři propláchnutí destilovanou vodou vždy po jedné minutě inkubace. Mističky potažené polylysinovým filmem byly sušeny volně na filtračním papíru. Takto připravený podložní materiál byl před použitím skladován přikrytý při pokojové teplotě.



Obr. 1. Morfologické typy trombocytů.
A – disky, B – sféry, C – dendrity

Fixace a imobilizace vzorku

Fixace trombocytů glutaraldehydem byla provedena dle metody podle Whita [16]. Ze zásobních pufrovacích roztoků A a B (tab. 1) byl připraven prefixační roztok 0,1 % glutaraldehydu (WA) a fixační roztok 3 % glutaraldehydu (WB) (tab. 2).

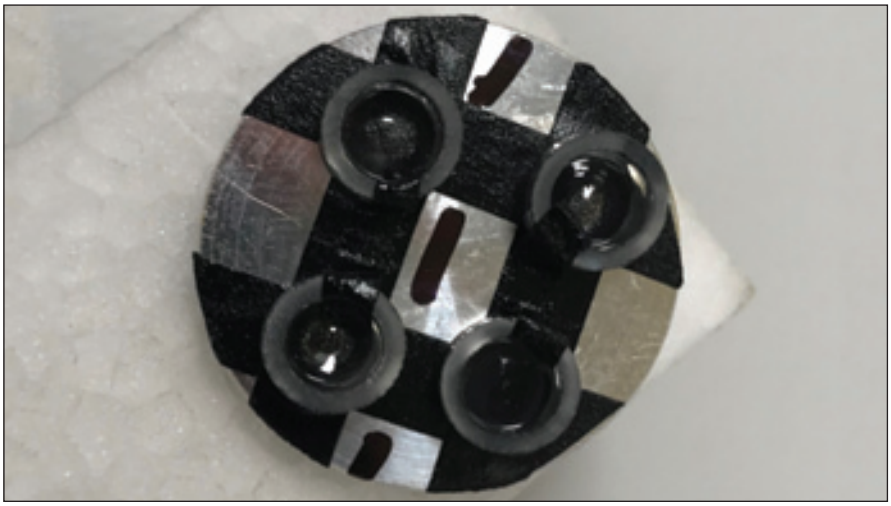
Tab. 1. Složení zásobních pufrovacích roztoků A a B.

Zásobní roztok A	Zásobní roztok B
14 g NaCl	1,1 g $NaHCO_3$
0,75 g KCl	0,22 g $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$
0,55 g $MgSO_4$	0,052 g bezvodý KH_2PO_4
1,5 g $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$	0,01 g fenolová červeň
destilovaná voda doplněná do 100 ml	destilovaná voda doplněná do 100 ml (pH roztoku 7,4)

Tab. 2. Složení prefixačního roztoku 0,1% glutaraldehydu (WA) a fixačního roztoku 3% glutaraldehydu (WB).

Roztok WA	Roztok WB
8,9 ml destilované vody	6 ml destilované vody
0,5 ml roztoku A	0,5 ml roztoku A
0,5 ml roztoku B	0,5 ml roztoku B
0,1 ml 10% glutaraldehydu	3 ml 10% glutaraldehydu

proLékaře.cz | 20.11.2026

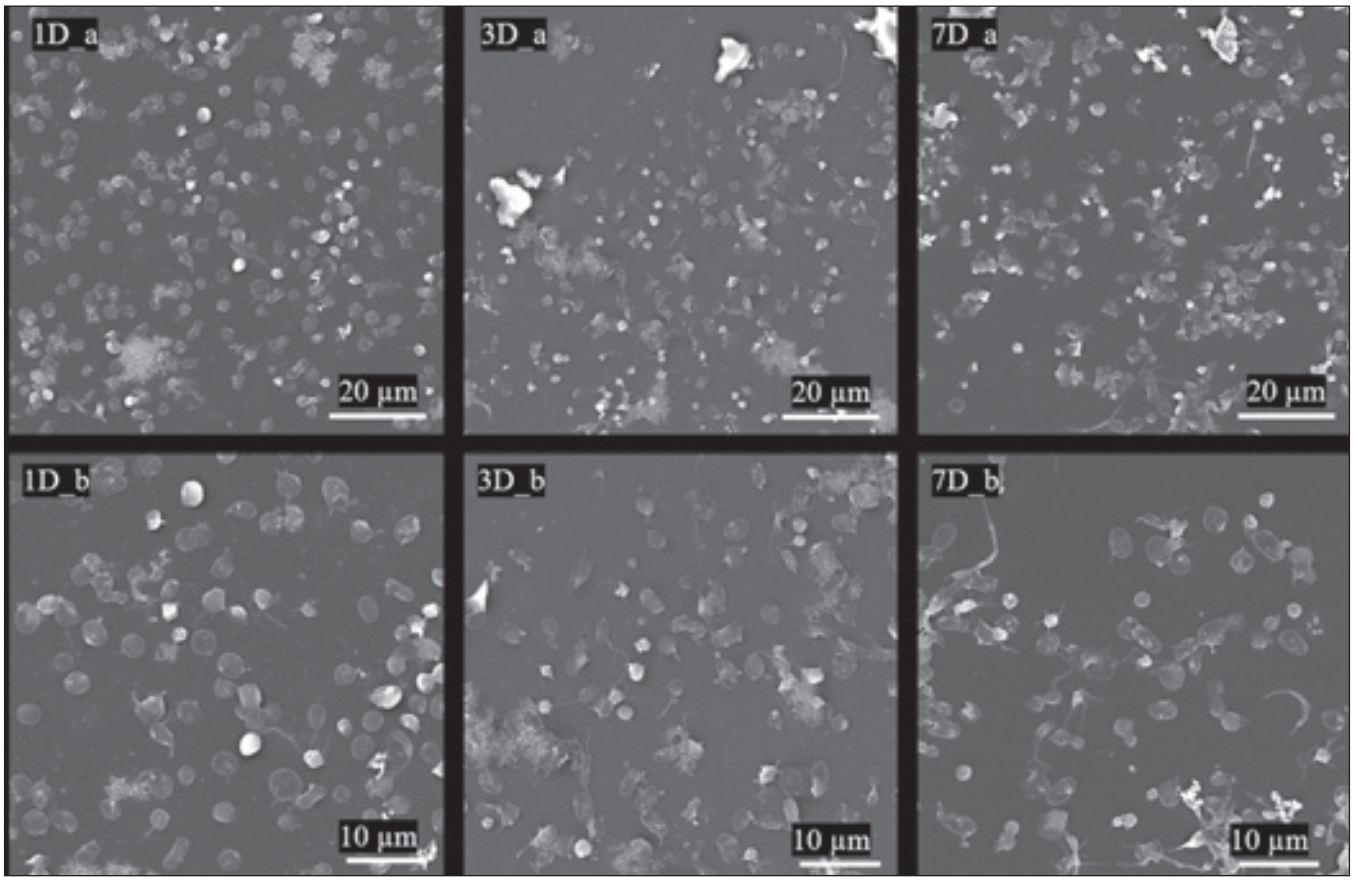


Obr. 2. Vzorky podlepené uhlíkovou páskou omezující nabíjení při SEM mikroskopii.

Na dno centrifugační zkumavky byla vložena skleněná mistička potažená polylysinovým filmem. 0,5 ml TBSDR bylo převrstveno 0,5 ml roztoku WA a inkubováno 15 minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci (1 000 × g, 20 s) v laboratorní centrifuze (Z36HK, Hermle Labortechnik, DE) byl odstraněn supernatant. Prefixované trombocyty byly převrstveny 0,5 ml roztoku WB a inkubovány 1 hodinu při teplotě 20–24 °C. Následně byl vzorek trombocytů vysušen ethanolovou řadou: 60–70–80–90–96% ethanol vždy po 5 min v každém roztoku koncentrační řady. Mistička se suchými trombocyty byla před pokrytím zlatem skladována v lednici při teplotě 2–8 °C.

Příprava suchého preparátu na mikroskopii

Vzorkem pro elektronovou skenovací mikroskopii byly suché trombocyty imobilizované na polylysinovém filmu, které byly připraveny vždy v duplikátu. Vzorky byly pokryté vrstvou zlata pomocí naprašovačky (Quorum Q150R S Plus) a podlepeny uhlíkovou páskou kvůli omezení nabíjení při SEM pozorování a snímání (obr. 2).



Obr. 3. Snímky trombocytů z jednoho transfuzního přípravku v průběhu skladování.
1D a – první den skladování, zvětšení 3 000; 1D b – první den skladování, zvětšení 5 000; 3D a – třetí den skladování, zvětšení 3 000; 3D b – třetí den skladování, zvětšení 5 000; 7D a – sedmý den skladování, zvětšení 3 000; 7D b – sedmý den skladování, zvětšení 5 000

proLékaře.cz | 20.11.2026

Tab. 3. Výsledky sledovaných parametrů TBSDR v průběhu skladování (den 1, den 3, den 7).

Parametr	Den 1	Den 3	Den 7
Buněčné parametry přípravku			
počet trombocytů (10^9/l)	823,7 ± 94,8	784,3 ± 99,5	744,8 ± 90,1
MPV (fl)	10,1 ± 0,3	9,9 ± 0,3	10,4 ± 0,5
Markery buněčného poškození			
glukóza (mmol/l)	6,6 ± 0,4	5,7 ± 0,6	2,0 ± 0,8
laktát (mmol/l)	6,5 ± 0,8	8,4 ± 0,9	15,3 ± 1,9
pH	7,2 ± 0,0	7,3 ± 0,0	7,2 ± 0,1
Marker aktivace trombocytů			
sP-selectin (ng/ml)	120,0 ± 14,9	165,3 ± 20,5	243,2 ± 26,5
Testy funkce trombocytů			
agregace: k. arachidonová (%)	17,8 ± 12,4	52,6 ± 13,4	43,0 ± 14,7
agregace: kolagen (%)	40,5 ± 20,7	37,2 ± 13,7	7,1 ± 10,5
Morfologické změny			
morfologické skóre (dle Kunického)	273,3 ± 39,4	175,8 ± 16,8	153,3 ± 16,4

n = 20, průměr ± SD

HODNOCENÍ SNÍMKŮ ZE SKENOVACÍHO ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU

Ke každému vzorku TBSDR byla na skenovacím elektronovém mikroskopu (Vega 3SB Easy Probe, TESCAN, Brno, ČR) nasnímána série fotografií v různých zvětšeních (1 000×, 3 000× a 5 000×) tak, aby byl zajištěn dostatečný počet hodnotitelných trombocytů (> 200). Pro analýzu byly použity snímky při zvětšení 3 000×, a v případě dourčení morfologického typu některých buněk 5 000×. Vybrané snímky preparátů s trombocyty z jednotlivých hodnocených dnů jsou na obr. 3. Morfologické změny byly hodnoceny ze získané fotodokumentace, trombocyty byly rozděleny do následujících typů:

1. Disky – trombocyty, které si zachovaly svůj původní diskovitý tvar.
2. Sféry – trombocyty, které změnily svůj tvar na sférický.
3. Dendrity – trombocyty s dendritickými výrůstky.
4. Balóny – poškozené trombocyty neschopné udržet osmotický gradient.

Hodnocení bylo provedeno na 200 buňkách, vypočítáno procentuální zastoupení typů trombocytů a dopočítáno skóre dle vzorce: disky (%) *4 + sféry (%) *2 + dendrity (%) *1 + balóny (%) *0 [11].

VÝSLEDKY

Vyšetření všech sledovaných parametrů bylo provedeno u 20 TBSDR 1., 3. a 7. den skladování. Výsledky jsou uvedeny v tab. 3, grafické znázornění rozdílů hodnot mezi jednotlivými dny vč. posouzení statistického významu je v grafu 1.

V průběhu skladování TBSDR jsme zjistili pokles počtu trombocytů v přípravku (tab. 3), který byl mezi dnem 1 a 7 statisticky významný ($p = 0,02$). Naopak rozdíl mezi 1. a 3. dnem ($p = 0,45$) a mezi 3. a 7. dnem ($p = 0,51$) nebyl statisticky významný (graf 1). Rozdíl hodnot MPV mezi začátkem a koncem skladování nebyl statisticky významný, avšak mezi dnem 3 a 7 jsme prokázali statisticky významné zvýšení ($p < 0,001$) (tab. 3, graf 1).

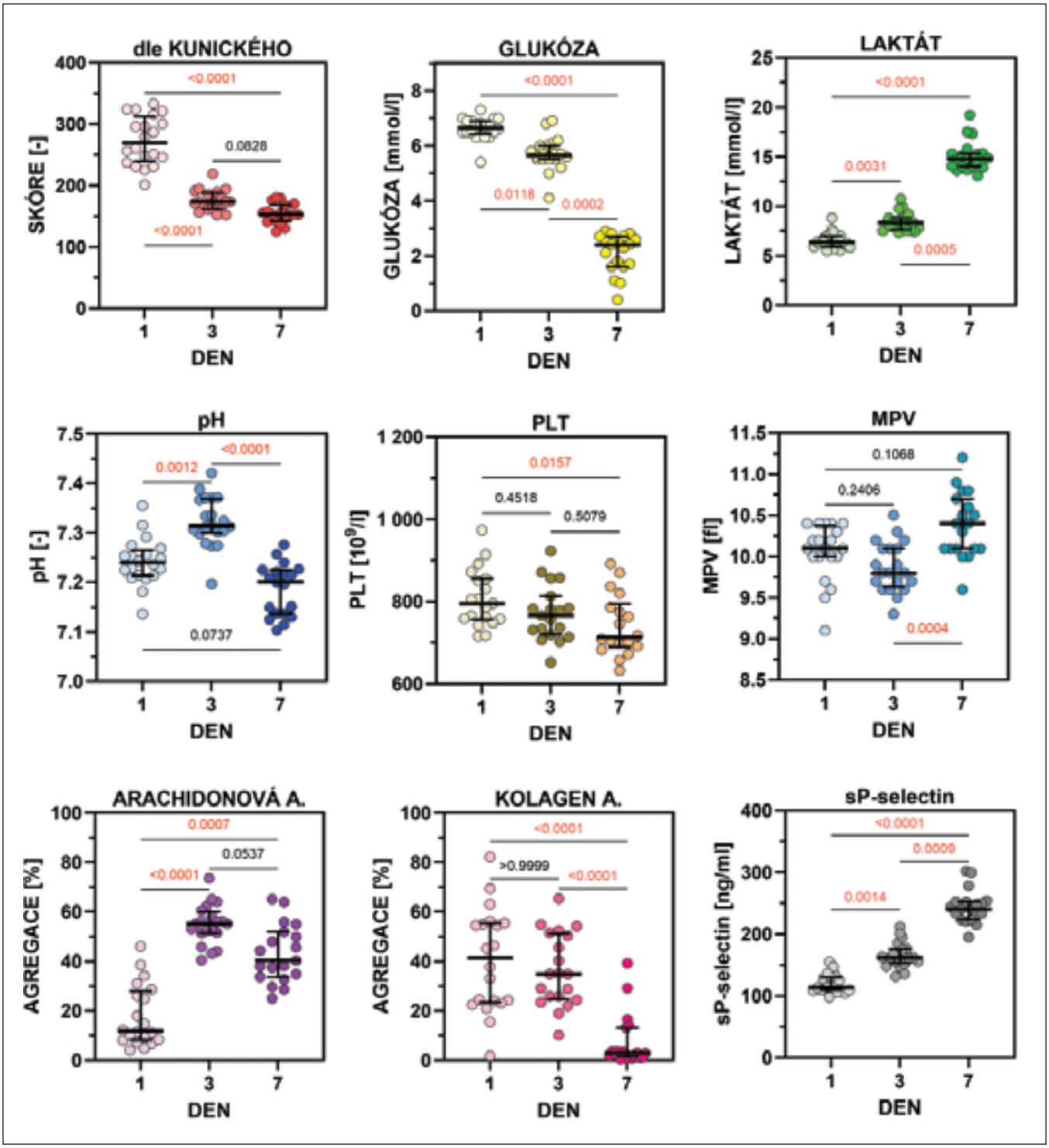
Prokázali jsme statisticky významný pokles hladiny glukózy ($p < 0,001$) a vzestup hladiny laktátu v přípravku ($p < 0,001$). U hodnoty pH jsme změny mezi dnem 1 a 7 neprokázali ($p = 0,07$), ale zaznamenali jsme statisticky významný vzestup hodnoty pH mezi dny 1 a 3 ($p = 0,001$) a statisticky významný pokles mezi dny 3 a 7 ($p < 0,001$). Dále jsme zjistili zvýšení aktivace trombocytů v průběhu skladování, kterému odpovídalo významné zvýšení hladiny sP-selectinu ($p < 0,001$) (tab. 3, graf 1).

Při hodnocení agregace s kyselinou arachidonovou jsme prokázali významné zvýšení procenta agregace ($p < 0,001$) mezi dnem 1 a 3, mezi 3. a 7. dnem skladování byl rozdíl naopak nevýznamný ($p = 0,05$). V případě agregace trombocytů indukované kolagenem nebyl rozdíl mezi 1. a 3. dnem významný ($p > 0,99$), naopak 7. den došlo významnému poklesu procenta agregace ($p < 0,001$) (tab. 3, graf 1).

Morfologické skóre vykázalo statisticky významné snížení hodnot mezi dnem 1 a 7 ($p < 0,001$), rozdíl mezi 3. a 7. dnem nebyl významný ($p = 0,08$). Výsledky uvedeny v tab. 3 a vývoj hodnot v čase vč. statistické signifikance je zobrazen v grafu 1.

Z hodnocení byly vyloučeny kontroly jakosti u vzorku 19 (den 7), kde došlo k sedimentaci trombocytů z důvodu problému při skladování, a dále tři odlehlé hodnoty počtu trombocytů u vzorku 7. Morfologické skóre nemohlo být vypo-

proLékaře.cz | 20.11.2026

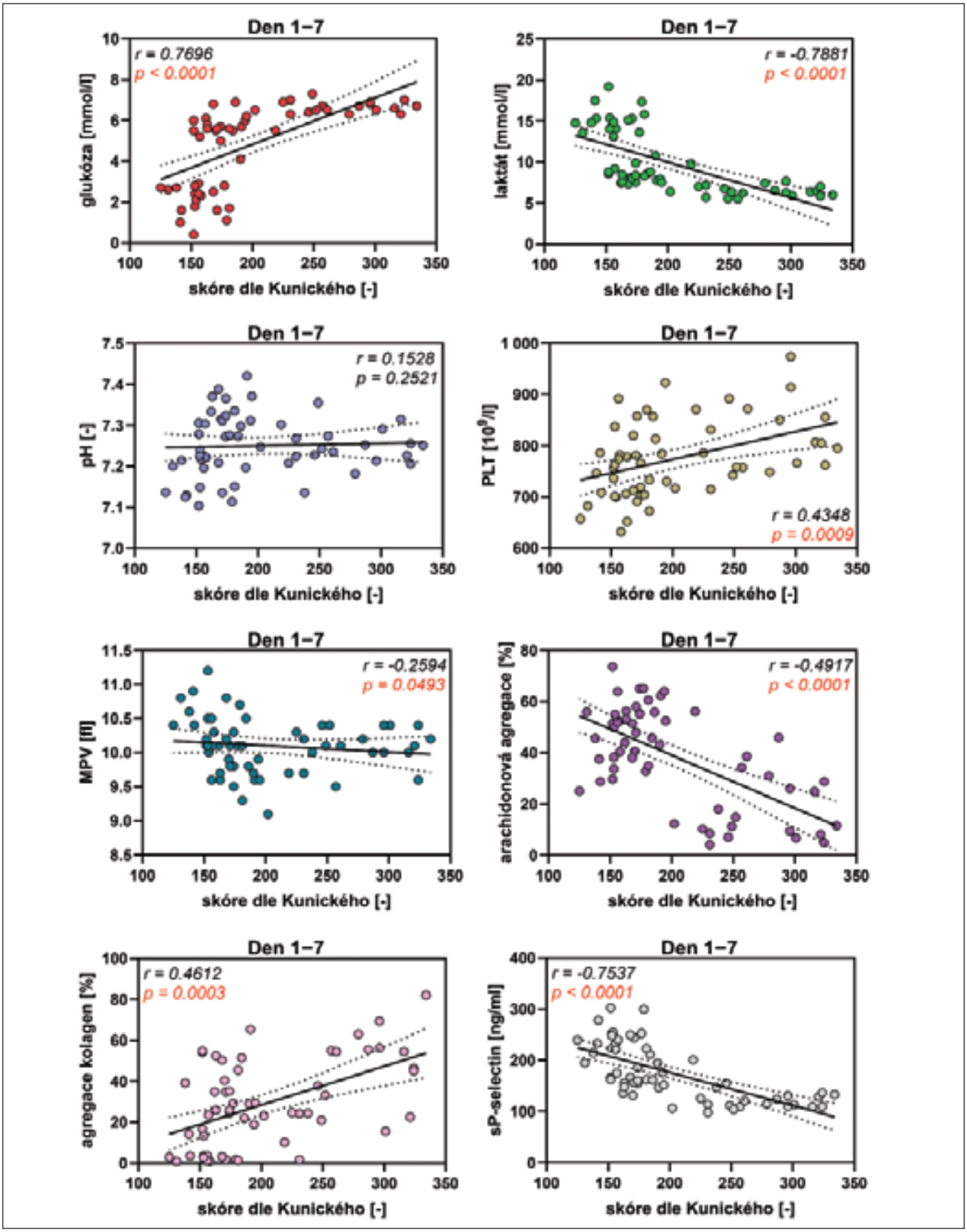


Graf 1. Vývoj jednotlivých parametrů v čase s vyneseným mediánem a mezikvartilovým rozpětím. V grafech jsou vyneseny p-hodnoty testu podle Dunnové s korekcí na vícenásobné porovnání vyjadřující statistickou signifikanci.

čítáno u vzorku TBSDR číslo 12 ze 7. dne skladování, snímky z elektronového mikroskopu byly nehodnotitelné z důvodu nekvalitního vzorku.

S morfologickým hodnocením silně korelovala koncentrace glukózy ($r = 0,77$; $p < 0,001$), laktátu ($r = –0,79$; $p < 0,001$) a sP-selectinu ($r = –0,75$; $p < 0,001$). Statisticky významné korelace jsme zjistili i u obsahu trombocytů v TP ($r = 0,43$; $p < 0,001$), MPV ($r = –0,26$; $p = 0,05$) a agregace s indukcí kyselinou arachidonovou ($r = –0,49$; $p < 0,001$) a kolagenem ($r = 0,46$; $p < 0,001$). Korelace mezi morfologickým skóre a hodnotou pH nebyla prokázána ($r = 0,15$, $p = 0,25$). Hladina pH byla po celou dobu skladování téměř konstantní (7,2–7,3) a neodrážela tak po-

proLékaře.cz | 20.11.2026



Graf 2. Korelace skóre dle Kunického s dalšími hodnocenými parametry. V grafech je uveden Spearmanův korelační koeficient (r) a p-hodnota vyjadřující statistickou signifikanci. V grafech je pro ilustraci dále vynesena jednoduchá lineární regrese s konfidenčními pásy (95%).

proLékaře.cz | 20.11.2026

Tab. 4. Spearmanovy korelační koeficienty s 95% intervaly spolehlivosti popisující významnost korelace jednotlivých parametrů s morfologickým skóre dle Kunického. V tabulce je dále uvedena p-hodnota vyjadřující statistickou signifikanci.

	Skóre dle Kunického vs.							
	glukóza	**laktát**	**pH**	**PLT**	**MPV**	**AA**	**AK**	**sP-selectin**
Spearman r	0,7696	–0,7881	0,1528	0,4348	–0,2594	–0,4917	0,4612	–0,7537
95% CI	0,632; 0,860	–0,872; –0,659	–0,118; 0,402	0,184; 0,633	–0,491; 0,007	–0,670; –0,260	0,223; 0,648	–0,849; –0,610
p-hodnota	**< 0,0001**	**< 0,0001**	0,2521	**0,0009**	**0,0493**	**< 0,0001**	**0,0003**	**< 0,0001**
počet párů	57	57	58	55	58	58	58	58

AA – agregace k. arachidonová; AK – agregace kolagen; MPV – obsah trombocytů

zorované morfologické změny. Korelační koeficienty s vyjádřenou statistickou signifikancí pro jednotlivé metody jsou znázorněny v grafu 2 a uvedeny v tab. 4.

Dále byla posouzena vhodnost použití jednotlivých metod pro hodnocení metabolických a morfologických změn v průběhu skladování se zohledněním přesnosti (opakovatelnosti) dané metody (graf 3).

DISKUZE

Standardně se pro hodnocení jakosti trombocytových TP používá stanovení počtu trombocytů a pH na konci skladování [18]. Z těchto parametrů se jako nevhodné pro TP v náhradním roztoku ukázalo stanovení pH, které je v průběhu celého skladování v podstatě konstantní (7,2–7,3), a to zřejmě z důvodu pufračních schopností těchto skladovacích roztoků. Tento parametr neodráží morfologické ani metabolické změny zjištěné jinými metodami. Ve 22. vydání *„Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components"* již stanovení pH na konci skladování není doporučeno pro kontrolu kvality trombocytů v náhradních roztocích a nově je doporučeno sledování koncentrace glukózy, což odpovídá i našim výsledkům [19]. Vyšší rozptyl hodnot tohoto parametru je nejspíše způsoben individuální biologickou variabilitou v rámci směsných přípravků a zasluhuje další zkoumání. Naopak sledování počtu trombocytů je vhodný parametr popisující kvalitu TP a v naší práci byla prokázána významná korelace s morfologickým skóre.

Vývoj hodnot dalších parametrů sledovaných v čase jako hladina laktátu a sP-selectin odpovídá předpokladu a literárním zdrojům [3,7,9]. V průběhu skladování TP se zvyšuje hladina laktátu v souvislosti s metabolizmem trombocytů, konkrétně s glykolýzou. Současně dochází k růstu hladiny sP-selectinu, který charakterizuje aktivaci trombocytů. Oba tyto parametry vykazují významnou korelaci s morfologickým skóre (graf 2, tab. 4), což odpovídá dřívějším studiím [3].

Agregace s kyselinou arachidonovou a kolagenem, zvolená jako test funkce trombocytů, s morfologickým skóre stále ještě významně koreluje, avšak soubor hodnot vykazuje vyšší variační koeficient (graf 3). Je tedy otázkou, zda má tato metoda ještě dostatečnou opakovatelnost (přesnost). Ta může být ovlivněna celou řadou faktorů, jako nehomogenitou vzorku nebo vzorkováním apod. Citlivost metody na různé preanalytické a analytické podmínky je popsána v literatuře [4].

Vypočítané morfologické skóre se pohybuje v rozmezí od 334 (maximální vypočítaná hodnota, 1. den skladování) do 125 (minimální vypočítaná hodnota, 7. den skladování). Tyto hodnoty se nachází v rozmezí výsledků dle literárních zdrojů, kde se hodnoty skóre pro 1. až 3 den pohybují v rozmezí 378 až 118 v závislosti na koncentraci trombocytů, skladovací teplotě a případně dalších parametrech [11].

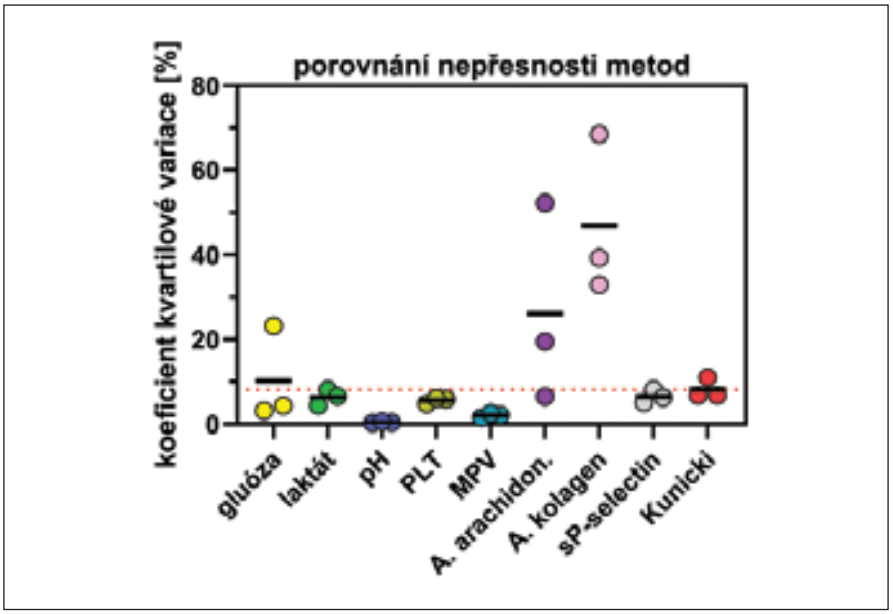
Klesající hodnoty skóre v průběhu skladování odpovídají morfologickým změnám trombocytů směrem k aktivovaným formám [2,5,11].

Posouzení morfologie trombocytů v trombocytových TP vyjádřené pomocí Kunického skóre v rámci kontroly kvality TP je možné využít při zavádění nových procesů výroby, kdy je doporučeno hodnotit širší spektrum parametrů. V těchto případech může být výhodou informace o procentuálním zastoupení morfologických typů trombocytů s ohledem na stupeň jejich aktivace. Využití metody se nabízí např. v případě porovnávání míry aktivace trombocytů v trombocytových TP skladovaných za různých teplotních podmínek, v různých skladovacích roztocích a v materiálově odlišných vacích. Porovnání lze samozřejmě provést i v případě různých výrobních technik. Na základě našich výsledků je metoda funkční a vypočítané skóre vyjadřuje míru aktivace trombocytů v TP.

Nevýhodami jsou náročná příprava vzorků na mikroskopii a požadavky na speciální materiálové a přístrojové vybavení. Dále je třeba si uvědomit obtížnou standardizovatelnost metody.

Ze získaných výsledků nicméně vyplývá, že je možné využít i mnohem dostupnějších metod, které silně korelují s morfologickým skóre. Jedná se o stanovení koncentrace glukózy, laktátu a sP-selectinu. Metody stanovení laktátu a sP-selectinu navíc poskytují konzistentní výsledky s poměrně malým va-

proLékaře.cz | 20.11.2026



Graf 3. Koeficienty kvartilové variace určené pro jednotlivé metody (1., 3. a 7. den) vyjadřující opakovatelnost (přesnost) použitých vyšetřovacích metod. V grafu jsou uvedeny střední hodnoty (černá čára) a červenou čarou je zvýrazněna střední hodnota pro skóre dle Kunického.
AA – agregace k. arachidonová; AK – agregace kolagen; GLU – glukóza; LAC – laktát; sP-S – sP-selectin

riačním koeficientem a vykazují tedy vysokou míru přesnosti (graf 3).

ZÁVĚR

Morfologické hodnocení pomocí Kunického skóre lze využít jako jednu z metod kontroly kvality trombocytů v TP během skladování např. v případě validace nových procesů výroby. Metoda poskytuje konkrétní informace o procentu trombocytů určitého morfologického typu a vyjadřuje míru aktivace buněk v přípravku.

Jedná se o poměrně časově náročnou metodiku s požadavky na speciální vybavení. Na základě výsledků naší práce jsme prokázali, že je možné využití jiných dostupnějších parametrů, které s morfologickým skóre silně korelují. Jedná se především o stanovení koncentrace glukózy, laktátu a sP-selectinu. Naopak standardně využívané stanovení pH na konci skladovaní se ukázalo jako nevhodné u trombocytových TP v náhradních roztocích.

Literatura

1. Sperling S, Vinholt PJ, Spogoe U, Yazer MH, Frederiksen H, Nielsen Ch. The effects of storage on platelet function in different blood product. Hematology. 2019;1: 89–96.
2. Bohoněk M, Šlouf M, Hromádková J, Nevoralová M, Holada K, Landová L. Morfologické hodnocení trombocytů jako parametr kvality – zavedení vhodné mikroskopické techniky. Transfuze Hematol Dnes. 2018;24(Supl 2):132.
3. Jain A, Marwaha N, Sharma RR, Kaur J, Thakur M, Dhawan HK. Serial changes in morphology and biochemical markers in platelet preparation with storage. Asian Journal of Transf Sci. 2015;9(1):41–47.
4. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative rewiew. Vasc Health Risk Manag. 2015;11:133–148.
5. Braune S, Walter M, Schulze F, Lendlein A, Jung F. Changes in platelet morphology and function during 24 hours of storage. Clin Hemorheol Microcirc. 2014;58:159–170.
6. Chandra T, Gupta A, Kumar A, Afreen S. Morphological and functional changes in random donor platelets stored for seven days in platelet additive solution. Int J Blood Transf Immunohematol. 2011;1:20–25.
7. Procházková R, Andrýs C, Hubáčková L, Krejsek J. Markers of apoptosis and platelet activation in platelet concentrates collected by apheresis. Transfus Apher Sci. 2007;37: 115–123.
8. Procházková R. Multikomponentní aferetické odběry krve. Brno, Tribun EU 2009; 88 s.
9. Řehořová L, Procházková R. Markery buněčného poškození trombocytů u směsných trombocytových transfuzních přípravků v aditivních roztocích. Transfuze Hematol Dnes. 2011;17: 85–91.
10. Meinke S, Wikman A, Gryfelt G, Hultenby K, Uhlin M, Höglund P, et al. Cryopreservation of buffy coat–derived platelet concentrates photochemically treated with amotosalen and UVA light. Transfusion. 2018;58;2657–2668.
11. Kunicki TJ, Tuccelli M, Becker GA, Aster RH. A study of variables affecting the quality of platelets stored at „room temperature". Transfusion. 1975;15(5):414–421.
12. Maurer-Spurej E, Devine DV. Platelet aggregation is not initiated by platelet shape change. Lab Invest. 2001;81:1517–1525.
13. Maurer-Spurej E, Pfeiler G, Maurer N, Lindner H, Glatter O, Devine DV. Room temperature activates human blood platelets. Lab Invest. 2001;81:581–592.
14. Du Plooy JN, Buys A, Duim W, Pretorius E. Comparison of platelet ultrastructure and elastic properties in thrombo-embolic ischemic stroke and smoking using atomic force and scanning electron microscopy. PLoS ONE 2013;8(7):e69774. doi: 10.1371/journal.pone.0069774.
15. Das Murtey M, Ramasamy P. Sample preparation for scanning electron microscopy – life sciences. INTECH: Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences. 2016, Chapter 8.
16. White JG. The morphology of platelet function. In: Harker, LA.; Zimmerman, TS., editors. Methods in Hematology, series 8I; measurements of platelet function. Churchill-Livingstone; New York: 1983. p. 1–25.
17. Fiedler SA, Boller K, Junker A-Ch, Kamp Ch, Hilger A, Schwarz W, et al. Evaluation of the *in vitro* function of platelet concentrates from pooled buffy coats or apheresis. Transfus Med Hemother. 2020;47:314–324.
18. Vyhláška MZ ČR 143/2008 Sb. O stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (vyhláška o lidské krvi) ve znění pozdějších předpisů.
19. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 22nd edition, Strasbourg, Council of Europe, 2025.

PODÍL AUTORŮ NA PŘÍPRAVĚ RUKOPISU

Š. J. – příprava studie, organizace odběru vzorků, příprava vzorků, hodnocení morfologie, napsání rukopisu
V. J. – příprava studie, příprava vzorků, mikroskopie, zajištění fotodokumentace, připomínkování rukopisu
B. H., P. M., C. A. – zajištění vyšetření vzorků
T. S. – statistické zpracování výsledků
R. P. – návrh studie, připomínkování rukopisu, konečná kontrola rukopisu

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují panu přednostovi MUDr. Milošovi Bohoňkovi, Ph.D., Ing. Ludmile Landové, Ph.D. z ÚLMHT ÚVN a pracovníkům mikroskopického

proLékaře.cz | 20.11.2026

pracoviště ÚMCH AV ČR za pomoc s metodikou přípravy vzorků a poskytnutí speciálního materiálu.

Dále poděkování patří laborantkám z transfuzního oddělení, oddělení klinické biochemie a oddělení klinické hematologie KNL, a.s., za zpracování a vyšetření vzorků, a také pracovníkům fakulty přírodovědně-humanitní a pedagogické TUL za zpracování vzorků a jejich nasnímaní skenovacím elektronovým mikroskopem.

GRANTOVÁ PODPORA

Studie byla podpořena Fondem Vědecké rady KNL, a.s., pod číslem VR19031

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Do redakce doručeno dne: 23. 11. 2025.
Přijato po recenzi dne: 19. 2. 2026.

Mgr. Šárka Jakůbková
Transfuzní oddělení
Krajská nemocnice Liberec, a.s.
Baarova 15
460 63 Liberec
e-mail: sarka.jakubkova@nemlib.cz