



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη βιωσιμότητας και λειτουργικότητας αιμοπεταλίων
που προορίζονται για μετάγγιση αποθηκευμένων
σε συνθήκες ψύχους.**

POST GRADUATE THESIS

Viability and functionality of cold stored platelet concentrates.

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Κωνσταντίνος Παλάσκας
Konstantinos Palaskas

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Αναστάσιος Κριεμπάρδης
Anastasios Kriembardis

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2022



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Viability and functionality of cold stored platelet concentrates.

KONSTANTINOS PALASKAS

Registration Number: 18013

kostaspalaskas@yahoo.gr

FIRST SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEMBARDIS

SECOND SUPERVISOR

CHARA GEORGATZAKOU

THIRD SUPERVISOR

EYSTATHIA PAPAGEORGIOU

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: <Γράψτε την ημερομηνία εξέτασης που φαίνεται στο πρόγραμμα>

Ονόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Αναστάσιος Κριεμπάρδης

2^{ος} Εξεταστής Χαρά Γεωργαντζάκου

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Κωνσταντίνος Παλάσκας του Χρήστου, με αριθμό μητρώου 18013 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Κωνσταντίνος Παλάσκας

Ευχαριστίες

Το παρόν πόνημα αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση» του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Θα ήθελα στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη για την πολύτιμη καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Η γνώση, η επιστημονική του επάρκεια, μαζί με τη θετική του διάθεση αποτέλεσαν πολύτιμο οδηγό σε όλη την πορεία την εκπόνησης της εργασίας και πραγματικό φάρο αισιοδοξίας μέσα σε ένα αντίξοο συχνά περιβάλλον αναβολών και ματαιώσεων, λόγω της πανδημίας του SARS-CoV-2.

Ταυτόχρονα ευχαριστώ ολόψυχα τον διδακτορικό υπότροφο του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής κ. Παναγιώτη Δρόσο, χωρίς τη συνεργασία, το ενδιαφέρον και τη συμπαράσταση του οποίου η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να αντιμετωπίσει τα προβλήματα και τις αντιξοότητες, ειδικά της παρούσας υγειονομικής συγκυρίας.

Η καθοριστική συμμετοχή της μεταδιδακτορικής υποτρόφου του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής κ. Χαράς Γεωργαντζάκου, στην ερευνητική διαδικασία και αξιολόγηση της παρούσας εργασίας ήταν θεμελιώδους σημασίας. Για το λόγο αυτό και την ευγνωμονώ πραγματικά και της εύχομαι ακόμη λαμπρότερη ερευνητική και ακαδημαϊκή πρόοδο. Με τις γνώσεις, την εργατικότητα και την ευπροσήγορη συμπεριφορά της αποτελεί πρότυπο για όλους τους φοιτητές της.

Ακόμη ευχαριστώ την καθηγήτρια κυρία Ευσταθία Παπαγεωργίου καθηγήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών και Αντιπρύτανη του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον και την ενασχόληση της με την παρούσα διπλωματική εργασία, ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση», θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για τις πολύτιμες γνώσεις που μας μετέδωσαν, κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του Π.Μ.Σ. αλλά και τη σημαντική διεύρυνση των ενδιαφερόντων μας στο συνεχώς εξελισσόμενο περιβάλλον των βιοϊατρικών επιστημών.

Αφιέρωσεις

Στη Θεοφάνια και το Γιάννη

Περίληψη

Η μετάγγιση αιμοπεταλίων είναι μια σωτήρια διαδικασία για τους θρομβοπενικούς ασθενείς και στις περιπτώσεις ασθενών με σοβαρά τραύματα και μείζονες χειρουργικές επεμβάσεις. Τα προς μετάγγιση αιμοπετάλια συλλέγονται από υγιείς δότες και αποθηκεύονται στους 22°C με 24°C υπό συνεχή, ήπια ανακίνηση, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάκτηση και επιβίωση μετά από τη μετάγγιση. Ωστόσο, η αποθήκευση στη θερμοκρασία δωματίου όχι μόνο αυξάνει τον κίνδυνο μικροβιακής ανάπτυξης σε περίπτωση επιμόλυνσης, αλλά περιορίζει και τη λειτουργικότητα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Εξαιτίας αυτών το όριο χρήσης των αιμοπεταλίων προς μετάγγιση περιορίζεται σε 5-7 ημέρες, προκειμένου να διασφαλιστεί η ανάκτηση, η επιβίωση, αλλά και η θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Το περιορισμένο όμως όριο χρήσης δημιουργεί προβλήματα λήξης των προϊόντων, σπατάλης και ελλείψεων, ειδικά σε απομακρυσμένες περιοχές και σε στρατιωτικές επιχειρήσεις.

Η εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων θα μπορούσε να είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση καθώς στους 4°C η βακτηριακή ανάπτυξη περιορίζεται. Επιπλέον η εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων οδηγεί σε μια σειρά μεταβολών όπως η αλλαγή του σχήματος, η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, οι μεταβολές των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων της μεμβράνης, η αποκοκκίωση κλπ.

Επιπλέον *in vitro* μελέτες αποδεικνύουν ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσιάζουν βελτιωμένη μεταβολική κατάσταση, καλύτερη μιτοχονδριακή λειτουργικότητα, αυξημένη ικανότητα συσσώρευσης και καλύτερη αιμοστατική λειτουργία. Δημιουργούν ακόμη καλύτερης ποιότητας και αυξημένης αντοχής θρόμβους. Εκτός αυτών κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια μειώνουν το χρόνο ροής και περιορίζουν αποτελεσματικότερα την αιμορραγία. Δυστυχώς όμως, όπως είναι από παλαιότερα γνωστό η αποθήκευση των αιμοπεταλίων στο ψυγείο μειώνει το χρόνο ημιζωής τους σε 1-2 ημέρες, σε σύγκριση με τις 4-5 ημέρες των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου.

Καθώς η παρούσα τακτική της αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου αναπτύχθηκε κυρίως για τους ογκολογικούς και αιματολογικούς ασθενείς, η αποθήκευση σε συνθήκες ψύξης μοιάζει μια εξαιρετική εναλλακτική για τη θεραπευτική μετάγγιση όταν απαι-

τείται άμεση αιμόσταση. Σε ασθενείς με ενεργό αιμορραγία η αιμοστατική αποτελεσματικότητα είναι η βασική προτεραιότητα και η επιβίωση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων μοιάζει να έχει δευτερεύουσα σημασία καθώς τα αιμοπετάλια απομακρύνονται ούτως ή άλλως ταχύτατα από την κυκλοφορία κατά τον σχηματισμό του θρόμβου.

Στο μέλλον απαιτείται να προσδιορισθεί, με καλά οργανωμένες κλινικές μελέτες, ο καλύτερος συμβιβασμός ανάκτησης, αιμοστατικής αποτελεσματικότητας και παράτασης του χρόνου φύλαξης για τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε συνθήκες ψύξης, προκειμένου να βρουν τη θέση τους στις τράπεζες αίματος.

Λέξεις κλειδιά: Μετάγγιση αιμοπεταλίων, Αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύχους.

Abstract

Transfusion of platelet concentrates is a lifesaving procedure for thrombocytopenic patients and also for surgical and trauma patients. Platelets for transfusion are currently collected from healthy volunteer donors and stored at 22°C to 24°C with gentle agitation. However, storage at room temperature not only increases the risk of microbial growth, but also compromises functionality and viability. Thus self-life of platelet concentrates is limited up to 5 to 7 days to ensure platelet survival, recovery and therapeutic efficacy. This short shelf life spam causes outdates and wastage of this product, and shortages especially in military operations and rural areas. So alternative storage conditions gain increased research interest.

Cold storage of platelets could ease these problems as bacterial growth at 4°C is very limited. Furthermore cold stored platelets demonstrate in vitro metabolical superiority, better preserved mitochondrial function and platelet aggregation, adhesion and even better hemostatic function. Also clinical studies show decreased bleeding time and reduced bleeding in patients who received cold stored platelets. These findings suggest that cold stored platelets may be more hemostatically active in bleeding patients after transfusion, with simplified storage and transport. Unfortunately, cold storage of platelets is known to reduce platelet circulatory life span to 1 to 2 days compared to an average life span of 4 to 5 days after 22°C storage.

As current standard platelet storage conditions were primarily developed for the hematological and oncological patient, cold platelets may be a viable alternative for therapeutic transfusion for the bleeding patient. In these recipient, platelets are removed rapidly from the circulation as blood clots are formed and hemostatic function is the most important consideration and not the circulating time of the platelets.

In future clinical trials for actively bleeding patients we need to evaluate and compromise recovery, hemostatic efficacy, and storage time prolongation in order to achieve cold stored platelet approval and adaptation in the blood systems.

Key words: platelet transfusion, cold-stored platelets.

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες	vi
Αφιερώσεις	vii
Περίληψη	viii
Abstract	x
Συνομογραφίες	xv
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1	2
Η μετάγγιση αιμοπεταλίων	2
1.1 Αναδρομή στην ιστορία των μεταγγίσεων.....	2
1.2 Τα αιμοπετάλια	3
Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην ανοσία, τη φλεγμονή, και την αυτοανοσία.	8
Ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων.	8
1.3 Μετάγγιση Αιμοπεταλίων	10
Προφυλακτική μετάγγιση αιμοπεταλίων.	11
Θεραπευτική μετάγγιση αιμοπεταλίων.	11
Μετάγγιση αιμοπεταλίων σε λειτουργικές θρομβασθένειες.	12
Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της μεττάγγισης.	12
1.4 Συλλογή αιμοπεταλίων για μετάγγιση	14
Επιλογή του δότη.....	14
Αιμοπεταλιαφαίρεση με τη χρήση κατάλληλου μηχανήματος.	14
Αιμοπετάλια τυχαίου δότη ολικού αίματος (Αιμοπετάλια Ανάκτησης)	14
Μέθοδος Buffy Coat (BC).....	15
Μέθοδος του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος, Platelet Rich Plasma PRP	15
1.5 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά τη συλλογή και την Παρασκευή τους. ...	17
1.6 Αποθήκευση και ειδικοί χειρισμοί των αιμοπεταλίων	18
Λευκαφαίρεση	19
Ακτινοβόληση	19
Μικροβιακή επιμόλυνση των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων.	20
Αδρανοποίηση παθογόνων	22

Μεταφορά αιμοπεταλίων προς μετάγγιση	23
Ειδικά προσθετικά διαλύματα.....	23
Έλεγχος ποιότητας των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων.....	25
Η αποθηκευτική βλάβη	27
1.7 Νέες μέθοδοι αποθήκευσης των αιμοπεταλίων	29
Καταψυγμένα αιμοπετάλια (Cryopreserved Platelets)	29
Αιμοπετάλια εν ψυχρώ (Cold Stored Platelets)	29
Κυκλική επαναθέρμανση εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων	29
Καθυστερημένη ψύξη αιμοπεταλίων	30
1.8 Νεότερες εναλλακτικές μορφές αιμοπεταλίων για μετάγγιση	30
Λυοφιλοποιημένα αιμοπετάλια	31
Συνθετικά αιμοπετάλια.....	31
Παραγωγή αιμοπεταλίων από βλαστοκύτταρα.	31
1.9 Ανεπιθύμητες ενέργειες μετάγγισης αιμοπεταλίων	32
1.10 Τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια στη βιβλιογραφία	32
Κεφάλαιο 2	38
Οι βιολογικές και παθοφυσιολογικές επιδράσεις του ψύχους στα αιμοπετάλια.....	38
2.1 Εισαγωγή στην παθοφυσιολογική επίδραση του ψύχους.....	38
2.2 Μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση του ψύχους.....	38
2.3 Ψύχος και ενδοκυττάριο ασβέστιο των αιμοπεταλίων.	41
2.4 Επίδραση του ψύχους στο μεταβολισμό και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων... 42	42
2.5 Επίδραση του ψύχους στις γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης.....	43
2.6 Ψύχος και μηχανισμοί απομάκρυνσης των αιμοπεταλίων από τον οργανισμό.. 43	43
2.7 Συμπεράσματα	45
Κεφάλαιο 3.	47
Μελέτες των in vitro χαρακτηριστικών των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων.	47
3.1 Εισαγωγή.....	47
3.2 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά	47
3.3 Φυσικά χαρακτηριστικά	48
Αριθμός αιμοπεταλίων.....	48
Η αντίδραση στο υποτονικού σοκ (HSR)	51
Μορφολογικά χαρακτηριστικά	51
3.4 Δείκτες μεταβολισμού των αιμοπεταλίων.....	54

3.5 Δείκτες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.....	56
Απελευθέρωση μικροσωματιδίων	56
Αποκοκκίωση αιμοπεταλίων	57
Ενεργοποίηση ιντεγκρίνης αIIbβ3 των αιμοπεταλίων	59
3.6 Δείκτες απόπτωσης των αιμοπεταλίων	63
Ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης,	65
Ενεργοποίηση της κασπάσης 3, 7	66
Έκθεση της φωφατιδυλοσερίνης.....	67
3.7 Αιμοπεταλιακές Λειτουργικές δοκιμασίες.....	69
Συσσωματομετρία	69
Θρομβοελαστογραφία(TEG)-Θρομβοελαστομετρία (TEM).....	71
3.8 Η δομή του θρόμβου	75
3.9 Απελευθέρωση προφλεγμονωδών μεσολαβητών.....	79
3.10 Μελέτες “-omics”	80
Metabolomics	82
Proteomics	85
Transcriptomics.....	86
Κεφάλαιο 4	88
Μελέτες σε ανθρώπους των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων.	88
4.1 Η επίδραση της εν ψυχρώ αποθήκευσης στην ανάκτηση και την επιβίωση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων	88
4.2 Επίδραση της εν ψυχρώ αποθήκευσης στη λειτουργικότητα των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων.	94
4.3 Κλινικές μελέτες.....	98
4.4 Μελέτες της επίδρασης του ψύχους σε μεταγγιζόμενα αιμοπετάλια σε πειραματόζωα.	99
4.5 Βασικά συμπεράσματα και προβληματισμοί από τις in vivo μελέτες των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων προς μετάγγιση.	100
Κεφάλαιο 5.	102
Θέματα προς διευκρίνιση.	102
5.1 Αιμοπετάλια για αιμορραγία ή προφύλαξη.....	102
5.2 Αιμοπετάλια σε πλάσμα ή Προσθετικό Διάλυμα Αιμοπεταλίων (PAS).	103
5.3 Ειδικά κρυσταλλικά διαλύματα.....	105
5.4 Εν ψυχρώ αποθήκευση και αδρανοποίηση παθογόνων.....	106

5.5 Εν ψυχρώ αποθήκευση με ανακίνηση ή όχι.....	107
5.6 Κυκλική αναθέρμανση	108
5.7 Καθυστερημένη ψύξη	109
Κεφάλαιο 6	115
Συζήτηση συμπεράσματα	115
6.1 Η βακτηριακή ανάπτυξη και οι επιπτώσεις της.....	117
6.2 Οικονομοτεχνικές παράμετροι της εν ψυχρώ αποθήκευσης.....	118
6.3 Η ανάκτηση και επιβίωση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων.....	119
6.4 Η επίδραση του ψύχους στα χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων.....	121
6.5 In vitro αιμοστατική αποτελεσματικότητα.....	123
6.6 In vivo αιμοστατική αποτελεσματικότητα.....	124
6.7 Κλινικά ευρήματα αποτελεσματικότητας.....	124
6.8 Συμπεράσματα Προτάσεις.....	125
Πηγές Εικόνων	146

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
APC(s)	apheresis platelet concentrate(s)	Αιμοπετάλια αφαιρέσεως
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφοσφωρική αδενοσίνη
CSPs	cold-stored platelets	Αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύχους
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FWB	Fresh whole blood	Φρέσκο ολικό αίμα
HLA	Human leukocyte antigen	Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα
HPA	Human platelet antigens	Ανθρώπινα αντιγόνα αιμοπεταλίων
MPs	Microparticles	Μικροσωματίδια
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
PAS	Platelet Additive Solutions	Προσθετικό διάλυμα αιμοπεταλίων
PAS(s)	platelet additive solution(s)	Προσθετικό διάλυμα αιμοπεταλίων
PC(s)	platelet concentrate(s)	Συμπυκνωμένα αιμοπετάλια
PCR	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PLTs	platelets	Αιμοπετάλια
PPC(s)	pooled buffy-coat platelet concentrate(s)	Δεξαμενοποιημένα αιμοπετάλια ενδιάμεσης στιβάδας
PRP	Platelet-Rich Plasma	Πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα
PSL	Platelet Storage Lesion	Αποθηκευτική βλάβη αιμοπεταλίων
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
ROTEM	Rotational thromboelastometry	Περιστροφική Θρομβοελαστομετρία
RSPs	room temperature–stored platelets	Αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου
TC	thermocycling	Κυκλική αναθέρμανση
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Πρόλογος

Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύξης δεν είναι μια νέα ανακάλυψη. Αρχικά και μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1970 τα αιμοπετάλια αποθηκεύονταν με τη μορφή του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος στο ψυγείο προκειμένου να χορηγηθούν μετά από λίγες ώρες ή ημέρες σε αιματολογικούς ασθενείς με σοβαρή θρομβοπενία. Όταν όμως ανακαλύφθηκε ότι η εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων οδηγεί σε ταχεία απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία η τακτική αυτή εγκαταλείφθηκε. Έτσι σήμερα τα αιμοπετάλια προς μετάγγιση αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου 22°C -24°C.

Τις συνθήκες λοιπόν που επικρατούν σήμερα για τη συλλογή και φύλαξη των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων θα περιγράψουμε αρχικά με σκοπό να αναδείξουμε τα προβλήματα που ανακύπτουν αλλά και τις εναλλακτικές που κατά καιρούς έχουν προταθεί και εφαρμοστεί.

Κατόπιν θα προσπαθήσουμε να περιγράψουμε την επίδραση του ψύχους στα αιμοπετάλια που προορίζονται για μετάγγιση και να αναδείξουμε στοιχεία της έρευνας που αφορούν τις παθοφυσιολογικές μεταβολές αλλά και τα *in vitro* ευρήματα και πως αυτά συσχετίζονται με τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Θα περιγράψουμε ακόμη κάποιες *in vivo* έρευνες αλλά και κλινικές δοκιμές που προσπάθησαν να φωτίσουν την αξία της μετάγγισης αιμοπεταλίων μετά από την αποθήκευσή τους σε συνθήκες ψύξης.

Μέσα από αυτή τη μελέτη έγινε προσπάθεια να αναδειχθούν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της εν ψυχρώ αποθήκευσης των αιμοπεταλίων, αλλά και να αναδειχθούν εναλλακτικές που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του προϊόντος, αλλά και να αποτελέσουν έναυσμα για περαιτέρω μελέτη, προβληματισμό και έρευνα σε ένα συναρπαστικό αντικείμενο της σύγχρονης αιμοδοσίας.

Κεφάλαιο 1

Η μετάγγιση αιμοπεταλίων

1.1 Αναδρομή στην ιστορία των μεταγγίσεων

Η μετάγγιση αίματος και των παραγώγων του αποτελεί, στη σύγχρονη ιατρική, μια αρκετά συνηθισμένη αλλά ταυτόχρονα σωτήρια θεραπευτική διαδικασία.

Στα βάθη των αιώνων για όλους σχεδόν τους πολιτισμούς το αίμα θεωρούνταν σημαντικό ζωτικό στοιχείο του σώματος αλλά και συστατικό με πολύτιμες αναγεννητικές και συχνά μαγικές ιδιότητες. Τα χαρακτηριστικά αυτά εύκολα εντοπίζονται στους θρύλους, τις παραδόσεις και τα κείμενα πολλών αρχαίων λαών. Στην Οδύσσεια ο Οδυσσεύς «αναγεννά» τον νεκρό Τειρεσία προσφέροντάς του αίμα από αρνιά, προκειμένου να λάβει χρησμό. (Όμηρος, ραψωδία λ')

Όμηρου Όδύσσεια Ραψωδία λ' - Νέκυια.

έλλισάμην, τὰ δὲ μῆλα λαβὼν ἀπεδειροτόμησα ἔς βόθρον, ῥέε δ' αἷμα κελαινεφές· αἰ δ' ἀγέροντο ψυχαὶ ὑπὲξ Ἐρέβευς νεκῶν κατατεθνηῶτων.	35	35	πήρα τ' αρνιά και τα 'σφαξα στο λάκκο· και το αίμα έτρεχε ολόμαυρο. Ἄρχισαν τῶν πεθαμένων τότες και μαζεούνταν οι ψυχές απ' το Ἐρεβος το μαύρο,
"ἦλθε δ' ἐπὶ ψυχὴ Θηβαίου Τειρεσίαο χρῦσεον σκῆπτρον ἔχων, ἐμὲ δ' ἔγνω καὶ προσέειπεν· 'διογενὲς Λαερτιάδη, πολυμήχαν' Ὀδυσσεῦ, τίπτ' αὐτ', ὃ δύστηνε, λιπὼν φάος ἡελίοιο ἦλυθες, ὄφρα ἴδη νέκυας καὶ ἀτερπέα χῶρον; ἀλλ' ἀποχάζεο βόθρου, ἄπισχε δὲ φάσγανον ὄξύ, αἵματος ὄφρα πῖω καὶ τοι νημερτέα εἶπω.'	90	90	Και του Θηβαίου ἦρθε σιμὰ ἡ ψυχὴ του Τειρεσία, και κράταε το χρυσὸ ραβδί· με γνόρισε, και μου 'πε· «Διογέννητε του Λαέρτη γιέ, πολύτεχνε Οδυσσεά, τι αφήκες, ὦ κακόμοιρε, το φως του ἡλίου κι ἦρθες να δης νεκρούς κι αὐτὸν ἐδώ, τον ἄχαρο τον κόσμον ; Φεύγα απ' το λάκκο, μέριασε το κοφτερό σπαθί σου, αἷμα να πῖω, και να σου πῶ κατόπι την ἀλήθεια.»
	95	95	

Φυσικά η ιστορία των μεταγγίσεων στη σύγχρονη δυτική ιατρική απέχει πολύ από τις δοξασίες και τις δυσειδαιμωνίες άλλων εποχών. Οι έρευνες του William Harvey (1578-1657) για τη φυσιολογία του κυκλοφορικού συστήματος και του Christopher Wren για την ενδοφλέβια χορήγηση ουσιών, αποτέλεσαν τους ακρογωνιαίους λίθους για τις μετέπειτα έρευνες στον τομέα των μεταγγίσεων. Λίγο μετά από αυτούς, το 1666, ο Άγγλος ιατρός

Richard Lower (1631-1703) πραγματοποιεί την πρώτη μετάγγιση αίματος μεταξύ δυο σκύλων. Το 1667 ο Γάλλος ιατρός Jean Baptist Denis μεταγγίζει αίμα από πρόβατο σε νεαρό άνδρα και αυτός επιζεί! Ο θάνατος όμως του τρίτου του ασθενούς που υποβλήθηκε σε τέτοια μετάγγιση, οδηγεί τον Denis στο δικαστήριο και τις μεταγγίσεις στην ανυποληψία. (Learoyd, 2012)

Θα περάσουν πολλά χρόνια μέχρι το 1828, οπότε και ο μαιευτήρας James Blundell (1790-1838) θα πραγματοποιήσει επιτυχημένη μετάγγιση αίματος από άνδρα σε λεχωίδα, για την αντιμετώπιση της αιμορραγίας που απειλούσε τη ζωή της. (Giangrande, 2000) Η αναγνώριση των ομάδων αίματος του συστήματος ABO από τον Karl Landsteiner το 1900 εγκαινιάζει τη νέα εποχή στην ιστορία της μετάγγισης αίματος. (Ellis, 2018) Στην εποχή αυτή πραγματοποιούνται σημαντικά βήματα, με την αναγνώριση και άλλων αντιγονικών συστημάτων, τη χρήση αντιπηκτικών και συντήρησης σε συνθήκες ψύχους, την κλασματοποίηση και την παραγωγή προϊόντων αίματος.

Φυσικά οι δύο παγκόσμιοι πόλεμοι έδωσαν στην Αιμοδοσία σημαντική ώθηση και βοήθησαν πολύ στη διαμόρφωση των διαδικασιών και των τεχνικών απαιτήσεων για τη μετάγγιση αίματος και προϊόντων του. Φτάνουμε έτσι σήμερα στη σύγχρονη Αιμοδοσία που συγκεντρώνει, παράγει και διανέμει προϊόντα και παράγωγα αίματος με ασφάλεια και ακρίβεια, παρέχοντας το κατάλληλο προϊόν στον ασθενή που το έχει ανάγκη την κατάλληλη στιγμή. (Grindon, 2009)

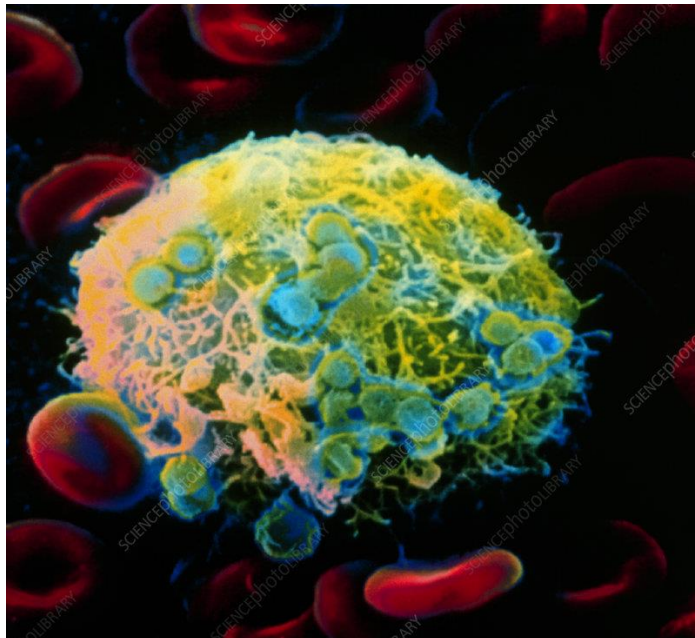
1.2 Τα αιμοπετάλια

Το αίμα είναι υγρός ιστός του σώματος που κυκλοφορεί στο αγγειακό δίκτυο (αρτηριακό και φλεβικό) και επιτελεί σημαντικές λειτουργίες όπως η μεταφορά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα, θρεπτικών ουσιών και συμμετέχει στην άμυνα, την επικοινωνία μεταξύ ιστών και οργάνων, τη ρύθμιση της θερμοκρασίας και άλλες λειτουργίες. Το αίμα αποτελείται από το υγρό του συστατικό, το πλάσμα και τα έμμορφα στοιχεία, ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια.

Τα αιμοπετάλια είναι τα μικρότερα κύτταρα του αίματος. Ο Max Schultze ήταν ο πρώτος που περιέγραψε με ακρίβεια τα αιμοπετάλια σε μελέτη του που αφορούσε κυρίως

τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος. (Brewer, 2006) Το 1882 όμως ο Gulio Bizzozero επιβεβαιώνει την παρουσία των αιμοπεταλίων. Ταυτόχρονα με καλά οργανωμένα πειράματα *in vitro* και *in vivo* αναγνωρίζει τον ρόλο τους στην πήξη του αίματος. Παρατηρώντας μικροσκοπικά, την κυκλοφορία του αίματος ζώων διαπιστώνει ότι τα αιμοπετάλια είναι τα πρώτα που συγκεντρώνονται στην περιοχή βλάβης του αγγείου όπου συσσωρεύονται και συμμετέχουν στο σχηματισμό του θρόμβου. (Ribatti & Crivellato, 2007)

Τα αιμοπετάλια είναι απύρνα «κύτταρα». Στην πραγματικότητα αποτελούν θραύσματα που αποσπώνται από τα μεγακαρυοκύτταρα. Το 1906 ο James Homer Wright διαπίστωσε ότι τα αιμοπετάλια παράγονται από τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού. Ήταν ακόμη τότε εποχή που τα αιμοπετάλια θεωρούνταν η «σκόνη» του αίματος. (Kaushansky, 2008) Η παραγωγή τους είναι μια περίπλοκη και αυστηρά καθοριζόμενη διαδικασία που συντελείται κατ' εξοχήν στο μυελό των οστών στα ενήλικα άτομα. Περιλαμβάνει τη δέσμευση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Στη διαδικασία αυτή το μικροπεριβάλλον του μυελού και η δράση κυτταροκινών, με σημαντικότερη τη θρομβοποιητίνη, παίζουν καθοριστικό ρόλο. (Machlus & Italiano, 2019) (Kaushansky, 2008)



Εικόνα 1

Εικόνα 2 Μεγακαρυοκύτταρο. Έγχρωμη ηλεκτρονική μικροφωτογραφία σάρωσης (SEM) μεγακαρυοκυττάρου από ανθρώπινο μυελό των οστών. Τα αναπτυσσόμενα αιμοπετάλια εμφανίζονται με σχήμα δίσκου στην επιφάνεια του γιγαντιαίου κυττάρου. Γύρω από το μεγακαρυοκύτταρο υπάρχουν πολλά ερυθρά αιμοσφαίρια. Science Photo Library (SPL) 327-329

Τα μεγακαρυοκύτταρα σχηματίζονται με τη διαδικασία της ενδομίτωσης. Κατά τη διάρκεια της πραγματοποιούνται αλληπάλληλοι αναδιπλασιασμοί του γενετικού υλικού, που όμως δεν ακολουθούνται από κυτταρική διαίρεση. Έτσι δημιουργείται ένα πολυπλοειδικό κύτταρο, το προμεγακαρυοκύτταρο. Θα ακολουθήσουν μια σειρά από μεταβολές του κυτταροπλάσματος και της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ σχηματίζονται και τα κοκκία. Στη συνέχεια το κυτταρόπλασμα του μεγακαρυοκυττάρου υφίσταται ολοκληρωτικό μετασχηματισμό που ολοκληρώνεται με την προβολή πολλαπλών κυτταρικών προσεκβολών που αποτελούν τα προαιμοπετάλια. (Deutch & Tomer, 2006) Από ένα μεγακαρυοκύτταρο παράγονται 5000-10000 αιμοπετάλια. Καθημερινά παράγονται 10^{11} αιμοπετάλια σε σταθερή κατάσταση. Ο αριθμός αυτός μπορεί να 20πλασιαστεί σε περίπτωση ανάγκης.

Τα αιμοπετάλια έχουν δισκοειδές σχήμα, κυκλικό ή ωοειδές και μέγεθος 2-4 μm. Διατηρούν το σχήμα χάρη στον κυτταροσκελετό τους που αποτελείται κυρίως από ακτίνη, τουμπουλίνη (που σχηματίζει το περιφερειακό δίκτυο μικροσωληνίσκων) και ένα υπομεμβρανικό δίκτυο σπεκτρίνης. Τα 2/3 του συνολικού αριθμού των αιμοπεταλίων κυκλοφορούν με το αίμα. Εκεί ο αριθμός των αιμοπεταλίων κυμαίνεται φυσιολογικά από 150.000 έως 450.000 ανά mL. Ταυτόχρονα το υπόλοιπο 1/3 βρίσκεται «αποθηκευμένο» στο σπλήνα. (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014) Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μικρό χρόνο ζωής στην κυκλοφορία, περίπου 8-10 ημέρες. (Leeksa & Cohen, 1956)

Απομακρύνονται κυρίως από τα μακροφάγα του σπλήνα αλλά και του ήπατος. (van der Meijden & Heemskerk, 2019) Στα αιμοπετάλια λειτουργεί η ενδογενής αποπτωτική διαδικασία που σχετίζεται με τις πρωτεΐνες της οικογένειας BCL2 (Bcl-XL και Bak) και την κινητοποίηση της οδού των κασπασών. (Mason, et al., 2007), (McArthur, et al., 2018) Ένας άλλος ενδιαφέρον μηχανισμός απομάκρυνσης των αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία σχετίζεται με την απώλεια σιαλικού οξέος από τους γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων. Η απώλεια αυτή προάγεται με τη δράση ειδικής σιαλιδάσης σε καταστάσεις όπως η σήψη αλλά και κατά την έκθεση των αιμοπεταλίων στο ψύχος. Τα εν λόγω αιμοπετάλια απομακρύνονται από τα ηπατοκύτταρα δια του υποδοχέα Ashwell-Morell. Η διεργασία αυτή οδηγεί, δια της ενεργοποίησης του JAK2/STAT3 μονοπατιού στην παραγωγή Θρομβοποιητίνης (TPO). (Hoffmeister & Falet, 2016)

Λόγω του μικρού τους κυρίως μεγέθους, στις συνήθεις συνθήκες νηματοειδούς ροής μέσα στα αγγεία, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν κοντά στο τοίχωμα. Έτσι έχουν τη

δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με το τοίχωμα ταχύτερα και πιο αποτελεσματικά. Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν στην ανενεργό μορφή τους και απομακρύνονται από την κυκλοφορία συνήθως όταν «γεράσουν». Αν όμως έρθουν σε επαφή με βλάβη του αγγειακού επιθηλίου ή εκτεθούν σε κατάλληλους αγωνιστές τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται. (Sempfle, et al., 2011)

Η βλάβη του ενδοθηλίου αποκαλύπτει υπενδοθηλιακά συστατικά όπως τον παράγοντα von Willebrand (VWF), κολλαγόνο, ινοδωγόνο, φμπρονεκτίνη. Η αρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο υπενδοθήλιο διαμεσολαβείται από γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς (GPs) στην επιφάνειά του, όπως GPVI and GPIIb. Η σύνδεση αυτή πυροδοτεί μια σειρά από ενδοκυτταρικές διεργασίες που οδηγούν στην ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Οδηγεί ακόμη στην έκκριση διαλυτών αγωνιστών όπως το ADP, η σεροτονίνη και προάγει τη σύνθεση θρομβοξάνης A₂. Με τον τρόπο αυτό κινητοποιείται το ενδοκυττάριο ασβέστιο που δρώντας στο κυτταροσκελετό οδηγεί στη δραματική αλλαγή σχήματος του αιμοπεταλίου αλλά και την αποκοκκίωση του. Η συνδυαστική ικανότητα της αIIbβ3 ιντεγκρίνης πολλαπλασιάζεται και συνδέει πλέον ισχυρά το ινοδωγόνο συμβάλλοντας στην συγκόλληση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό του θρόμβου.

Με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αποκαλύπτεται ο δυναμικός ρόλος τους μέσα από μια σειρά πολύπλοκων μηχανισμών. Αποδεικνύεται τότε πώς όλα τα δομικά τους συστατικά έχουν προγραμματιστεί για να εξυπηρετήσουν αυτόν ακριβώς το σκοπό, της ενεργοποίησης. Ο κυτταροσκελετός του αιμοπεταλίου με την αλληλεπίδραση ακτίνης και μυοσίνης συντελεί στη δραματική αλλαγή του σχήματος του αιμοπεταλίου και στη συστολή του θρόμβου. Τα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων εκκρίνουν ουσίες με αιμοστατική δράση κατεχολαμίνες, σεροτονίνη και κυρίως ADP και ασβέστιο και έτσι ενισχύουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και ενεργοποιούν το μηχανισμό της πήξης. Τα α κοκκία εκκρίνουν μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων όπως τον παράγοντα von Willebrand, Platelet Factor 4, GPIIbIIIa, P-selectin (CD62P), και CD36 που παράγονται κατά την ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων, αλλά και συστατικά όπως το ινοδωγόνο, η αλβουμίνη, IgG που προσλαμβάνει το αιμοπετάλιο από το πλάσμα κατά την κυκλοφορία του. Γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς της μεμβράνης διαμεσολαβούν στην προσκόλληση στους υπενδοθηλιακούς ιστούς και τη συνακόλουθη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων για το σχηματισμό του πρωτογενούς θρόμβου (βύσματος):

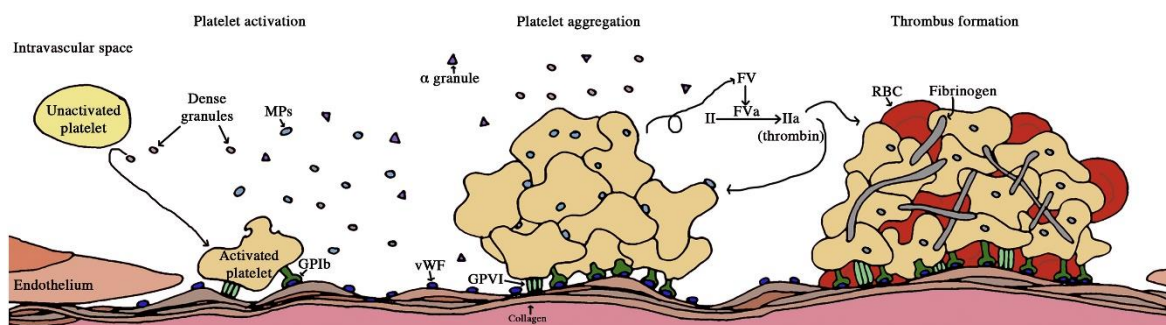
Ib-V-IX υποδοχείς για τον παράγοντα von Willebrand

Ia-IIa υποδοχείς για το κολλαγόνο.

IIb-IIIa τροποποιούνται κατά την ενεργοποίηση για να συνδεθούν με το ινωδογόνο.

Το ανοικτό καναλλοειδές δίκτυο (open canalicular system) (OCS) που διαπερνά το σώμα του αιμοπεταλίου δημιουργεί επαρκή μεμβρανική επιφάνεια τόσο για την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον όσο και για τη δραματική αλλαγή του σχήματος του αιμοπεταλίου. Η ίδια η μεμβράνη του αιμοπεταλίου υφίσταται κατά την ενεργοποίηση σημαντικό μετασχηματισμό. Κατά την ηρεμία στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση φωσφατιδυλοσερίνης και φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλης. Μετά όμως την ενεργοποίηση τα αμινοφωσφολιπίδια αυτά μεταφέρονται στην εξωτερική στοιβάδα με τη δράση κατάλληλων ενζύμων (φλοππάσες, σκραμπλάσες) προκειμένου να ξεκινήσει ο καταρράκτης της πήξης. (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014)

Η κύρια λοιπόν λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι ο σχηματισμός θρόμβου με σκοπό τη διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού δικτύου. Η καταστροφή του αγγείου έχει σαν αποτέλεσμα την αποκάλυψη των υπενδοθηλιακών ιστών. Στην περιοχή αυτή προσκολλώνται αιμοπετάλια. Αυτά ενεργοποιούνται, αλλάζουν σχήμα, εκκρίνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους και προσκολλώνται μεταξύ τους σχηματίζοντας το λευκό, αιμοπεταλιακό, πρωτογενή θρόμβο ενώ πυροδοτούν και τον καταρράκτη της πήξης.



Εικόνα 3 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στο σχηματισμό θρόμβων. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται κατά την επαφή με υποενδοθηλιακές πρωτεΐνες (κολλαγόνο, vWF) για να εκφράσουν το CD62P και να απελευθερώσουν μικροσωματίδια, περιεχόμενο των α-κοκκίων και των πυκνών κοκκίων. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συσσωματώνονται ως απόκριση στο κολλαγόνο, την επινεφρίνη, το ADP, τη θρομβίνη, το ινωδογόνο, το vWF, τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και την πρωτεΐνη-6 που ενεργοποιεί τον υποδοχέα θρομβίνης. Μικροσωματίδια, ιστικός παράγοντας και FVa που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια ενισχύουν τη δημιουργία θρομβίνης για να παρέχουν θετική ανάδραση για τη δημιουργία θρόμβου. (Ng, et al., 2018)

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην ανοσία, τη φλεγμονή, και την αυτοανοσία.

Είδαμε μέχρι τώρα, σε πολύ αδρές γραμμές τον μείζονα ρόλο των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση και τη θρόμβωση. Τις τελευταίες όμως δεκαετίες, με αλληπάλληλες έρευνες, αποδεικνύονται και άλλοι σημαντικοί ρόλοι για τα μικροσκοπικά αυτά κύτταρα, συνδέοντας τα αιμοπετάλια με διάφορες βιολογικές αποκρίσεις και καταστάσεις.

Τα αιμοπετάλια αποτελούν μετά τα ερυθρά αιμοσφαίρια τα πολυπληθέστερα κύτταρα του αίματος. Η στενή τους σχέση με το αγγειακό ενδοθήλιο και η ικανότητά τους να αναγνωρίζουν τη βλάβη του τα καθιστά σημαντικούς «φρουρούς» για κάθε πιθανή βλάβη και εισβολή. Τα αιμοπετάλια στις περιπτώσεις αυτές, έχει αποδειχθεί ότι κινητοποιούν άλλα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος με μια σειρά ουσιών που εκκρίνουν κατά την ενεργοποίησή τους. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική και επίκτητη ανοσία χάρη στις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Παίζουν ρόλο στην αναγνώριση και επιτήρηση «εισβολέων». Με την αλληλεπίδραση και επικοινωνία με άλλα κύτταρα (πολυμορφοπύρηνα, λεμφοκύτταρα) πυροδοτούν την ανταπόκρισή τους και συμβάλλουν στην φλεγμονώδη και ανοσολογική απόκριση και ενορχηστρώνουν τη συνολική απόκριση του αμυντικού συστήματος. (Vieira-de-Abreu, et al., 2012)

Εν κατακλείδι τα αιμοπετάλια έχει διαπιστωθεί ότι εκτός από τον καθοριστικό ρόλο που παίζουν στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, σχετίζονται και με πολλαπλές άλλες διεργασίες τόσο στην υγεία όσο και στη νόσο. Τέτοιες είναι η ανοσολογική απόκριση και η φλεγμονή, η δημιουργία θρομβίνης, η επούλωση των τραυμάτων, η αθηροσκλήρωση, η αγγειογένεση, η επαναστένωση των αγγείων, η σήψη, η οξεία βλάβη των πνευμόνων, η ανάπτυξη των όγκων και η μετάστασή τους. (McFadyen & Kaplan, 2015) (Leytin, 2012)

Ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων.

Όπως ήδη αναφέραμε, τα αιμοπετάλια είναι θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων και όχι «πραγματικά κύτταρα». Παρόλα αυτά όμως η έρευνα των τελευταίων χρόνων έχει αποδείξει ότι διαθέτουν πολύ ενδιαφέροντα έως και εντυπωσιακά χαρακτηριστικά που δεν θα αναμένονταν από απύρηνα κύτταρα όπως αυτά. (Leytin, 2012)

de novo πρωτεϊνοσύνθεση.

Τα αιμοπετάλια, αν και απύρηνα κύτταρα, έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανά για πρωτεϊνοσύνθεση, και μάλιστα σε απόκριση σε κατάλληλα ερεθίσματα. Οι πρωτεΐνες που παράγο-

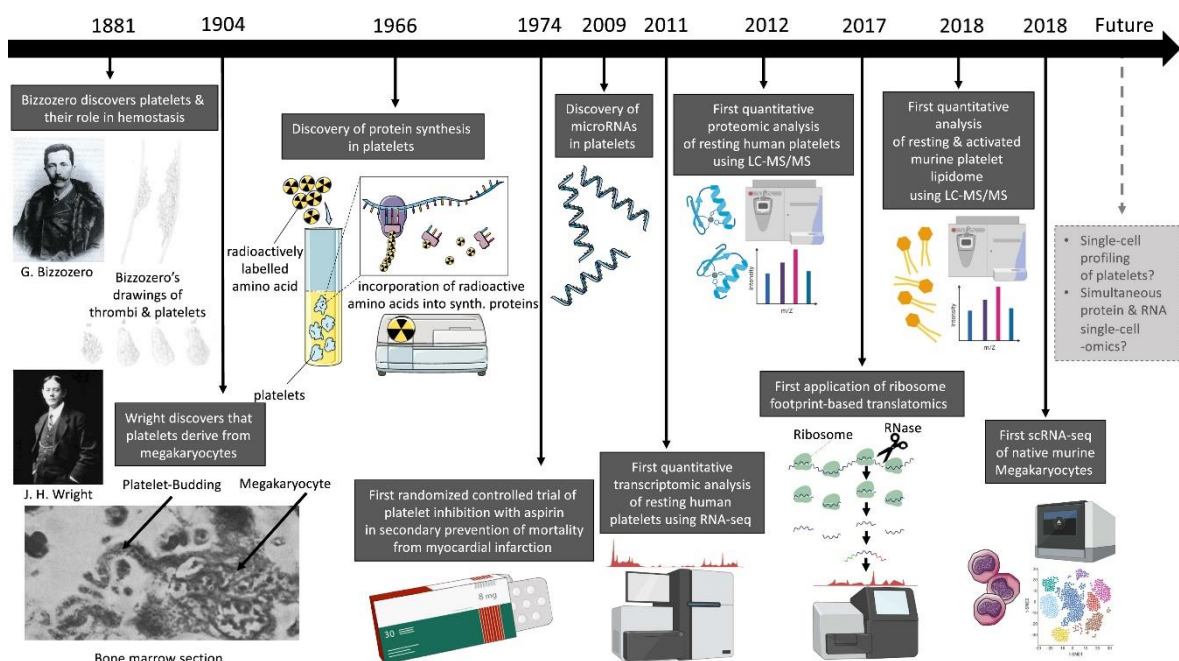
νται είναι: πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (ακτίνη), γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς της επιφάνειας, ινωδογόνο και παράγοντας von Willebrand, παράγοντες πήξης (XIIIa), πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αιμόσταση και τη φλεγμονή (ιντερλευκίνη-1β και ιστικός παράγοντας), πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 κλπ. (Leytin, 2012)

Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και έχει σχετιστεί σχεδόν αποκλειστικά με τα εμπύρνηνα κύτταρα. Παρόλα αυτά στα αιμοπετάλια αν και δεν διαθετούν πυρήνα αποδείχθηκε ότι παράγοντες όπως η γήρανση, οι διατμητικές τάσεις, χημικές ουσίες επάγουν την απόπτωση. (Leytin, 2012)

Κυτταρική διαίρεση

Η ανακάλυψη ότι τα αιμοπετάλια μπορούν να διαιρεθούν και να σχηματίσουν απογόνους είναι μάλλον λογικά αναπάντεχη. Παρόλα αυτά τα νεοσηματισθέντα αιμοπετάλια εμφανίζουν φυσιολογική μορφολογία και λειτουργικότητα.



Εικόνα 4 Επιστημονικές και τεχνολογικές ανακαλύψεις στην έρευνα των αιμοπεταλίων. (Gutmann, et al., 2020)

1.3 Μετάγγιση Αιμοπεταλίων

Είδαμε μέχρι τώρα, πολύ συνοπτικά, τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα αιμοπετάλια στην αιμόσταση και τη διατήρηση της ακεραιότητας των αγγείων. Είναι λογικό συμπέρασμα ότι ασθενείς με χαμηλούς αριθμούς αιμοπεταλίων στο αίμα τους βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας, είτε αυτόματης είτε μετά από τραυματισμό. Η συσχέτιση αυτή δεν ήταν πάντα προφανής, ειδικά δε κατά τη δεκαετία του 50, καθώς υπήρχαν πειραματικά δεδομένα σε ζώα που δεν επιβεβαίωναν μια τέτοια συσχέτιση. (Freireich, 2011)

Πρώτος ο William Duke το 1910, περιέγραψε τρεις περιπτώσεις θρομβοπενικών ασθενών, των οποίων σταμάτησε η σοβαρή αιμορραγία μετά από μετάγγιση φρέσκου ολικού αίματος, και την συνακόλουθη βελτίωση των τιμών των αιμοπεταλίων στο αίμα τους. (Duke, 1910) Χρειάστηκε όμως να περάσουν 50 χρόνια για να επιβεβαιωθεί ο σημαντικός ρόλος της θρομβοπενίας στις αιμορραγικές εκδηλώσεις νόσων όπως η οξεία λευχαιμία και να γίνουν οι πρώτες απόπειρες αντιμετώπισής της. Στην αρχή χρησιμοποιήθηκε η μετάγγιση φρέσκου ολικού αίματος και λίγο αργότερα η επιλεκτική μετάγγιση αιμοπεταλίων.

Έτσι την περίοδο αυτή αλλάζουν δραματικά τα δεδομένα στην αντιμετώπιση και θεραπεία νόσων όπως η οξεία λευχαιμία και οι επιπλοκές της. Μέχρι τότε οι λοιμώξεις και η αιμορραγία ήταν οι κύριες αιτίες θανάτου σε αυτούς του ασθενείς. Με την εφαρμογή όμως των μεταγγίσεων των αιμοπεταλίων τα δεδομένα αυτά αλλάζουν, παρατείνεται η ζωή αυτών των ασθενών και κερδίζεται πολύτιμος χρόνος για την εφαρμογή νέων αντινεοπλασματικών θεραπειών. (Tiberghien, et al., 2016)

Από την άλλη πλευρά νέα ώθηση στη μετάγγιση αιμοπεταλίων έδωσαν έρευνες που επιβεβαίωσαν τη μεγάλη αξία τους στην αντιμετώπιση του σοβαρού τραύματος και στην πορεία μεγάλων χειρουργικών επεμβάσεων. (Pidcoke, et al., 2012) (Inaba, et al., 2010) Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 2010 ο βαρέως πάσχων ασθενής με μαζική απώλεια αίματος αντιμετωπιζόταν με μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών και φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος σε αναλογία 1:1. Ο ρόλος της μετάγγισης αιμοπεταλίων σε αυτούς τους ασθενείς ήταν λιγότερο σαφής. Ωστόσο διάφορες μελέτες σύντομα απέδειξαν ότι σε ασθενείς που χρειάζονταν μαζική μετάγγιση, η αύξηση της αναλογίας συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων προς συμπυκνωμένα ερυθρά σχετίζονταν με βελτιωμένη επιβίωση. (Inaba, et al., 2010) (Perkins, et al., 2009)

Έκτοτε, η πρόοδος στη μετάγγιση των αιμοπεταλίων είναι σημαντική καθώς εφαρμόζονται νέες μέθοδοι διαχωρισμού, χρησιμοποιούνται κατάλληλες συνθήκες και υλικά αποθήκευσης, εφαρμόζονται νέες τεχνικές αδρανοποίησης κλπ.

Η μετάγγιση αιμοπεταλίων εφαρμόζεται σήμερα είτε θεραπευτικά, προκειμένου να διακοπεί η αιμορραγία, είτε προφυλακτικά προκειμένου να μην προκύψει αιμορραγικό επεισόδιο. (Ανοη., 2010)

Προφυλακτική μετάγγιση αιμοπεταλίων.

Ασθενείς με οξεία λευχαιμία, μεταμόσχευση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων ή μυελική απλασία μετά από εντατική χημειοθεραπεία, παρουσιάζουν συχνά σοβαρή θρομβοπενία και διαφόρων βαθμών αιμορραγικές εκδηλώσεις.

Στις περιπτώσεις αυτές είναι κρίσιμη η αποφυγή σοβαρής αιμορραγίας όπως πχ αιμορραγία του ΚΝΣ. Έτσι σε τιμές αιμοπεταλίων κάτω από 10.000/ml προτείνεται η μετάγγιση μιας μονάδας αιμοπεταλίων. (Slichter, et al., 2010)

Επιπλέον παράγοντες κινδύνου όπως η προηγηθείσα αιμορραγία, αντιπηκτική αγωγή, πυρετός, λοίμωξη ή σήψη, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη μπορούν να οδηγήσουν στην απόφαση μετάγγισης σε υψηλότερες τιμές αιμοπεταλίων.

Θεραπευτική μετάγγιση αιμοπεταλίων.

Η αντιμετώπιση της σοβαρής αιμορραγίας μετά από χειρουργική πράξη, μεταμόσχευση οργάνων, ή σοβαρό τραυματισμό αποτελεί πραγματική πρόκληση και από την πλευρά των αναγκών για μετάγγιση προϊόντων αίματος. Ως μαζική ορίζεται η αιμορραγία που απαιτεί για την αντιμετώπισή της πάνω από 10 μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών το 24ωρο και σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα.

Η αιμορραγία είναι η κύρια αιτία θανάτου που μπορεί να προληφθεί σε ασθενείς με οξέα τραύματα, με κατ' εκτίμηση 1,9 εκατομμύρια θανάτους ετησίως παγκοσμίως. Με απώλεια αίματος άνω του 20%, το σώμα κινδυνεύει να αναπτύξει αιμορραγικό σοκ από την ανεπαρκή παροχή οξυγόνου στα κύτταρα. Ο μέσος χρόνος μέχρι το θάνατο από την έναρξη του αιμορραγικού σοκ είναι 2 ώρες, και επομένως η έγκαιρη αναγνώριση και αντιμετώπιση της ανεξέλεγκτης αιμορραγίας και του σοκ είναι σωτήρια. (Cannon, 2018)

Αρχικά τέτοια περιστατικά αντιμετωπίζονταν σχεδόν από το πρώτο παγκόσμιο πόλεμο, με μεταγγίσεις φρέσκου ολικού αίματος. Μετά τη δεκαετία του 70 τέτοια περιστατικά αντιμετωπίζονταν με τη χορήγηση αντίστοιχων προϊόντων αίματος, ΣΕ, FFP και αιμοπεταλίων. Η αναλογία μεταξύ τους μάλιστα αποτέλεσε σημείο ερευνητικού και πρακτικού ενδιαφέροντος. (Humbrecht, et al., 2018)

Είναι πλέον επαρκώς τεκμηριωμένο ότι η επίτευξη άμεσης αιμόστασης (εντός των πρώτων 3 ωρών) είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή έκβαση σε ασθενείς με μαζική αιμορραγία. (Spinella, et al., 2012) (Pidcoke, et al., 2012) Η μαζική απώλεια αίματος μπορεί γρήγορα να οδηγήσει σε συνδυασμό σοβαρών διαταραχών όπως, η γαλακτική οξέωση, οι διαταραχές πήξης και ινωδόλυσης, η δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου που σχετίζονται με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα. (White, et al., 2017) Έτσι στις περιπτώσεις αυτές ανακύπτει ένας συνδυασμός απώλειας και κατανάλωσης αιμοπεταλίων, με συνέπεια τη θρομβοπενία, και ταυτόχρονης δυσλειτουργίας των αιμοπεταλίων. Στο πλαίσιο αυτό η μετάγγιση αιμοπεταλίων καθίσταται μια κρίσιμη παράμετρος των πρωτοκόλλων αντιμετώπισης της μαζικής αιμορραγίας και βελτίωσης της έκβασης των ασθενών αυτών.

Μετάγγιση αιμοπεταλίων σε λειτουργικές θρομβασθένειες.

Η μετάγγιση αιμοπεταλίων είχε ακόμη χρησιμοποιηθεί και σε περιπτώσεις διαταραγμένης λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Σε ασθένειες όπως το σύνδρομο Bernard-Soulier ,ή η θρομβασθένεια Glanzmann η χορήγηση αιμοπεταλίων βοήθησε στην αντιμετώπιση των επιπλοκών τους. Σήμερα κατεξοχήν ακολουθούνται άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις (τρανξεναμικό οξύ, δεσμοπρεσσίνη, παράγοντας VIIa). (Humbrecht, et al., 2018) Από την άλλη πλευρά σήμερα οι ασθενείς που λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακή αγωγή είναι συνεχώς περισσότεροι. Η μετάγγιση αιμοπεταλίων σε αυτούς όταν αντιμετωπίζουν σοβαρό αιμορραγικό επεισόδιο, είναι υπό συζήτηση. (Kaufman, et al., 2015)

Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της μεττάγγισης.

Η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας κάθε θεραπευτικής πράξης αποτελεί σημαντική παράμετρο στη σημερινή ιατρική πρακτική που βασίζεται σε αποδείξεις. Συνήθως εκτιμάται ο αριθμός των αιμοπεταλίων αμέσως μετά (10 ή 60 λεπτά) και 24 ώρες μετά τη μετάγγιση.

Φυσικά η σύγκριση των τιμών πριν και μετά τη μετάγγιση είναι βέβαια χρησιμότερη. Έτσι μπορεί να προσδιοριστεί η απόλυτη αύξηση της τιμής των αιμοπεταλίων (absolute platelet count increment) (API). Είναι αντιληπτό ότι παράγοντες όπως ο αριθμός των αιμοπεταλίων σε κάθε μονάδα ή το σωματικό μέγεθος του ασθενούς επηρεάζουν την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας.

Οι παράγοντες αυτοί λαμβάνονται υπόψιν κατά τον υπολογισμό της διορθωμένης αύξησης της τιμής των αιμοπεταλίων Corrected Count Increment (CCI) που υπολογίζεται από τον τύπο:

$$CCI = PLT_{post} - PLT_{pre} * BSA / \text{number of plt transfused}$$

Ο δείκτης αυτός εκτιμάται συνήθως 1 ώρα ή και 24 ώρες μετά τη μετάγγιση. (Delaflo-Weiss & Mintz, 2000)

Ακόμη η εκτίμηση της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας και της ικανότητας σχηματισμού θρόμβου, με ειδικές μεθόδους όπως η θρομβοελαστογραφία και η περιστροφική θρομβοελαστομετρία, που θα αναλυθούν παρακάτω, μπορούν να δώσουν σχετικά ασφαλή συμπεράσματα για την αποτελεσματικότητα της μετάγγισης αιμοπεταλίων. (Ganter & Hofer, 2008)

Για ερευνητικούς κυρίως λόγους, σε υγιείς εθελοντές που υφίστανται αυτόλογη μετάγγιση είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ανάκτησης των αιμοπεταλίων και της επιβίωσής τους μετά από κάποιο διάστημα φύλαξης, σε σύγκριση με τη χορήγηση φρέσκων αιμοπεταλίων. Για το σκοπό αυτό τα αιμοπετάλια επισημαίνονται με κατάλληλο ραδιοϊσότοπο. (Dumont, et al., 2006)

Στην περίπτωση θεραπευτικής μετάγγισης η καταστολή της αιμορραγίας αποτελεί αδιαμφισβήτητη απόδειξη της αποτελεσματικότητας της. Όταν όμως πρόκειται για προφυλακτική μετάγγιση τα πράγματα γίνονται πιο περίπλοκα. Τότε η χρήση συνδυασμού κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων κρίνεται απαραίτητη. Για την ακριβή κλινική εκτίμηση η κλίμακα του ΠΟΥ για την αιμορραγία αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη. Αυτή η κλινική εκτίμηση συνδυάζεται με τη μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων στο αίμα του ασθενούς και την εκτίμηση της μεταβολής της. (Humbrecht, et al., 2018)

Από την άλλη πλευρά τα μεσοδιαστήματα μεταξύ δύο μεταγγίσεων αποτελούν χρήσιμο και απλό δείκτη αποτελεσματικότητας της μετάγγισης. Συνήθως διάστημα 3-4 ημερών, χωρίς αιμορραγικό επεισόδιο στο ενδιάμεσο, θεωρείται δείκτης επαρκούς απόκρισης.

1.4 Συλλογή αιμοπεταλίων για μετάγγιση

Επιλογή του δότη.

Η συλλογή αιμοπεταλίων πραγματοποιείται από υγιείς εθελοντές δότες. Η επιλογή του αιμοδότη γίνεται με βάση τις σχετικές οδηγίες του ΠΟΥ και των εθνικών ρυθμιστικών αρχών. (World Health Organization, 2012) Οι αιμοδότες και οι δότες αιμοπεταλίων πρέπει να είναι υγιείς προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι ούτε οι ίδιοι ούτε και οι λήπτες θα αντιμετωπίσουν κάποιον κίνδυνο από τη διαδικασία. Εκτός από τις γενικές προϋποθέσεις για τη δωρεά αίματος, όταν πρόκειται για αιμοπετάλια, υπάρχουν επιπλέον απαιτήσεις που πρέπει να τηρούνται. Για παράδειγμα ο δότης αιμοπεταλίων πρέπει να έχει τιμή αιμοπεταλίων $>150000/\mu\text{L}$. Επίσης η λήψη φαρμάκων που επηρεάζουν την αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα λαμβάνεται σοβαρά υπόψιν. Για παράδειγμα ο δότης αιμοπεταλίων δεν θα πρέπει να έχει λάβει την τελευταία εβδομάδα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) ή ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ). (Vit, et al., 2020)

Αιμοπετάλια παραλαμβάνονται με δύο κύριους τρόπους:

Αιμοπεταλιαφαίρεση με τη χρήση κατάλληλου μηχανήματος.

Αίμα παραλαμβάνεται από το δότη συνεχώς για διάστημα 1-2 ωρών. Στο χρόνο αυτό επεξεργάζονται από το μηχάνημα 4-5 L αίματος που διαχωρίζονται με διαφορεική φυγοκέντρηση σε κλειστό κύκλωμα. Κατά το διαχωρισμό παραλαμβάνονται τα αιμοπετάλια σε κατάλληλο ασκό. Τα υπόλοιπα συστατικά επιστρέφουν στον δότη. Προκύπτει έτσι μια μονάδα αιμοπεταλίων αφαιρέσεως, που περιέχει περίπου $3 \cdot 10^{11}$ αιμοπετάλια σε 200 mL πλάσματος ή προσθετικού διαλύματος. (Simon, 1994)

Αιμοπετάλια τυχαίου δότη ολικού αίματος (Αιμοπετάλια Ανάκτησης)

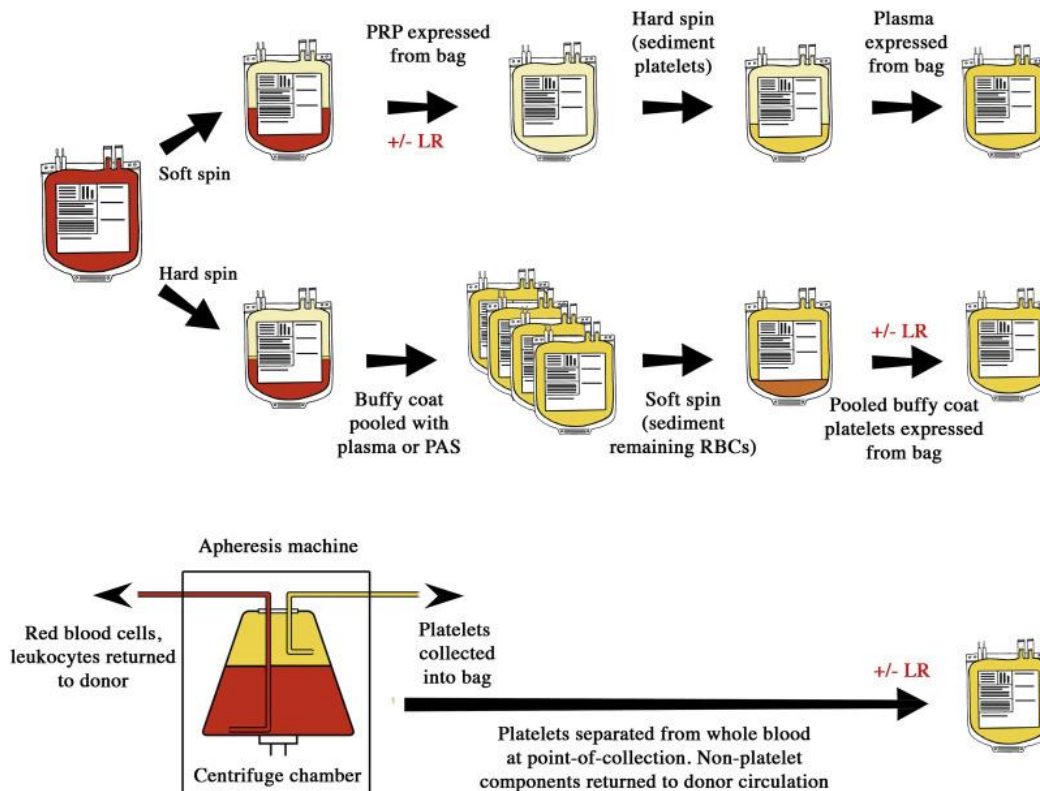
450 mL περίπου ολικό αίμα συλλέγεται σε κατάλληλο ασκό μέσω ειδικής βελόνας επενδεδυμένης με σιλικόνη προκειμένου να μην ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια. Ο ασκός περιέχει το κατάλληλο κιτρικούχο αντιπηκτικό. Ο ασκός πρέπει πρώτα να παραμείνει σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για λίγη ώρα. Ο διαχωρισμός των αιμοπεταλίων επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση χάρη στις διαφορετικές ιδιότητες καθίζησης των διαφόρων εμμόρφων συστατικών με δύο βασικές διαδικασίες:

Μέθοδος Buffy Coat (BC)

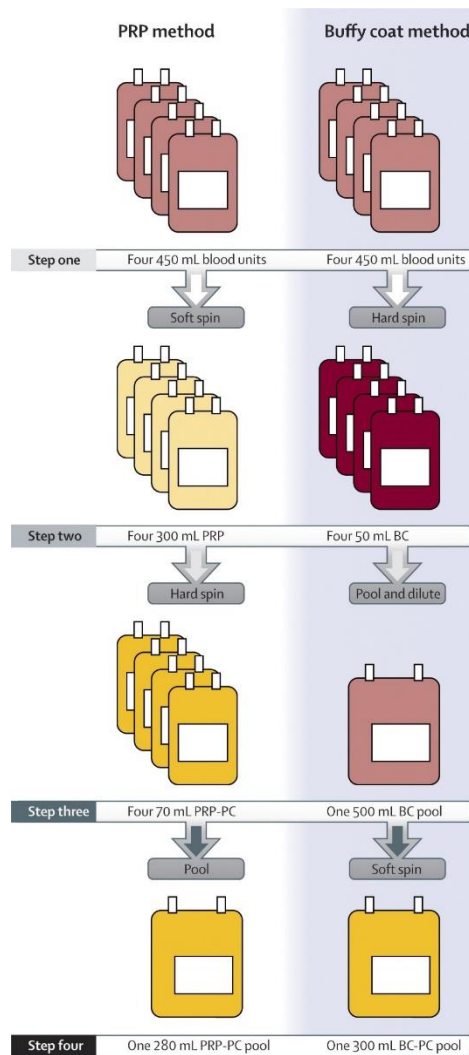
Το ολικό αίμα φυγοκεντρείται σε υψηλή δύναμη για το σχηματισμό στιβάδας που περιέχει τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, μεταξύ των ερυθρών και του υπερκείμενου πλάσματος. Η στιβάδα αυτή απομακρύνεται σε δορυφόρο ασκό με μέρος του πλάσματος αλλά και λίγα ερυθρά. Συγκεντρώνονται buffy coat από 4-6 δότες, με την ίδια κατά ABO ομάδα αίματος σε ένα ασκό. Ο ασκός φυγοκεντρείται εκ νέου σε χαμηλή ταχύτητα προκειμένου να διαχωριστούν τα λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια από τα αιμοπετάλια που παραμένουν διαλυμένα στο υπερκείμενο πλάσμα και μεταφέρονται σε ξεχωριστό ασκό. (Marini, et al., 2020)

Μέθοδος του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος, Platelet Rich Plasma PRP

Το ολικό αίμα υφίσταται φυγοκέντρηση σε χαμηλή δύναμη g που διαχωρίζει τα ερυθρά αιμοσφαίρια από το PRP. Το υπερκείμενο πλάσμα περιέχει το 30-50% των αρχικών λευκών αιμοσφαιρίων και πολύ λίγα ερυθρά αιμοσφαίρια. Το PRP μεταφέρεται σε άλλο δορυφόρο ασκό και φυγοκεντρείται εκ νέου σε υψηλότερη ταχύτητα. Το υπερκείμενο φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα απομακρύνεται σε άλλο ασκό και καταψύχεται ως FFP. (Dhurat & Sukesh, 2014)



Εικόνα 5 Σχηματική παράσταση των μεθόδων προετοιμασίας αιμοπεταλίων για μετάγγιση. (Ng, et al., 2018)



Εικόνα 6 Παρασκευή αιμοπεταλίων με τις μεθόδους Platelet Rich Plasma (PRP) και Buffy Coat (Stroncek & Rebullia, 2007)

Με τις μεθόδους αυτές προκύπτει μια μονάδα αιμοπεταλίων ανάκτησης τυχαίου δότη ολικού αίματος. Αυτή περιέχει κατά μέσο όρο $5-7,5 \cdot 10^{10}$ αιμοπετάλια σε 50-60 mL πλάσματος ή κατάλληλου προσθετικού υγρού ή τουλάχιστον $2 \cdot 10^{11}$ αιμοπετάλια ανά μονάδα. Για τη μετάγγιση ενήλικου ασθενούς χρησιμοποιείται συνήθως μία δόση αιμοπεταλίων που αντιστοιχεί είτε σε μια μονάδα αφαιρέσεως, είτε σε 4-6 μονάδες αιμοπεταλίων ανάκτησης τυχαίου δότη ολικού αίματος που δεξαμενοποιούνται. Οι μονάδες αυτές σήμερα για τις περισσότερες περιπτώσεις θεωρούνται ισοδύναμες σε αποτελεσματικότητα και ασφάλεια. (Turner, et al., 1994) Μια δόση αιμοπεταλίων αναμένεται να αυξήσει την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο αίμα κατά 30.000-50.000 /mL. (Storch, et al., 2019) Η επιλογή μεταξύ αιμοπεταλίων αφαιρέσεως ή δεξαμενοποιημένου προϊόντος γίνεται με κλινικά ή και άλλα δευτερεύοντα κριτήρια. Σημαντικό κριτήριο είναι συχνά η δια-

θεσιμότητα αλλά και οικονομικά χαρακτηριστικά, καθώς τα αιμοπετάλια αφαίρεσης έχουν πολύ υψηλότερο κόστος. Φυσικά σε περιπτώσεις HLA ή HPA αλλοανοσοποίησης η επιλογή αιμοπεταλίων αφαίρεσης από τον κατάλληλο συμβατό δότη είναι μάλλον μονόδρομος.

1.5 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά τη συλλογή και την Παρασκευή τους.

Η διαδικασία της αιμοπεταλιαφαίρεσης ή και της λήψης του ολικού αίματος και οι ακόλουθες διαδικασίες παρασκευής των αιμοπεταλίων προς μετάγγιση σε κάποιο βαθμό σχετίζονται και με ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Πρόκειται για μια κατά το μάλλον ή ήττον «φυσιολογική» ανταπόκριση η οποία όμως μπορεί να επηρεάζει την ποιότητα του προς μετάγγιση προϊόντος.

Η παρακολούθηση της πιθανής ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μπορεί να γίνει με τη χρήση ειδικών δεικτών. Στην κατηγορία αυτή η P-σελεκτίνη (CD62P, GMP-140) έχει πρωτεύουσα θέση. Στο εν ηρεμία αιμοπετάλιο το CD62P περιέχεται εντός των α-κοκκίων. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σχετίζεται αρχικά με την αποκοκκίωση και τη συνακόλουθη παρουσίαση της P-σελεκτίνης στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια. Η P-σελεκτίνη όμως είναι μόριο σύνδεσης με τα λευκά αιμοσφαίρια. Η σύνδεση αυτή εμπλέκεται με διαδικασίες απομάκρυνσης των αιμοπεταλίων. Επιπλέον οδηγεί στην ενεργοποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία αλληλεπιδρώντας και με τα μακροφάγα τα οδηγούν στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Η εμφάνισή τους σχετίζεται με την εμφάνιση ανεπιθύμητων δράσεων μετά από την μετάγγιση.

Άλλος δείκτης ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη CD63 (GP53) που σχετίζεται με τη λυσοσωμιακή εξωκυττάρωση.

Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο ιντεγκρίνης γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa είναι ο ειδικός υποδοχέας του κολλαγόνου, ενώ η γλυκοπρωτεΐνη IX (CD42b) είναι ο υποδοχέας του παράγοντα von Willebrand και αμφότερα σχετίζονται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Γενικά η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά τη λήψη και τη διαδικασία παρασκευής, αν και ενίοτε αναστρέψιμη, μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων. Η μείωση του χρόνου λήψης, η «ανάπαυση» των αιμοπεταλίων μετά τη λήψη τους, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με καλύτερη ανάκτηση και βελτιωμένη αποτελεσματικότητα.

1.6 Αποθήκευση και ειδικοί χειρισμοί των αιμοπεταλίων

Στα πρώτα χρόνια των μεταγγίσεων αιμοπεταλίων, τα συλλεγόμενα αιμοπετάλια φυλάσσονταν στους 4°C, όπως και τα συμπυκνωμένα ερυθρά, κυρίως στη μορφή του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP). Μάλιστα μέχρι τη δεκαετία του 1980 τα αιμοπετάλια μπορούσαν να αποθηκεύονται και στους 4°C σύμφωνα με τον Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών της Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), Ενότητες 21CFR640.24 και 21CFR640.25 (FDA, n.d.) Οι Murphy και Gardner όμως το 1969 απέδειξαν ότι αυτές οι συνθήκες επηρεάζουν τη ζωτικότητα των αιμοπεταλίων. Απέδειξαν, χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένα με ⁵¹Cr αιμοπετάλια, ότι αυτά έχουν μικρό χρόνο ζωής και η ανάκτησή τους μετά από μετάγγιση δεν είναι ικανοποιητική. Ταυτόχρονα έδειξαν ότι αν τα αιμοπετάλια φυλάσσονταν σε θερμοκρασία δωματίου 22°C, επεδείκνυαν σαφώς καλύτερη συμπεριφορά. (Murphy & Gardner, 1969) Έτσι σήμερα τα προς μετάγγιση αιμοπετάλια φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου 22-24°C, και μάλιστα υπό συνεχή, ήπια, οριζόντια ανακίνηση. (Holme, et al., 1978) (Kunicki, et al., 1975) (Committee, n.d.) (F.D.A. 121st Blood Products Advisory Committee Meeting, 2019) Ταυτόχρονα χρησιμοποιούνται κατάλληλοι ασκοί από ειδικά υλικά που επιτρέπουν τη διάχυση αερίων, όπως το πολυβινυλοχλωρίδιο και μάλιστα με την καταλληλότερη σχέση επιφάνειας προς όγκο. (Murphy & Gardner, 1975) (Holme, et al., 1989) Έτσι υπάρχει επαρκής ποσότητα οξυγόνου που επιτρέπει τον αερόβιο μεταβολισμό. Ακόμη και η συνεχής ανακίνηση γίνεται προκειμένου τα αιμοπετάλια να μην συσσωματώνονται και έτσι κάποια από αυτά δεν έχουν πρόσβαση στο οξυγόνο. Στις συνθήκες αυτές τα αιμοπετάλια δεν αναγκάζονται σε αναερόβιο μεταβολισμό και τη συνακόλουθη παραγωγή γαλακτικού οξέος και την πτώση του pH, γεγονότα που δρουν βλαπτικά στην επιβίωση και τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων μετά από μετάγγιση. (Ezaki, et al., 2008) Τα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα για το

ολικό αίμα είναι κυρίως κιτρικούχα. Διαλύματα κιτρικών, φωσφορικών, δεξτρόζης CPD CP2D ή και σε συνδυασμό με αδενοσίνη. Για τα αιμοπετάλια αφαίρεσης χρησιμοποιούνται ACD-A διαλύματα με κιτρικό οξύ, και δεξτρόζη. (Perrotta, et al., 2013)



Εικόνα 7 Θερμοσταθερό ερμάριο αποθήκευσης αιμοπεταλίων υπό ήπια οριζόντια ανακίνηση (Holtkamp, 2016)

Λευκαφαίρεση

Είναι γνωστό από χρόνια ότι η παρουσία λευκών αιμοσφαιρίων ή και προϊόντων τους μπορεί να καταστεί επιβλαβής για τον λήπτη. Σε αρκετές χώρες τα αιμοπετάλια όπως και τα ερυθρά αιμοσφαίρια υφίστανται διαδικασία λευκαφαίρεσης. Κύρια πλεονεκτήματα είναι η μείωση της πιθανότητας πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων, μετάδοσης κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και HLA αλλοανοσοποίησης. Η διαδικασία πραγματοποιείται μετά τη συλλογή και πριν την φύλαξη συνήθως. Τα αιμοπετάλια αφαιρέσεως θεωρούνται λευκαφαιρέμενα λόγω της ειδικής διαδικασίας συλλογής τους.

Ακτινοβόληση

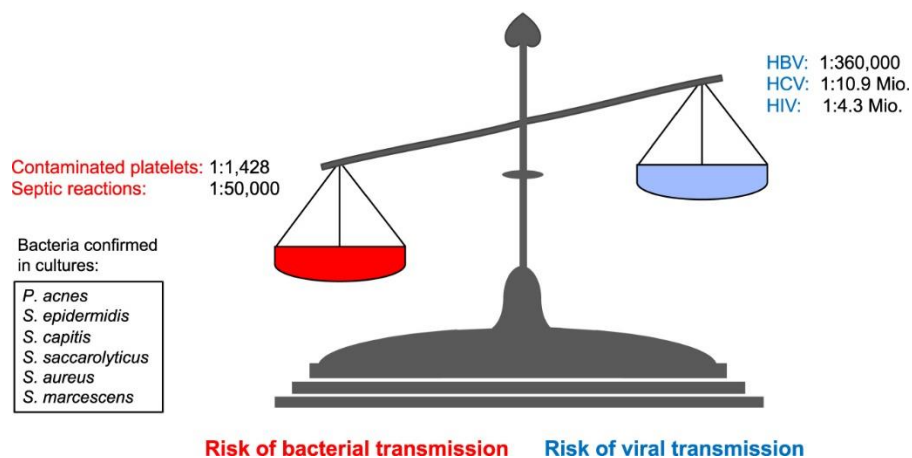
Σε ειδικές περιπτώσεις εφαρμόζεται και η ακτινοβόληση αιμοπεταλίων προκειμένου να εξουδετερωθούν υπολειπόμενα T λεμφοκύτταρα. Η παρουσία τους σχετίζεται με την επικίνδυνη αντίδραση μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή που μπορεί να παρατηρηθεί σε ειδικές κατηγορίες ασθενών.

Μικροβιακή επιμόλυνση των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων.

Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, σήμερα τα προς μετάγγιση αιμοπετάλια αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου 22°C υπό συνεχή ανακίνηση σε διαπερατούς στα αέρια ασκούς. Οι συνθήκες αυτές δυστυχώς είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη μικροβίων. Μάλιστα καθώς τα αιμοπετάλια συνήθως μεταγγίζονται σε πολύ επιβαρυσμένους ασθενείς αντιλαμβανόμαστε ότι η πιθανότητα βακτηριακής επιμόλυνσης των προς μετάγγιση προϊόντων θα μπορούσε να έχει δραματικές επιπτώσεις. Η πιθανότητα αυτή είναι που επιβάλλει τον χρονικό περιορισμό των 5 ή 7 ημερών στον χρόνο αποθήκευσης των αιμοπεταλίων.

Ο Schrezenmeier και οι συν. σε μια πολυκεντρική μελέτη τους εκτίμησαν τον κίνδυνο βακτηριακής επιμόλυνσης με καλλιέργεια των προς μετάγγιση μονάδων αιμοπεταλίων. Τα επιβεβαιωμένα θετικά για την παρουσία μικροοργανισμών δείγματα ανέρχονταν στα 0,09% για τα αιμοπετάλια αφαίρεσης και 0,06% για τα αιμοπετάλια ανάκτησης. Επρόκειτο κυρίως για μικρόβια της φυσιολογικής δερματικής χλωρίδας όπως *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*. Ο χρόνος για την πρώτη θετική καλλιέργεια από τη στιγμή της αρχικής επώασης κυμαίνονταν από 0,7 έως 3,7 ημέρες. Συχνά στο χρονικό αυτό διάστημα τα προϊόντα αιμοπεταλίων έχουν ήδη χορηγηθεί στους αντίστοιχους λήπτες. (Schrezenmeier, et al., 2007)

Φυσικά ο κίνδυνος αυτός μοιάζει μικρός. Μπορούμε όμως να τον συγκρίνουμε με τον αντίστοιχο κίνδυνο επιμόλυνσης από κάποιον από τους εξεταζόμενους κατά τον προμεταγγισιακό έλεγχο ιούς (Hourfar, et al., 2008) όπως παραστατικά παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Εικόνα 8 Σύγκριση του κινδύνου βακτηριακής και ιογενούς επιμόλυνσης αιμοπεταλίων για μετάγγιση (Schrezenmeier, et al., 2007) (Hourfar, et al., 2008) (Vit, et al., 2020)

Επιπλέον καθώς συνήθως οι ασθενείς λαμβάνουν περισσότερες μονάδες αιμοπεταλίων ο ατομικός κίνδυνος μόλυνσης από μετάγγιση είναι πολλαπλάσιος του μαθηματικού κινδύνου μόλυνσης μιας μονάδας αιμοπεταλίων. (Levy, et al., 2018) Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι η βακτηριακή λοίμωξη που προκαλείται από μετάγγιση αιμοπεταλίων και οδηγεί σε σοβαρό ανεπιθύμητο συμβάν είναι πολύ σπάνια στην ΕΕ με μόνο 16 περιπτώσεις σε 2,3 εκατομμύρια μεταγγίσεις αιμοπεταλίων και έναν θάνατο το 2017 (EU DG Health and Food Safety 147152-10 /01/2020) (Six, et al., 2020)

Γενικώς πάντως αντιλαμβάνεται κανείς ότι ο περιορισμός της πιθανότητας βακτηριακής επιμόλυνσης των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων είναι μια κρίσιμη διαδικασία για την ασφάλεια των μεταγγίσεων.

Πρώτο βήμα στη διαδικασία αυτή αποτελεί το ιατρικό ιστορικό του δότη. Γίνεται προσπάθεια να αναζητηθούν συμπτώματα που να υποδεικνύουν την ύπαρξη κάποιας βακτηριακής μόλυνσης. Φυσικά οι ασυμπτωματικές μολύνσεις ή αυτές που διαλάθουν της προσοχής του δότη είναι δεδομένο ότι θα διαφύγουν. Πιθανόν η αναζήτηση ενδείξεων βακτηριακής λοίμωξης με κάποιες εργαστηριακές εξετάσεις όπως δείκτες φλεγμονής (πχ CRP) ή ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων θα μπορούσαν να βοηθήσουν.

Μέθοδοι όπως ο σχολαστικός καθαρισμός του δέρματος στην περιοχή της φλεβοκέντησης με τα κατάλληλα αντισηπτικά διαλύματα, ή τα συστήματα εκτροπής των πρώτων 40 mL αίματος βοηθούν σημαντικά. Με αυτούς τους τρόπους μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα επιμόλυνσης από μικρόβια του δέρματος κατά τη συλλογή του αίματος.

Ακόμη στην προσπάθεια περιορισμού του προβλήματος των σηπτικών επιπλοκών από τη μετάγγιση αιμοπεταλίων ο FDA το 1989 περιόρισε το όριο χρήσης των αιμοπεταλίων προς μετάγγιση στις 5 από τις 7 ημέρες.

Η αναζήτηση αυτών των ίδιων των μικροβίων με μεθόδους μικροβιακής καλλιέργειας είναι το ακόλουθο βήμα. Συνήθως ποσότητα από το προς μετάγγιση προϊόν εμβολιάζεται σε φιάλη αιμοκαλλιέργειας και επώαζεται σε αυτόματο σύστημα. Αν δεν υπάρξει βακτηριακή ανάπτυξη κατά το πρώτο 24ωρο η μονάδα αποδεσμεύεται και είναι διαθέσιμη για μετάγγιση. (Hattori, et al., 2020) Φυσικά παράγοντες όπως η ευαισθησία της μεθόδου καλλιέργειας, η βραδεία ανάπτυξη κάποιων μικροβίων κλπ. περιορίζουν την αξιοπιστία της διαδικασίας αυτής. (Palavecino, et al., 2010)

Άλλες μέθοδοι για την ανίχνευση βακτηριακής επιμόλυνσης έχουν κατά καιρούς προταθεί. Η άμεση μικροσκοπική παρατήρηση κεχρωσμένου με χρώση Gram παρασκευάσματος, η μείωση της γλυκόζης, του pH, της διάθλασης μπορούν να βοηθήσουν, έχουν όμως πολύ χαμηλή ευαισθησία.

Οι νεότερες μέθοδοι αναζήτησης του βακτηριακού γονιδιώματος στα προς μετάγγιση προϊόντα με μεθόδους όπως η Real Time PCR ίσως δίνουν εγκυρότερα αποτελέσματα. Πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών αποτελούν η μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα που φθάνουν το 100% αλλά και η ταχύτητα έκδοσης του σχετικού αποτελέσματος που απαιτεί μόνο λίγες ώρες ανάλυσης. (Mohammadi, et al., 2005)

Καθώς οι μέθοδοι αυτοί δεν τυγχάνουν ευρείας χρησιμοποίησης συνήθως ο περιορισμός του χρόνου αποθήκευσης αποτελεί μια σχετικά ασφαλή τεχνική. Έτσι δεν παρέχεται ο αναγκαίος χρόνος για τη βακτηριακή ανάπτυξη των μικροοργανισμών που πιθανώς επιμόλυναν κάποιο προϊόν αιμοπεταλίων προς μετάγγιση. Με τη λογική αυτή το όριο χρήσης των αιμοπεταλίων προς μετάγγιση φτάνει τις 5 ημέρες συνήθως, ενώ προκρίνεται γενικότερα και η ταχύτερη χρησιμοποίησή τους.

Άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται ήδη σήμερα είναι η αδρανοποίηση των παθογόνων.

Αδρανοποίηση παθογόνων

Η διαδικασία πραγματοποιείται με σκοπό την αδρανοποίηση παθογόνων μικροβίων και ιών στα προς μετάγγιση αιμοπετάλια. Χρησιμοποιείται ο συνδυασμός κατάλληλης χημικής ουσίας και υπεριώδους ακτινοβολίας. Σε ευρεία εφαρμογή σήμερα είναι η χρήση αματοσαλενίου ή S-59 (Intercept®, Cerus, USA) σε συνδυασμό με υπεριώδη ακτινοβολία A (UVA). Η μέθοδος είναι ικανή να αδρανοποιήσει ιούς, βακτήρια, πρωτόζωα, ακόμη και λευκά αιμοσφαίρια. (Janetzko, et al., 2004)

Άλλη παρόμοια μέθοδος γίνεται με χρήση ριβοφλαβίνης (Βιταμίνη B2) και υπεριώδους ακτινοβολίας (Mirasol™). Προκαλούνται μη αναστρέψιμες μεταβολές στο DNA, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός ιών, βακτηρίων και παρασίτων.

Τέλος η νεότερη μέθοδος Theraflex, στηρίζεται στην εφαρμογή χαμηλού μήκους κύματος υπεριώδους ακτινοβολίας, που έχει την δυνατότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη σύνθεση πρωτεϊνών, χωρίς την προσθήκη κάποιου χημικού παράγοντα.

Μεταφορά αιμοπεταλίων προς μετάγγιση

Η τρέχουσα τακτική σε ότι αφορά τη μεταφορά αιμοπεταλίων περιλαμβάνει τη διακομιδή τους, υπό τις απαραίτητες συνθήκες ασφάλειας, σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς ανάδευση. Ο Koerner μελέτησε το 1984 τη επίδραση της μεταφοράς αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία 4°C και 22°C , εξετάζοντας δείκτες της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας. Θεώρησε ότι τα αιμοπετάλια που μεταφέρθηκαν στους 22°C διατηρούσαν συγκρίσιμη λειτουργικότητα με αυτά που φυλάσσονταν υπό ανακίνηση στους 22°C. (Koerner, 1983)

Ειδικά προσθετικά διαλύματα

Αρχικά τα προς μετάγγιση αιμοπετάλια φυλάσσονταν υπό τη μορφή του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος. Αλλά και αργότερα το αυτόλογο πλάσμα ήταν το μέσον στο οποίο διατηρούνταν διαλυμένα τα αιμοπετάλια. Στα χρόνια αυτά τα αιμοπετάλια αποθηκεύονταν σε διαλύματα αντιπηκτικού και συντηρητικών που προορίζονταν για την καλύτερη διατήρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 άρχισαν να γίνονται αντιληπτές οι μεταβολικές διαφορές ερυθρών και αιμοπεταλίων. Έτσι τα αιμοπετάλια άρχισαν να αποθηκεύονται σε ασκούς διαπερατούς από τα αέρια και σε θερμοκρασία δωματίου.

Στα πιο πρόσφατα χρόνια άρχισαν να χρησιμοποιούνται διάφορα ειδικά προσθετικά υγρά, Platelet Additive Solutions (PAS). Κύριο πλεονέκτημα της χρήσης αυτών των διαλυμάτων είναι ο περιορισμός της ποσότητας πλάσματος που μεταγγίζεται με τα έμμορφα στοιχεία. Το πλάσμα αυτό έχει σχετιστεί με την εκδήλωση ανεπιθύμητων δράσεων ανοσολογικής ή και άλλης αιτιολογίας. Εκτός από την παρουσία κιτρικού αντιπηκτικού, και κατάλληλων ηλεκτρολυτών τα διαλύματα PAS περιέχουν επίσης άλατα οξικού, φωσφορικού, κάλιο μαγνήσιο κλπ. Κύριος ρόλος αυτών, μεταξύ άλλων, είναι η ρύθμιση του pH και η προστασία από τη μείωσή του λόγω παραγωγής γαλακτικού οξέος κατά το μεταβολισμό. Οι τρέχουσες λύσεις PAS επισημαίνονται από PAS-A έως PAS-G. Όλα αυτά περιέχουν ποικίλους συνδυασμούς κιτρικών, φωσφορικών, οξικών, μαγνησίου, καλίου, γλυκονικού και γλυκόζης και δρουν συνεργικά για να παρέχουν αντιπηκτική δράση, σταθεροποίηση της μεμβράνης, μεταβολικά υποστρώματα, ρυθμιστική δράση και αναστολή ενεργοποίησης. (Carocelli & Dumont, 2014)

Πίνακας 1 Πλεονεκτήματα των προσθετικών διαλυμάτων αιμοπεταλίων (Alhumaidan & Sweeney, 2012)

1. Βελτιστοποιούν τον ενεργειακό μεταβολισμό ή ελαχιστοποιούν την ενεργοποίηση, με αποτέλεσμα να βελτιώνουν τη βιωσιμότητα ή και να επιτρέπουν την παράταση του χρόνου αποθήκευσης για 7 ή ίσως και περισσότερες ημέρες.
2. Μειώνουν τον όγκο του πλάσματος με αναμενόμενα οφέλη την αποφυγή αλλεργικών αντιδράσεων, πιθανής αλλοανοσοποίησης, TRALI κλπ.
3. Επιτρέπουν τη συλλογή πρόσθετου πλάσματος για χρήση ως μεταγγίσιμο προϊόν ή για κλασματοποίηση.
4. Διάφορα πρόσθετα συστατικά θα μπορούσαν να μειώσουν την αποθηκευτική βλάβη ή να διευκολύνουν την ανίχνευση παθογόνων.

Τα αιμοπετάλια αντλούν την απαραίτητη για αυτά ενέργεια μέσω δύο κυρίως μεταβολικών οδών:

1. Από την οξείδωση της γλυκόζης μέσω της γλυκολυτικής οδού, στο κυτταρόπλασμα.
2. Από τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων μακράς αλύσου, στα μιτοχόνδρια.

Η δεύτερη διεργασία σε συνδυασμό με την οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι οι πλέον αποδοτικές μέθοδοι παραγωγής ATP. Έτσι τα PAS συνήθως διαθέτουν για το μεταβολισμό των αιμοπεταλίων:

Γλυκόζη

Η γλυκόζη μεταβολίζεται από τα αιμοπετάλια, αφενός δια της γλυκολυτικής οδού, οπότε και παράγονται δυο μόρια γαλακτικού οξέος από ένα μόριο γλυκόζης και αφετέρου δια του κύκλου του καρβοξυλικού οξέος με τελικά προϊόντα διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Αντιλαμβανόμαστε ότι η παρουσία γλυκόζης είναι απαραίτητη για την επιβίωση των αιμοπεταλίων ο γλυκολυτικός όμως μεταβολισμός της έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος και τη συνακόλουθη πτώση του pH, με συνέπειες στη βιωσιμότητα και λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. (Gulliksson, 2000)

Οξικό Νάτριο

Το οξικό άλας εισέρχεται στο μεταβολισμό των αιμοπεταλίων μέσω του κύκλου των τρι-καρβοξυλικών οξέων και οξειδώνεται περαιτέρω στην αναπνευστική αλυσίδα. Τελικά προϊόντα είναι το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό. (Gulliksson, 2000) (Alhumaidan & Sweeney, 2012)

Έλεγχος ποιότητας των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων

Ο ποιοτικός έλεγχος των προς μετάγγιση προϊόντων είναι μια κρίσιμη διαδικασία, καθοριστική για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της μετάγγισης. Μια σειρά από βιοχημικά, φυσικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά μπορούν να ελεγχθούν προκειμένου να εξασφαλιστεί η βέλτιστη ποιότητα του προϊόντος.

Στο πλαίσιο αυτό η άμεση παρατήρηση του ασκού με διελαύνοντα φωτισμό είναι ένα πρώτο και σημαντικό βήμα. Το αναφερόμενο ως Swirling, η διάθλαση δηλαδή του φωτός, σχετίζεται με το δισκοειδές σχήμα των αιμοπεταλίων. Η απώλεια του δισκοειδούς σχήματος είναι απότοκος της αποθηκευτικής βλάβης των αιμοπεταλίων και της πιθανής ενεργοποίησής τους και μπορεί να αναγνωριστεί και μακροσκοπικά. (Bertolini & Murphy, 1994) (Mathai, et al., 2006)



Εικόνα 9 Εξέταση του Swirling μονάδας αιμοπεταλίων για την εκτίμηση της ποιότητάς τους (Stroncek & Rebull, 2007)

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων σε μία μονάδα προς μετάγγιση πρέπει να είναι $>2 \cdot 10^{11}$ αιμοπετάλια ανά μονάδα.

Αντίστροφα ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων πρέπει να είναι ο μικρότερος δυνατός και σίγουρα $<1 \cdot 10^6$ ανά μονάδα.

Τα επίπεδα του pH δεν πρέπει να είναι κάτω από 6.4 σε κανένα στάδιο της φύλαξης των αιμοπεταλίων καθώς έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη βιωσιμότητα των αιμοπεταλίων.

Η στείρωση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων ήδη συζητήθηκε ως καθοριστικός παράγοντας ασφάλειας και ποιότητας για τα μεταγγιζόμενα αιμοπετάλια. (EDQM, 2020)

Φυσικά έλεγχος όλων των μονάδων για HIV 1 &2, ιό της ηπατίτιδας B, ιό της ηπατίτιδας C, HTLV, Σύφιλη και άλλα παθογόνα, όπως γίνεται για όλα τα προϊόντα αίματος. (EDQM, 2020)

Προβλήματα σχετικά με τα προς μετάγγιση αιμοπετάλια

Από όσα περιγράψαμε μέχρι τώρα γίνεται αντιληπτό ότι η μετάγγιση αιμοπεταλίων είναι μια σωτήρια ιατρική παρέμβαση τόσο σε θρομβοπενικούς ασθενείς όσο και σε μείζονα τραύματα και σοβαρές χειρουργικές επεμβάσεις με μεγάλες ανάγκες μεταγγίσεων.

Η πρακτική αποθήκευσης των αιμοπεταλίων υπό συνεχή ανάδευση στους 22°C σχετίζεται με μια σειρά προβλημάτων όπως ήδη έχει περιγραφεί. Η θερμοκρασία των 22°C ευνοεί την ανάπτυξη παθογόνων και αυξάνει τον κίνδυνο σηπτικών επιπλοκών μετά τη μετάγγιση. (Brecher, et al., 2013) Έτσι επιλέγεται η μικρή διάρκεια αποθήκευσης μέχρι 5 ή 7 ημέρες.

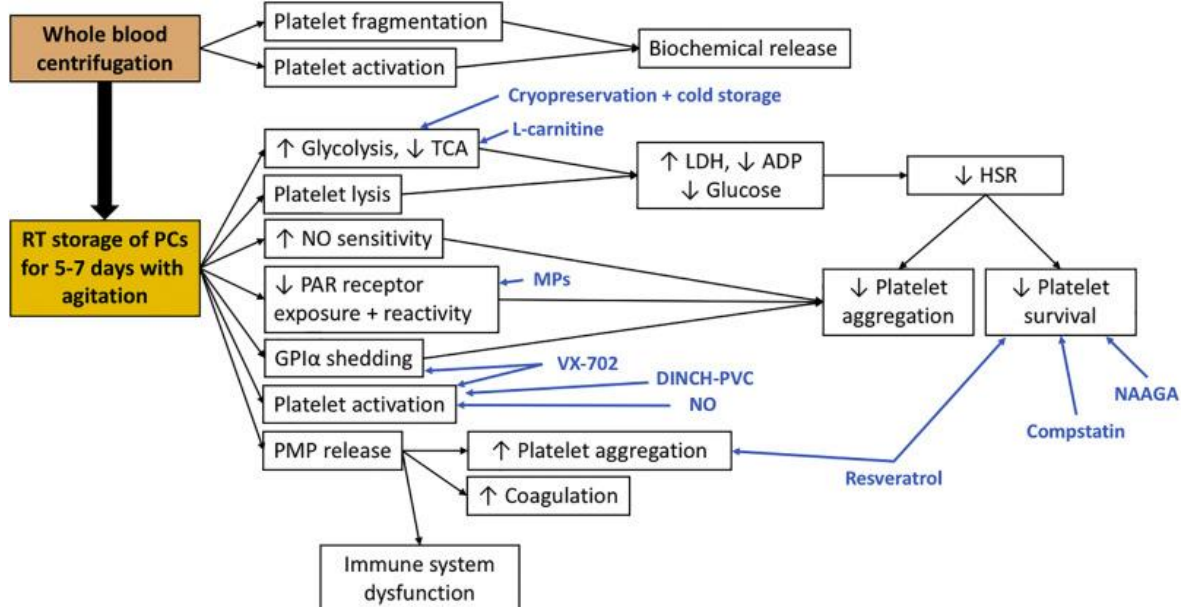
Με τόσο μικρή όμως διάρκεια ζωής είναι δυστυχώς προφανή τα προβλήματα διαθεσιμότητας του προϊόντος. Από τη μία πλευρά, η συλλογή και η προετοιμασία αιμοπεταλίων σε μεγάλη ποσότητα είναι πιθανό να προκαλέσει τη λήξη και τη σπατάλη τους. Από την άλλη πλευρά, η συλλογή αιμοπεταλίων σε πολύ χαμηλή ποσότητα θα είχε ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της παροχής τους, καθιστώντας έτσι δύσκολη την κάλυψη των αναγκών κλινικής θεραπείας και διάσωσης. Έτσι δημιουργούνται συχνά ελλείψεις αιμοπεταλίων προς μετάγγιση ενώ αντίστροφα πολλές φορές τα προϊόντα λήγουν και καταστρέφονται, αφού δεν μπόρεσαν να διατεθούν μέσα στο στενό χρονικό περιθώριο διάθεσής τους.

Οι ειδικές επίσης ανάγκες για συνεχή ανάδευση κάνει τα προς μετάγγιση αιμοπετάλια διαθέσιμα μόνο σε δομές όπως οι υπηρεσίες αιμοδοσίας. Δημιουργούνται θέματα με τη δυνατότητα μεταφοράς των αιμοπεταλίων σε απομακρυσμένες περιοχές και τη διαθεσιμότητά τους σε χώρους όπως οι ζώνες πολέμου, όπου και οι ανάγκες είναι σημαντικές.

Μια μέθοδος που επιτρέπει τη μακροπρόθεσμη αποθήκευση με την ελάχιστη απώλεια λειτουργικότητας, θα επιλύσει την ανεπάρκεια παροχής αιμοπεταλίων.

Η αποθηκευτική βλάβη

Κατά τη διαδικασία συλλογής και προετοιμασίας αλλά και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων, αυτά υφίστανται μια σειρά από αλλαγές που γενικά αναφέρονται σαν αποθηκευτική βλάβη, Platelet Storage Lesion (PSL). Οι συνθήκες αυτές με την πάροδο του χρόνου επιδρώντας στο μεταβολισμό και τις λοιπές λειτουργίες των αιμοπεταλίων προκαλούν διαταραχές στην ενεργοποίηση, τη συσσώρευση, την πήξη και την ανοσολογική συμπεριφορά των αιμοπεταλίων.



Εικόνα 10 Αποθηκευτική βλάβη αιμοπεταλίων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και στρατηγικές διαχείρισης (μπλε). HSR: αποκρίσεις υποτονικού στρες . LDH: γαλακτική αφυδρογονάση, NAAGA: N -ακετυλασπαρυλγλουταμικό οξύ, TCA: τρικαρβοξυλικό οξύ . (Ng, et al., 2018)

Εντελώς ενδεικτικά μπορούμε να αναφέρουμε λίγες από τις στοιχειώδεις παραμέτρους των μηχανισμών πρόκλησης αποθηκευτικής βλάβης:

Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά τη συλλογή και την προετοιμασία.

Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση.

Μεταβολές στην παραγωγή Τριφωσφορικής Αδενοσίνης (ATP).

Τροποποιήσεις των επιφανειακών υποδοχέων.

Μεταβολές στην ανταπόκριση στο Μονοξείδιο του Αζώτου (NO).

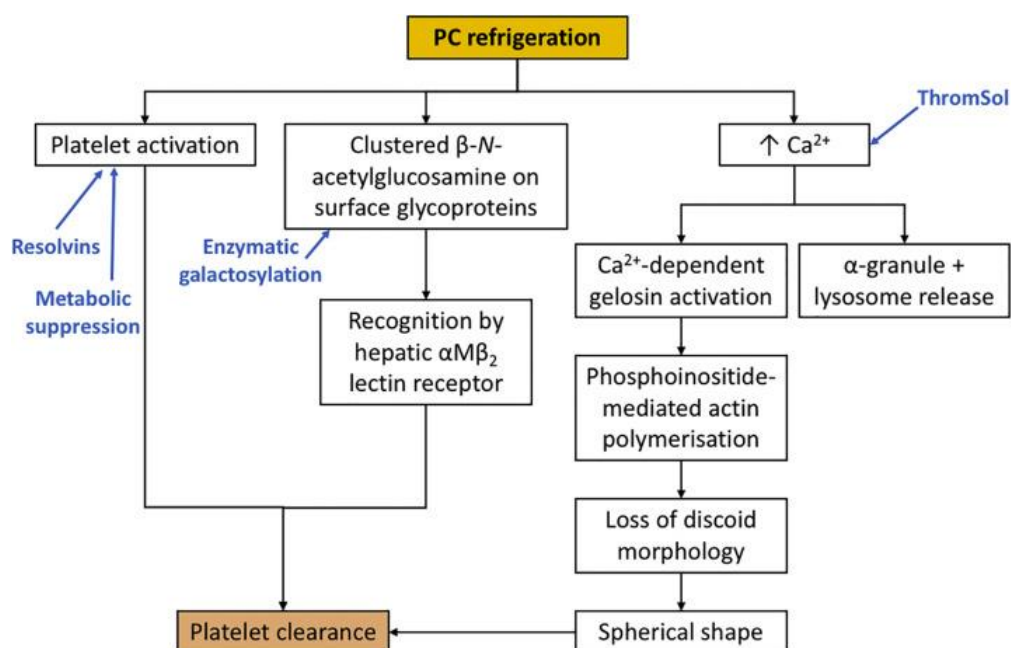
Παραγωγή μικροσωματιδίων αιμοπεταλίων (PMP).

Έκκριση προφλεγμονωδών ουσιών.

Ανοσοτροποποιητικές μεταβολές.

Σε γενικές γραμμές μπορούμε να αναφέρουμε ότι η αποθηκευτική βλάβη των αιμοπεταλίων μπορεί δυνητικά να σχετίζεται με μειωμένη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της μετάγγισης, αν και το τελευταίο δεν έχει αποδειχθεί κλινικά. Έτσι η έρευνα εστιάζει σε παραμέτρους που σχετίζονται με την αποθηκευτική βλάβη με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας και αποτελεσματικότητας των μεταγγίσεων.

Στην κατεύθυνση αυτή εξετάζεται και η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης με μεθόδους όπως η κρυοσυντήρηση και η εν ψυχρώ αποθήκευση. (Ng, et al., 2018)



Εικόνα 11 Αποθηκευτικές βλάβες εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων (PSL) και στρατηγικές διαχείρισης (μπλε). (Ng, et al., 2018)

1.7 Νέες μέθοδοι αποθήκευσης των αιμοπεταλίων

Καταψυγμένα αιμοπετάλια (Cryopreserved Platelets)

Η κατάψυξη των αιμοπεταλίων, όπως και άλλων προϊόντων αίματος ήταν μια ιδιαίτερα ελκυστική μέθοδος. Ήδη χρησιμοποιήθηκε κλινικά από τη δεκαετία του 1970. (Schiffer, et al., 1976)

Τα τελευταία χρόνια έχει αναθερμανθεί το ενδιαφέρον για την αποθήκευση αιμοπεταλίων σε διαφορετικές συνθήκες που θα ευνοούσαν την μακροχρόνια φύλαξή τους. Σε κάποιες χώρες η κρυοσυντήρηση των αιμοπεταλίων έχει προκριθεί για χρήση ειδικά σε στρατιωτικές επιχειρήσεις και ιδιαίτερα απομονωμένες περιοχές. (Holley, et al., 2013) (Lelkens, et al., 2006)

Επιπλέον η κατάψυξη μπορεί να είναι μια χρήσιμη διαδικασία όταν πρόκειται για τη φύλαξη σπάνιων φαινοτύπων ή αυτόλογων συλλογών.

Αιμοπετάλια εν ψυχρώ (Cold Stored Platelets)

Μερικοί ερευνητές έχουν βρει ότι τα PLT που αποθηκεύονται στους 4°C μπορούν να μειώσουν την πιθανότητα βακτηριακής μόλυνσης (Currie, et al., 1997), να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, να έχουν ισχυρό αποτέλεσμα συσσωμάτωσης (Montgomery, et al., 2013) και να έχουν καλή αιμοστατική λειτουργία. (Pidcoke, et al., 2014) (Zhao & Devine, 2022)

Κυκλική επαναθέρμανση εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων

Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων στο ψύχος εμφανίζει πλεονεκτήματα κυρίως σε σχέση με την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης και τη βελτιωμένη αιμοστατική λειτουργικότητά τους. Η έκθεση όμως στο ψύχος ταυτόχρονα σχετίζεται με μεταβολές στο σχήμα, τη βιοχημεία, το μεταβολισμό, την έκφραση επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών και εν γένει τη λειτουργία αλλά και την κάθαρσή τους μετά από μετάγγιση.

Ήδη από το 1978 ο McGill είχε διαπιστώσει ότι οι μορφολογικές αλλαγές που υφίστανται τα αιμοπετάλια μετά από ψύξη, ήταν δυνατό να αναστραφούν μετά από επαναθέρμανσή τους. Διαπίστωσε ότι η διακοπή της ψύξης και η επαναθέρμανση των αιμοπεταλίων για

σύντομα χρονικά διαστήματα είχαν σαν αποτέλεσμα την επανασυναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων και τη μερική αποκατάσταση του σχήματος των αιμοπεταλίων. Επιπλέον τα αιμοπετάλια αυτά εμφάνιζαν βελτιωμένη απόκριση συσσωμάτωσης και αντοχή στο υποτονικό σοκ. (McGill, 1978)

Έτσι κάποιοι ερευνητές προτείνουν τη χρήση μιας εμπορικά διαθέσιμης συσκευής που θα διατηρούσε τα αιμοπετάλια σε ψύξη (5°C) για 11 ώρες και κατόπιν θα τα αναθέρμαινε στους 37°C για 1 ώρα. Διαπίστωσαν ότι τα επαναθερμαινόμενα αιμοπετάλια εμφάνισαν μερική βελτίωση στην πλειονότητα των μεταβλητών αποθήκευσης *in vitro* και δεν διέφεραν στην *in vivo* επιβίωσή τους σε ένα μοντέλο ποντικού SCID σε σύγκριση με εκείνα των πανομοιότυπων αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. (Skrirchenko, et al., 2016)

Καθυστερημένη ψύξη αιμοπεταλίων

Μια εναλλακτική προσέγγιση στη φύλαξη των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων αφορά την καθυστερημένη ψύξη τους (*delayed cold storage*). Κάποιοι ερευνητές προτείνουν τη διατήρηση των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων για 4 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου όπως συνηθίζεται μέχρι σήμερα. Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια μεταφέρονται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2-6°C προκειμένου να διατηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

1.8 Νεότερες εναλλακτικές μορφές αιμοπεταλίων για μετάγγιση

Τα προβλήματα που αναλύθηκαν παραπάνω και οδηγούν συχνά σε ελλείψεις και μειωμένη διαθεσιμότητα αιμοπεταλίων για μετάγγιση προβληματίζουν εδώ και χρόνια τους ειδικούς των μεταγγίσεων. Μάλιστα πολλοί στρατιωτικοί οργανισμοί διεξάγουν και χρηματοδοτούν έρευνες για την αναζήτηση και χρήση νέων προϊόντων αιμοπεταλίων που θα αντιμετωπίζουν τα εν λόγω προβλήματα. (Fitzpatrick, 2019) Σε αδρές γραμμές θα περιγράψουμε παρακάτω εναλλακτικές λύσεις που έχουν κατά καιρούς προταθεί και τις δυνατότητές τους.

Λυοφιλοποιημένα αιμοπετάλια

Σκοπός των μεθόδων αυτών είναι η αποξήρανση των αιμοπεταλίων και η ανασύστασή τους όταν χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν. Για την διατήρηση όμως των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους και την διαφύλαξη της λειτουργικότητάς τους απαιτείται πριν την αποξήρανση, η σταθεροποίησή τους. Έχουν ερευνηθεί σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών, η σταθεροποίηση με παραφορμαλδεΐδη ή τρεαλόζη. (Fitzpatrick, 2019)

Συνθετικά αιμοπετάλια

Κάποιοι ερευνητές προσπαθούν να παρασκευάσουν συνθετικά αιμοπετάλια που θα έχουν ικανότητα να συσσωματώνονται και να επάγουν την αιμόσταση.

Ο Rybak και συν. αποσπούν τμήματα μεμβράνης αιμοπεταλίων με γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς και τα ενσωματώνουν σε μικροκυστίδια μονής λιπιδικής στιβάδας.

Ο Levi και συν. χρησιμοποίησαν μικροσφαιρίδια λευκωματίνης επικαλυμμένα με ινωδογόνο.

Άλλοι ερεύνησαν τη χρήση λιποσωματικών σωματιδίων, που φέρουν στην επιφάνειά τους πεπτίδια που δεσμεύουν τον παράγοντα von Willebrand, το κολλαγόνο και τα σωματίδια μεταξύ τους.

Κάποιοι πρότειναν νανοσωματίδια Arg-Gly-Asp προκειμένου να ελεγχθεί η πειραματική αιμορραγία σε κατάλληλα πειραματικά μοντέλα. (Fitzpatrick, 2019)

Παραγωγή αιμοπεταλίων από βλαστοκύτταρα.

Η χρήση αιμοπεταλίων ανεξάρτητα από τις συνθήκες φύλαξης, απαιτεί τη συλλογή από δότες που δεν είναι πάντα διαθέσιμοι. Έτσι η παραγωγή αιμοπεταλίων από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα προβάλλει ως πολλά υποσχόμενη προοπτική. Διάφοροι ερευνητές χρησιμοποίησαν προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα σε κατάλληλες συνθήκες και με τη δράση κατάλληλων ουσιών σε βιοαντιδραστήρες. Τελικός σκοπός η παραγωγή αιμοπεταλίων σε επαρκείς ποσότητες που θα είναι διαθέσιμα για μετάγγιση.

Διαπιστώνουμε ότι υπάρχουν πολλές και ενδιαφέρουσες προσεγγίσεις για την δημιουργία νέων εναλλακτικών προϊόντων «αιμοπεταλίων». Τα ιδανικά μάλιστα χαρακτηριστικά τέτοιων προϊόντων δεν είναι για όλες τις περιπτώσεις κοινά. Για παράδειγμα σε θρομβοπενικούς ασθενείς που πρέπει να λάβουν προφυλακτικά αιμοπετάλια, προέχει η βιωσιμότητά τους στην κυκλοφορία και η ανάκτησή τους μετά από μετάγγιση. Επιπλέον θα πρέπει να διαθέτουν χαρακτηριστικά των εν ηρεμία αιμοπεταλίων, ενώ ταυτόχρονα θα μπορούν να ενεργοποιηθούν από τα κατάλληλα ερεθίσματα προάγοντας την αιμόσταση. Αντίθετα

σε ασθενείς με ενεργό αιμορραγία το χορηγούμενο προϊόν θα πρέπει να είναι άμεσα αιμοστατικό. (Fitzpatrick, 2019)

1.9 Ανεπιθύμητες ενέργειες μετάγγισης αιμοπεταλίων

Όπως κάθε ιατρική πράξη και θεραπευτική παρέμβαση, έτσι και η μετάγγιση αιμοπεταλίων σχετίζεται με σπάνιες σχετικά, ανεπιθύμητες ενέργειες. Εντελώς συνοπτικά αναφέρουμε:

- Αιμολυτική αντίδραση λόγω μετάγγισης πλάσματος ασύμβατου κατά ABO.
- Μη αιμολυτική αντίδραση μετάγγισης (κυρίως ρίγη, πυρετός και κνίδωση),
- Αναφυλαξία
- Αλλο-ανοσοποίηση κατά των HLA και των αντιγόνων των ερυθροκυττάρων.
- Αλλο-ανοσοποίηση κατά των αντιγόνων HPA.
- Οξεία πνευμονική βλάβη που σχετίζεται με τη μετάγγιση (TRALI).
- Πορφύρα μετά τη μετάγγιση.
- Νόσος μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή (TA-GvHD).
- Σήψη λόγω ακούσιας βακτηριακής μόλυνσης.
- Μετάδοση ιογενούς νοσήματος (ηπατίτιδα, HIV κ.λπ.) είναι δυνατή, παρά τις προσεκτικές διαδικασίες επιλογής και διαλογής των δοτών.
- Μετάδοση σύφιλης.
- Η πρωτοζωική μετάδοση (π.χ. ελονοσία) μπορεί να συμβεί σε σπάνιες περιπτώσεις.
- Μετάδοση άλλων παθογόνων παραγόντων που δεν έχουν αναγνωριστεί.
- Τοξικότητα κιτρικού σε νεογνά και σε ασθενείς με μειωμένη ηπατική λειτουργία.
- Υπερφόρτωση του κυκλοφορικού που σχετίζεται με τη μετάγγιση. (EDQM, 2020)

1.10 Τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια στη βιβλιογραφία

Η καθιερωμένη σήμερα αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Πρώτοι οι Murphy και Gardner το 1969 με την εργασία τους «Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability--

deleterious effect of refrigerated storage», απέδειξαν την αρνητική επίδραση του ψύχους στην ανάκτηση και επιβίωση των αιμοπεταλίων. (Murphy & Gardner, 1969)

Τα ευρήματα αυτά που αποδείκνυαν τα δυσμενή φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των αποθηκευμένων στο ψύχος αιμοπεταλίων αναπαράχθηκαν και από αρκετές άλλες μελέτες τη δεκαετία που ακολούθησε. (Becker, et al., 1973) (Slichter & Harker, 1976)

Βέβαια ακολούθησαν μελέτες της λειτουργικής επάρκειας των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων σε θρομβοπενικούς ασθενείς και σε υγιείς που έλαβαν ασπιρίνη. Σε κάποιες από αυτές αποδείχθηκε η βελτιωμένη αιμοστατική λειτουργικότητα των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. (Valeri, 1974) (Becker, et al., 1973)

Άλλοι πάλι ερευνητές δεν διαπίστωσαν σημαντικές διαφορές στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων ανάλογα με τη θερμοκρασία αποθήκευσης. (Filip & Aster, 1978) (Slichter & Harker, 1976)

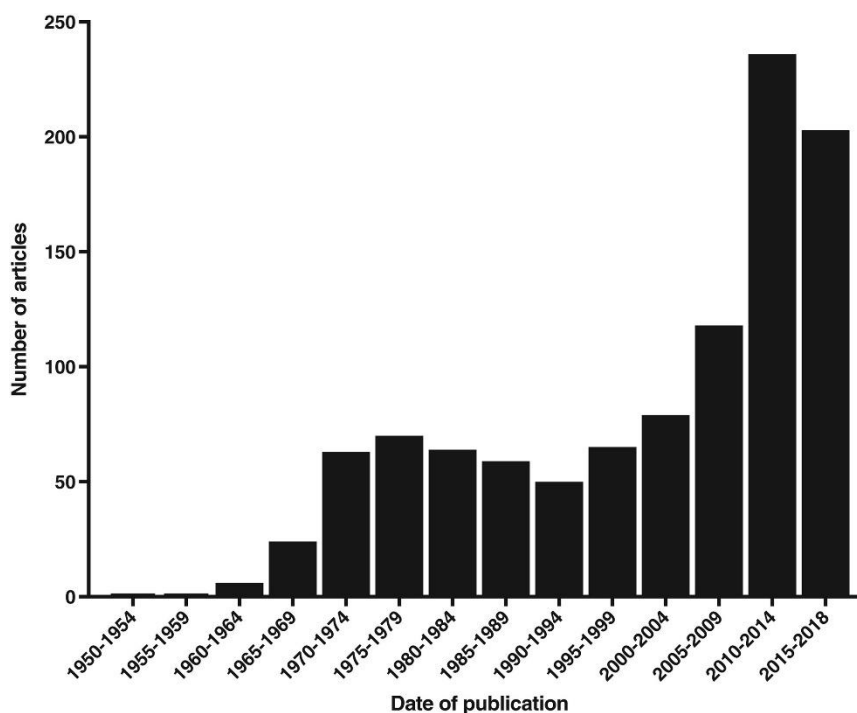
Έτσι στα χρόνια αυτά πολλά εργαστήρια διατηρούσαν διπλό απόθεμα αιμοπεταλίων σε ψύξη (4°C) και σε θερμοκρασία δωματίου (22°C). Φυσικά μια τέτοια πρακτική δημιουργούσε προβλήματα λειτουργίας, πολυπλοκότητας και κόστους.

Στα χρόνια αυτά η μετάγγιση αιμοπεταλίων προορίζονταν για ογκολογικούς ασθενείς με θρομβοπενία και η απαίτηση για μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των μεταγγιζόμενων προϊόντων ήταν προφανής και λογική. Έτσι σύντομα η αποθήκευση στους 22°C έγινε η παγιωμένη τακτική για τις τράπεζες αίματος καθώς αυτά τα αιμοπετάλια παρουσίαζαν βέλτιστη επιβίωση μετά τη μετάγγιση.

Το ενδιαφέρον για τα αιμοπετάλια ψυχρής αποθήκευσης έχει αναθερμανθεί τελευταία καθώς αποδείχθηκε η χρησιμότητα της μετάγγισης αιμοπεταλίων σε βαριά τραυματισμένους ασθενείς και ασθενείς που υποβάλλονται σε μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αιμοστατική ανωτερότητα των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων αποδεικνύεται σημαντικότερη της επιβίωσής για μεγαλύτερο διάστημα στην κυκλοφορία. (Berzuini, et al., n.d.) (Apelseth, et al., 2017) (Cap, 2017) (Milford & Reade, 2016)

Έτσι την τελευταία δεκαετία έχει παρατηρηθεί σημαντικό ερευνητικό, κλινικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον για τη φύλαξη αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύχους. Αντίστοιχη πορεία ακολουθούν και οι δημοσιεύσεις γύρω από το συγκεκριμένο θέμα. Από το 1970

έως και το 2008 12,6 άρθρα ετησίως αφορούσαν τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια. Έκτοτε όμως ο ετήσιος αυτός αριθμός εκτοξεύτηκε στα 72 άρθρα το 2017. (Scorer, et al., 2019)



Εικόνα 12 Αριθμός δημοσιευμένων άρθρων ανά έτος που αφορούν τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια (n = 1049). (Scorer, et al., 2019)

Ένα σημαντικό σημείο κριτικής των μελετών αυτών είναι ότι μεταβλητές όπως η μέθοδος συλλογής, τα υλικά αποθήκευσης, οι χρόνοι φύλαξης και παρακολούθησης διαφέρουν μεταξύ των μελετών. Ο αντίκτυπος αυτών αλλά και άλλων παραμέτρων στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων οδηγεί σε σημαντική διακύμανση της αβεβαιότητας και δυσκολία εξαγωγής ασφαλών συμπερασμάτων. (Scorer, et al., 2019)

Πίνακας Κατάλογος πειραμάτων in vitro που συγκρίνουν την αποθήκευση αιμοπεταλίων στους 4°C έναντι της θερμοκρασίας δωματίου. (Berzuini, et al., n.d.)

Συγγραφείς	Εφημερίδα	Έτος	4°C έναντι θερμοκρασίας δωματίου
Johnson <i>et al.</i>	<i>Transfusion</i>	2016	Μείωση της γλυκόλυσης Αυξημένη έκφραση της P-σελεκτίνης

Συγγραφείς	Εφημερίδα	Έτος	4°C έναντι θερμοκρασίας δωματίου
			Ταχύτερη παραγωγή θρομβίνης Ταχύτερος σχηματισμός θρόμβων, ίση δύναμη
Οι Bynum <i>et al.</i>	<i>Transfusion</i>	2016	Λιγότερο οξειδωτικό στρες Ισχυρότερος θρόμβος Αυξημένη απόκριση στους παράγοντες συσσωμάτωσης Καλύτερη συσσωμάτωση σε συνθήκες διαμητικής τάσης
Getz <i>et al.</i>	<i>Transfusion</i>	2016	Καμία διαφορά στην περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια τις πρώτες 5 ημέρες αποθήκευσης Καμία διαφορά στο πρότυπο θρομβοελαστομετρίας περιστροφής (ROTEM) μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης
Wood <i>et al.</i>	<i>Transfusion</i>	2016	Μειωμένη έκφραση των GPIB, GPIX, GPIIB και GPIV (ευκολότερη προσβολή παράγοντα von Willebrand) Αυξημένη έκφραση P-σελεκτίνης, τετρασπανίνης και φωσφατιδυλοσερίνης Τροποποιήσεις πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού που αντιστοιχούν σε κατάσταση ενεργοποίησης (proteomics) Αυξημένη έκφραση CD62P, annexin V3,

Συγγραφείς	Εφημερίδα	Έτος	4°C έναντι θερμοκρασίας δωματίου
Baimukanova <i>et al .</i>	<i>Transfusion</i>	2016	Αυξημένη δυνατότητα συγκέντρωσης
Reddoch <i>et al .</i>	<i>Shock</i> <i>Shock</i>	2014 2016	Αυξημένη έκφραση CD40 και P-σελεκτίνης Αύξηση ενδοκυτταρικού ελεύθερου ασβεστίου Αύξηση πυκνής απελευθέρωσης κόκκων ATP Επιταχυνόμενη παραγωγή θρομβίνης Πιο έντονη ανταπόκριση στο ADP, το κολλαγόνο και το TRAP (πεπτίδιο που ενεργοποιεί τον υποδοχέα θρομβίνης) Ταχύτερος, ισχυρότερος και πιο ανθεκτικός θρόμβος
Mondoro και Vostal	<i>Platelets</i>	2002	Αυξημένη ανταπόκριση σε ADP και επινεφρίνη Ισχυρότερη αντίσταση θρόμβων σε παράγοντες αποσύνθεσης Χωρίς αυθόρμητη συσσώρευση
Connor <i>et al .</i>	<i>Transfusion</i>	1996	Μειωμένη έκφραση της απόκρισης GMP-140 ADP κατά 250%. απόκριση κολλαγόνου 100% σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία δωματίου

Συγγραφείς	Εφημερίδα	Έτος	4°C έναντι θερμοκρασίας δωματίου
Oι Triulzi <i>et al.</i>	<i>Transfusion</i>	1992	Αυξημένη έκφραση του GMP-140
Rinder <i>et al.</i>	<i>Transfusion</i>	1990	Αυξημένη έκφραση του GMP-140
Becker <i>et al.</i>	<i>Transfusion</i>	1983	Πιο έντονη απάντηση ADP

Κεφάλαιο 2

Οι βιολογικές και παθοφυσιολογικές επιδράσεις του ψύχους στα αιμοπετάλια.

2.1 Εισαγωγή στην παθοφυσιολογική επίδραση του ψύχους.

Η έκθεση των αιμοπεταλίων στο ψύχος επάγει μια σειρά από μεταβολές των αιμοπεταλίων που καθορίζουν ένα ιδιαίτερο προφίλ χαρακτηριστικών. Οι αλλαγές που υφίστανται τα προϊόντα αίματος κατά τη φύλαξή τους αναφέρονται γενικά σαν αποθηκευτική βλάβη και η διερεύνηση των μηχανισμών της είναι μια περίπλοκη και απαιτητική διαδικασία. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί όμως που εμπλέκονται στη διαμόρφωση αυτών των μεταβολών δίνουν πολύτιμες πληροφορίες τόσο για την τελική επίπτωση στα κρίσιμα χαρακτηριστικά λειτουργίας των αιμοπεταλίων όσο και στη δυνατότητα διόρθωσής τους. (Getz, n.d.)

2.2 Μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση του ψύχους.

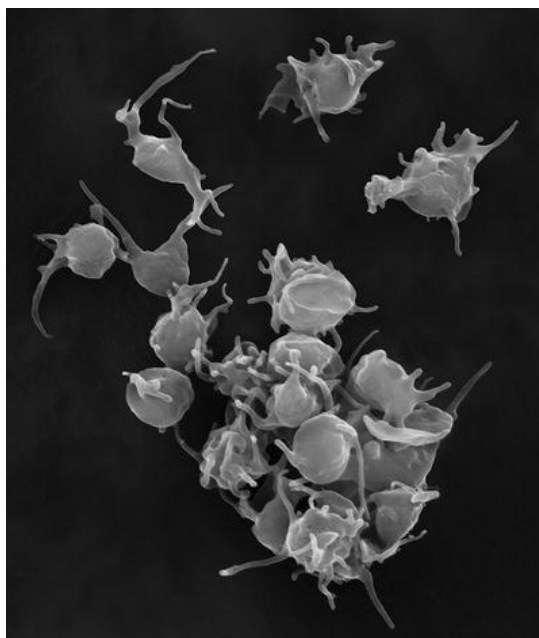
Ήδη από αρκετά παλιά είχε διαπιστωθεί ότι η έκθεση των αιμοπεταλίων στο ψύχος οδηγεί σε αλλαγές στη μορφολογία τους. (Zucker & Borrelli, 1954)

Τα αιμοπετάλια σε ηρεμία εμφανίζουν δισκοειδές σχήμα. Όπως ήδη αναφέραμε η μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων σχετίζεται με την ενεργοποίησή τους προκειμένου να επιτελέσουν το ρόλο τους στην αιμοστατική διαδικασία. (Aslan, et al., 2012)

Η έκθεση των αιμοπεταλίων στο ψύχος οδηγεί στην απώλεια του δισκοειδούς σχήματος. Τα αιμοπετάλια αποκτούν πλέον πιο σφαιρικό σχήμα με ταυτόχρονο σχηματισμό προσεκβολών της επιφάνειάς τους και ψευδοποδίων. Με τον τρόπο αυτό αυξάνει η συνολική επιφάνεια των αιμοπεταλίων και κατά συνέπεια η δυνατότητα αλληλεπίδρασης των επιφανειακών τους υποδοχέων με τους κατάλληλους διεγέρτες. (Aslan, 2017)



Εικόνα 1314 Αλλαγή σχήματος αιμοπεταλίων όπως φαίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Ηλεκτρονική μικρογραφία αιμοπεταλίου ηρεμίας (κάτω) και ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου (πάνω). Τα αιμοπετάλια σε ηρεμία εμφανίζουν δισκοειδή μορφολογία και υφίστανται μια αλλαγή στο σχήμα σε μια πιο σφαιρική μορφή που προβάλλει ψευδοπόδια κατά την ενεργοποίηση. Πνευματικά δικαιώματα Dennis Kunkel Microscopy, Inc. (Aslan, 2017)



Εικόνα 15 Αλλαγή σχήματος αιμοπεταλίων και συσσωρεύσή τους. Ηλεκτρονική μικρογραφία των αιμοπεταλίων που υφίστανται αλλαγή σχήματος και συσσωμάτωση μετά από διέγερση με θρομβίνη. Πνευματικά δικαιώματα Dennis Kunkel Microscopy, Inc. (Aslan, 2017)

Η αναδιαμόρφωση αυτή της μορφολογίας των αιμοπεταλίων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που πραγματοποιείται ταχύτατα υπό την επίδραση των κατάλληλων διεγερτών, όπως η θρομβίνη, το ADP, το κολλαγόνο. Παρόλα αυτά όμως αποδείχθηκε ότι και η επίδραση του ψύχους έχει παρόμοια αποτελέσματα. (White & Krivit, 1967) (Winokur & Hartwig, 1995)

Τα αιμοπετάλια σε ηρεμία διατηρούν το δισκοειδές τους σχήμα χάρει στον περιφερικό δακτύλιο μικροσωληνίσκων που διαθέτουν. Η έκθεση όμως στο ψύχος οδηγεί ταχύτατα στον αποπολυμερισμό του δικτύου αυτού. Επιπλέον τα εν ψυχρώ αιμοπετάλια εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις ενδοπλασματικού ασβεστίου. Η παρουσία του ασβεστίου σχετίζεται με την ταχεία αποκοπή του δικτύου των μικροσωληνίσκων κατά τη διαδικασία της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων δια της ενεργοποίησης της γελσολίνης. Πρόκειται για το ένζυμο που αποκόπτει τα νημάτια ακτίνης στα αιμοπετάλια. Εκτός αυτών και άλλοι περίπλοκοι μηχανισμοί, όπως αναδιατάξεις λιπιδίων της μεμβράνης και σύνθεσης πολυφωσφοϊνοσιτίδης, έχουν σχετιστεί με την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων στο ψύχος. (Hoffmeister, et al., n.d.)

Στην κατεύθυνση της κατανόησης των μορφολογικών αυτών αλλαγών υπό την επίδραση του ψύχους, διερευνήθηκε και η επίδραση διαφόρων φαρμάκων. Η ταξόλη είναι αντικαρκινικό φάρμακο που δρα σταθεροποιώντας τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου. Ο White έδειξε ότι η ταξόλη εμποδίζει την αποσυναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων μετά από την ψύξη των αιμοπεταλίων και σταθεροποιεί το σχήμα τους. (White, n.d.)

Από την άλλη πλευρά η κολχικίνη, ουσία που προκαλεί αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, όταν επιδρά σε αιμοπετάλια στους 37 °C δεν έχει αντίστοιχη επίδραση στη μορφολογία τους. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι και άλλοι μηχανισμοί εμπλέκονται στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση του ψύχους. (Behnke, 1970)

Άλλες πάλι μελέτες εστίασαν το ενδιαφέρον τους στη σημασία της συστατικότητας στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων. Έτσι ο White και συν. μελέτησαν τη δράση της κυτοχαλασίνης Β (Cytochalasin B), ενός αναστολέα του πολυμερισμού της ακτίνης. Διαπιστώθηκε ότι η αναστολή αυτή του πολυμερισμού της ακτίνης είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή και των μορφολογικών αλλοιώσεων και του σχηματισμού ψευδοποδίων υπό την επίδραση του ψύχους. Ο Winokur και συν. συσχέτισαν την αλλαγή του σχήματος

των αιμοπεταλίων στο ψύχος με την ανασυγκρότηση της ακτίνης με ειδικό μηχανισμό. (White & Krumwiede, 1973) (Winokur & Hartwig, 1995)

2.3 Ψύχος και ενδοκυττάριο ασβέστιο των αιμοπεταλίων.

Οι δομικές και λειτουργικές μεταβολές που υφίστανται τα αιμοπετάλια κατά την ψύξη τους από πολύ νωρίς συσχετίστηκαν και με τη μεταβολή του ενδοκυττάριου ασβεστίου σε αυτά. Οι μεταβολές αυτές προσομοιάζαν με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση ιοντοφόρου ασβεστίου A23,187. (Feinstein & Fraser, 1975) (Massini & Lüscher, 1974) (White, et al., 1974)

Έτσι οι Oliver και συν. προσπάθησαν να εκτιμήσουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου στα ψυχόμενα αιμοπετάλια. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποίησαν τον ενδοκυτταρικό φθορίζοντα ανιχνευτή ασβεστίου Indo-1. Καθώς έψυχαν τα αιμοπετάλια μέχρι τους 5°C διαπίστωσαν την διαρκή αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Διαπίστωσαν επίσης ότι η χρονική παράταση της ψύξης στους 5°C δεν αύξανε περαιτέρω την συγκέντρωση του ασβεστίου, τουλάχιστον τις πρώτες ώρες. (Oliver, et al., 1999)

Επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων έγινε και από άλλες έρευνες που χρησιμοποιούσαν διάφορους ενδοκυτταρικούς χηλικούς παράγοντες του ασβεστίου. (Oliver, et al., 1999) (Winokur & Hartwig, 1995)

Οι ακριβείς μηχανισμοί που σχετίζονται με την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου των αιμοπεταλίων που ψύχονται δεν είναι απόλυτα ξεκάθαροι. Μια πρώτη λογική εξήγηση θα ήταν η απελευθέρωση του ασβεστίου από τα κοκκία στα οποία αποθηκεύεται. Επιπλέον οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων πιθανόν να παρουσιάζουν διαρροή ασβεστίου λόγω της μεταβολής φάσης που υφίστανται κατά την ψύξη. Ακόμη πιθανόν η ψύξη επηρεάζει τη λειτουργία της αντλίας ασβεστίου της μεμβράνης. Από την άλλη η επίδραση της ψύξης στη λιπιδιακή διπλοστιβάδα (Xiang, et al., 2021) και η συνακόλουθη συσσώρευση υποδοχέων μπορεί να πυροδοτεί κάποια σηματοδοτικά μονοπάτια που εν τέλει οδηγούν στην απελευθέρωση του ασβεστίου. (Oliver, et al., 1999)

2.4 Επίδραση του ψύχους στο μεταβολισμό και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων.

Το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που χρειάζεται το αιμοπετάλιο προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Είναι αυτονόητο ότι τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων δραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη παραγωγή της απαραίτητης ενέργειας, με τη μορφή του ATP, για την επιτέλεση πολλών σημαντικών λειτουργιών. Εκτός αυτού έχει αποδειχθεί ότι τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων παίζουν ρόλο και σε διεργασίες απόπτωσης, ειδικά αν αναλογιστούμε ότι τα αιμοπετάλια δεν διαθέτουν πυρήνα. (Leytin, 2012) (Zharikov & Shiva, 2013)

Η μιτοχονδριακή λειτουργία των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν στο ψύχος ήταν περιορισμένη. Παρουσίαζε όμως μέγιστη απόκριση μετά από ενεργοποίηση. Η εκτίμησή της έγινε με τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) μέσα στα αιμοπετάλια. Επιπλέον εκτιμήθηκε και η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε η επαγόμενη από το κολλαγόνο συσσωμάτωση, με συσσωματομετρία σύνθετης αντίστασης και η μέγιστη σταθερότητα του, θρόμβου με θρομβοελαστομετρία (ROTEM). Αποδείχθηκε ότι το ψύχος μειώνει το οξειδωτικό στρες και βοηθά στη διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργικότητας, προκειμένου αυτή να είναι διαθέσιμη όταν χρειαστεί κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. (Bynum, et al., 2016)

Μάλιστα η «οξειδωτική έκρηξη», με την ταχεία παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι ένα κρίσιμο βήμα κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Συμβάλλει επιπλέον στην έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια και τη συνακόλουθη κινητοποίηση του καταρράκτη της πήξης. (Krötz, et al., 2004)

Η γλυκολυτική οδός στα αποθηκευμένα αιμοπετάλια οδηγεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, νερού, διοξειδίου του άνθρακα και ιόντων υδρογόνου από τον καταβολισμό της γλυκόζης. (M. Baker & David J. Candy, Robert J. Hawker, Jennifer, 2001) Η παραγωγή όμως γαλακτικού οξέος και η συνακόλουθη πτώση του pH έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την απώλεια λειτουργικότητας και ζωτικότητας των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. (Bertolini, et al., 1993) (Kofoed, et al., 1991)

2.5 Επίδραση του ψύχους στις γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης.

Η γλυκοπρωτεΐνη GPIb-IX-V, είναι από τους σημαντικότερους υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων. Αλληλεπιδρά με τον παράγοντα von Willebrand (VWF) και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την πρωτογενή αιμόσταση. Κατά την ψύξη των αιμοπεταλίων έχει δειχθεί ότι οι υποδοχείς αυτοί συγκεντρώνονται στην επιφάνεια τους. Η αναδιάταξη αυτή πιθανόν να σχετίζεται με την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ή και την αναδιαμόρφωση του κυτταρικού σκελετού των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ψύχος. (Hoffmeister, et al., 2003)

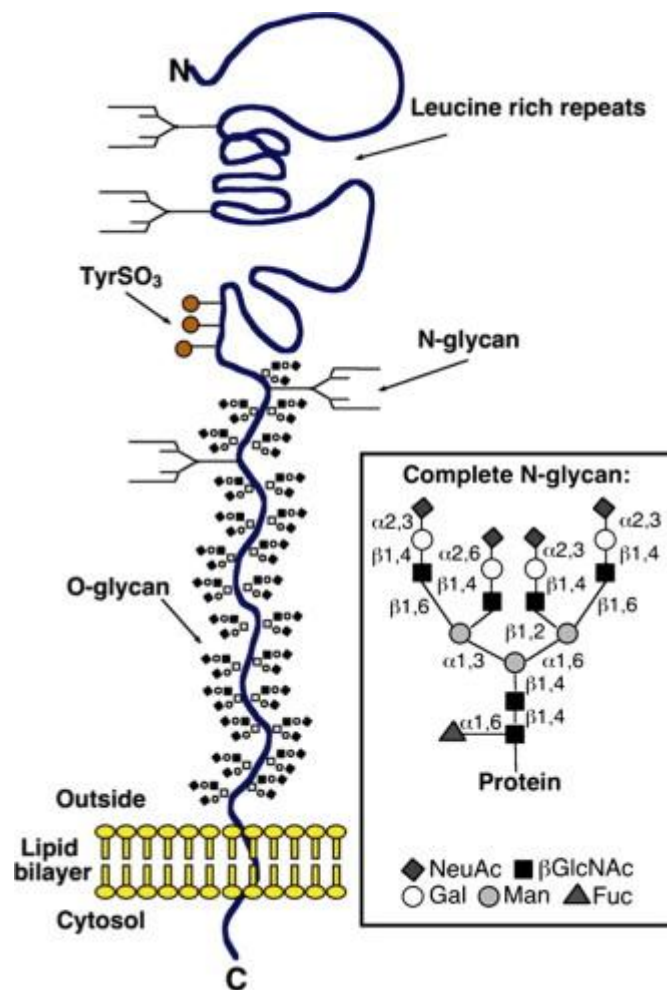
Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου σχετίζεται επίσης και με την έκφραση του υποδοχέα ινωδογόνου GPIIb-IIIa στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων μετά από ψύξη. Η μερική αυτή έκφραση του υποδοχέα σχετίζεται με την αποκοκκίωση των α-κοκκίων, στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης των οποίων βρίσκεται στο εν ηρεμία αιμοπετάλιο. (Getz, et al., 2016)

2.6 Ψύχος και μηχανισμοί απομάκρυνσης των αιμοπεταλίων από τον οργανισμό.

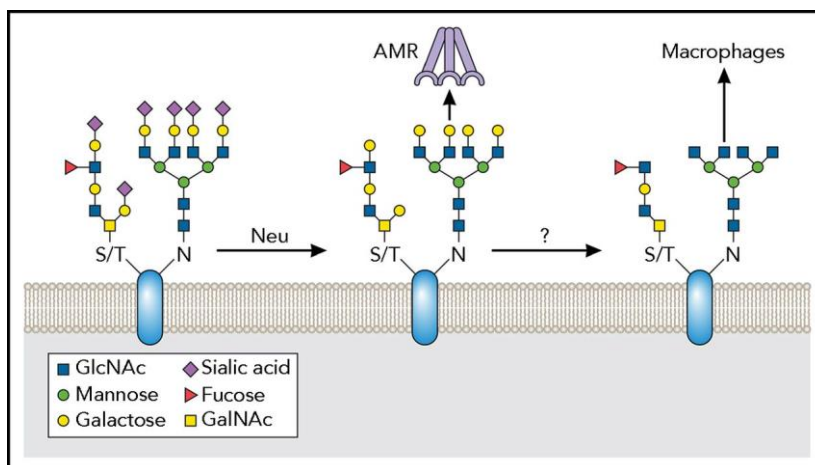
Οι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς της αιμοπεταλιακής επιφάνειας παίζουν ρόλο και στην απομάκρυνση των αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία. Με το ψύχος οι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς του παράγοντα von Willebrand (GPIbα) συρρέουν και σχηματίζουν συσσωματώματα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώρισή τους από τους υποδοχείς ιντεγκρινών, αΜβ2 (complement receptor type 3, Mac-1, ή CD11b/CD18) CR3 υποδοχείς (Complement type 3 receptors). Οι υποδοχείς αυτοί εντοπίζονται στα μακροφάγα και σχετίζονται με την κάθαρση των ψυχθέντων αιμοπεταλίων, μετά από βραχείας διάρκειας ψύξη (<48 ώρες). (Hoffmeister, et al., 2003) (Quach, et al., 2018) Ποντίκια που δεν διαθέτουν τον υποδοχέα αΜβ2 εμφανίζουν βελτιωμένο χρόνο κυκλοφορίας των ψυχθέντων αιμοπεταλίων. (Hoffmeister, et al., 2003)

Το ψύχος και μάλιστα μετά από παρατεταμένη ψύξη (>48 ώρες), επιφέρει και μεταβολές στα τελικά τμήματα της γλυκάνης του GPIb. Με τη δράση της ενδογενούς νευραμινιδάσης αποκόπτεται ένα τερματικό σιαλικό οξύ από τις μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες. Έτσι εκτίθενται τα υπολείμματα γαλακτόζης στους υποδοχείς Ashwell-Morell (AMR) των

ηπατικών μακροφάγων και των ηπατοκυττάρων. Η παραγόμενη από κάποια μικρόβια νευραμινιδάση επίσης πιθανόν να εξηγεί την θρομβοπενία που προκαλούν κάποιες λοιμώξεις. (Rumjantseva, et al., 2009) Ακόμη η γαλακτοζυλίωση των υπολειμμάτων βGlcNAc με UPD-γαλακτόζη βελτιώνει την επιβίωση και αυξάνει τον χρόνο κυκλοφορίας αποθηκευμένων εν ψυχρώ για μικρό χρονικό διάστημα αιμοπεταλίων σε πειράματα με ποντίκια. (Hoffmeister, et al., 2003) Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώνονται όμως σε παρατεταμένη αποθήκευση των αιμοπεταλίων εν ψυχρώ στους ανθρώπους. (Wandall, et al., 2008)



Εικόνα 16 Σχηματικό διάγραμμα της ανθρώπινης υπομονάδας υποδοχέα παράγοντα von Willebrand GPIbα. Στο πλαίσιο εμφανίζεται μια τυπική, πλήρης N-γλυκάνη. (Rumjantseva & Hoffmeister, 2010)



Εικόνα 17 Αποσιαλυλίωση πρωτεϊνών στα αιμοπετάλια. Κατά τη διάρκεια της ζωής των αιμοπεταλίων, οι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες χάνουν τα τελικά υπολείμματα σιαλικού οξέος στις γλυκάνες τους, μια διαδικασία που σχετίζεται με την κάθαρση. Οι νευραμινιδάσες είναι γλυκοσιδικές υδrolάσες που μπορούν να αφαιρέσουν το τελικό σιαλικό οξύ από τις γλυκάνες. Σε πολλές γλυκάνες, η αποσιαλυλίωση οδηγεί σε έκθεση των προτελευταίων υπολειμμάτων γαλακτόζης στις γλυκάνες. Αυτά με τη σειρά τους μπορούν να αναγνωριστούν από το AMR. Περαιτέρω απογλυκοζυλίωση οδηγεί σε εκτεθειμένα υπολείμματα GlcNAc, τα οποία μπορεί να αναγνωριστούν από άλλους υποδοχείς υδατανθράκων και ενδεχομένως να μεσολαβούν στην πρόσληψή τους από τα μακροφάγα.

Η πραγματικότητα βέβαια είναι ότι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απομάκρυνση των ψυχθέντων αιμοπεταλίων είναι πολλαπλοί και πολύπλοκοι και μόνο λίγα από τα πραγματικά στοιχεία είναι μέχρι σήμερα γνωστά.

2.7 Συμπεράσματα

Τα αιμοπετάλια λοιπόν που εκτίθενται στο ψύχος υφίστανται μια σειρά από σημαντικές μεταβολές. Αλλάζουν το σχήμα τους και από ομαλό δισκοειδές αποκτούν ακανόνιστο σχήμα με προσεκβολές και ψευδοπόδια. Οι αλλαγές αυτές θυμίζουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε ανταπόκριση στη δράση των κατάλληλων διεγερτικών μορίων. Όμως από εκεί και πέρα τα γεγονότα που συμβαίνουν είναι αρκετά διαφορετικά.

Οι μεταβολές που υφίστανται τα αιμοπετάλια σε χαμηλές θερμοκρασίες ίσως, κατά μια θεωρία, να αποτελούν μια εξελικτική προσαρμογή στις καθημερινές ανάγκες επιβίωσης. Πιστεύεται ότι τα αιμοπετάλια λειτουργούν σε κάποιο βαθμό σαν θερμοευαίσθητοι ρυθμιστές της αιμόστασης. Στα περιφερικά τμήματα του οργανισμού, όπου και η

θερμοκρασία είναι ελαφρώς χαμηλότερη, τα αιμοπετάλια προετοιμάζονται για ενεργοποίηση, καθώς εκεί η πιθανότητα τραυματισμού και η ανάγκη ταχείας αιμόστασης είναι μεγαλύτερη. Αντίστροφα, στα κεντρικά τμήματα του σώματος, όπου και η θερμοκρασία είναι υψηλότερη, τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μικρότερη επάρκεια για ανταπόκριση σε θρομβογόνα ερεθίσματα. Αυτό θα μπορούσε να αποδειχθεί σωτήριο καθώς η θρόμβωση σε περιοχές όπως τα στεφανιαία ή τα εγκεφαλικά αγγεία θα μπορούσε να είναι μοιραία. (Hoffmeister, et al., 2003)

Κεφάλαιο 3.

Μελέτες των in vitro χαρακτηριστικών των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων.

3.1 Εισαγωγή

Στην πορεία των μεταγγίσεων των αιμοπεταλίων, έχουν κατά καιρούς προταθεί, εφαρμοστεί και ελεγχθεί διάφορες μέθοδοι για την in vitro εκτίμηση της λειτουργικότητας και της βιωσιμότητας των αιμοπεταλίων. Οι ερευνητικές εργασίες είναι στον τομέα αυτό άφθονες και κατά καιρούς χρησιμοποίησαν ποικιλία μεθόδων από εντελώς απλοϊκές έως και πολύ εξελιγμένες προκειμένου να απαντήσουν στο ερώτημα της ποιοτικής εκτίμησης των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματά τους όμως δεν ήταν πάντα συγκρίσιμα και σε κάποιες περιπτώσεις κατέληγαν να γίνονται και αντιφατικά.

Στη συνέχεια θα προσπαθήσουμε να προσεγγίσουμε σχεδόν επιγραμματικά σχετικές έρευνες που προσπάθησαν με in vitro μεθόδους να εκτιμήσουν τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση και φυλάσσονται σε συνθήκες ψύχους.

Τέτοιες μέθοδοι περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό, φυσικών, χημικών και άλλων χαρακτηριστικών και την προσπάθεια συσχέτισής τους με τα τελικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων.

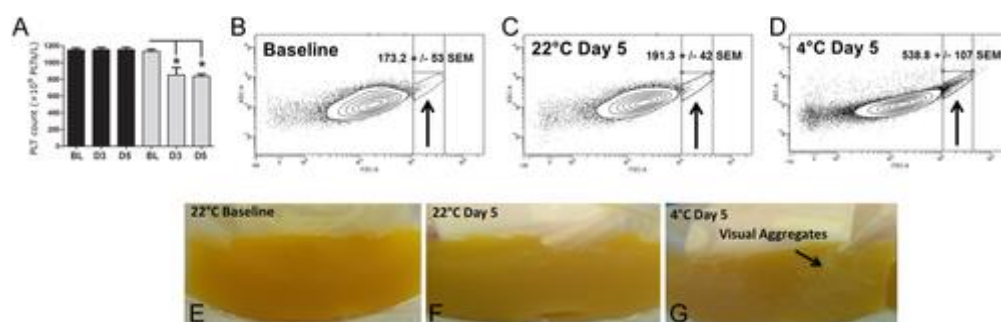
3.2 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά

Ο μακροσκοπικός έλεγχος κάθε μεταγγιζόμενου προϊόντος, αν και είναι εντελώς αδρός, είναι πάντοτε απαραίτητος. Έτσι συνήθως και με την εν ψυχρώ αποθήκευση οι φυλασσόμενοι ασκοί διατηρούν τα αρχικά μακροσκοπικά χαρακτηριστικά τους. Έχουν χρώμα υποκίτρινο και είναι ομοιόμορφης σύστασης χωρίς συσσωρεύσεις ή πήγματα μετά από την κατάλληλη ανακίνησή τους. (Jiangcun, et al., 2018)

Η παρατήρηση της διάθλασης του φωτός όταν διέρχεται από τον ασκό των αιμοπεταλίων (swirling) είναι μια αδρή μέθοδος εκτίμησης της ποιότητας των αιμοπεταλίων

προς μετάγγιση όταν αυτά αποθηκεύονται στη θερμοκρασία δωματίου. Οι Bertolini και Murphry διαπίστωσαν ότι σχετίζεται με το δισκοειδές σχήμα των αιμοπεταλίων (Bertolini & Murphry, 1994) και ο Mathai και οι συν επιβεβαίωσαν ότι σχετίζεται με τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. (Mathai, et al., 2006) Η διατήρηση όμως των αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύχους έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια αυτού του χαρακτηριστικού. Η αιτία είναι η μεταβολή του δισκοειδούς σχήματος των αιμοπεταλίων όταν αυτά εκτεθούν στο ψύχος. (Mathai, et al., 2006) (Reddoch, et al., 2014)

Ο Getz και οι συν. διαπίστωσαν ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν στους 4°C παρουσίαζαν ορατό σχηματισμό συσσωματωμάτων που μάλιστα οδηγούσε και σε μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων. (Getz, et al., 2016)



Εικόνα 18 Η επίδραση της αποθήκευσης στους 4°C στον αριθμό και τη συσώρευση PLT. (A) Οι μετρήσεις αξιολογήθηκαν στην αρχική τιμή (BL), την ημέρα 3 (D3) και την ημέρα 5 (D5) για προϊόντα PLT αφαίρεσης που αποθηκεύτηκαν στους (■) 22 ή (■) 4°C (n = 4). (BD) Ο σχηματισμός συσσωματωμάτων υπολογίστηκε από μια αύξηση του αριθμού διασποράς προς τα εμπρός (FSC) έξω από τη καθορισμένη πύλη PLT και αναφέρεται ως αριθμός συμβάντων που υπάρχουν σε 20.000 συμβάντα που καταγράφηκαν (N = 4). (EG) Αντιπροσωπευτικές εικόνες του AP αποθηκευμένες στους 22°C ή 4°C. *p < 0,05. (Getz, et al., 2016)

3.3 Φυσικά χαρακτηριστικά

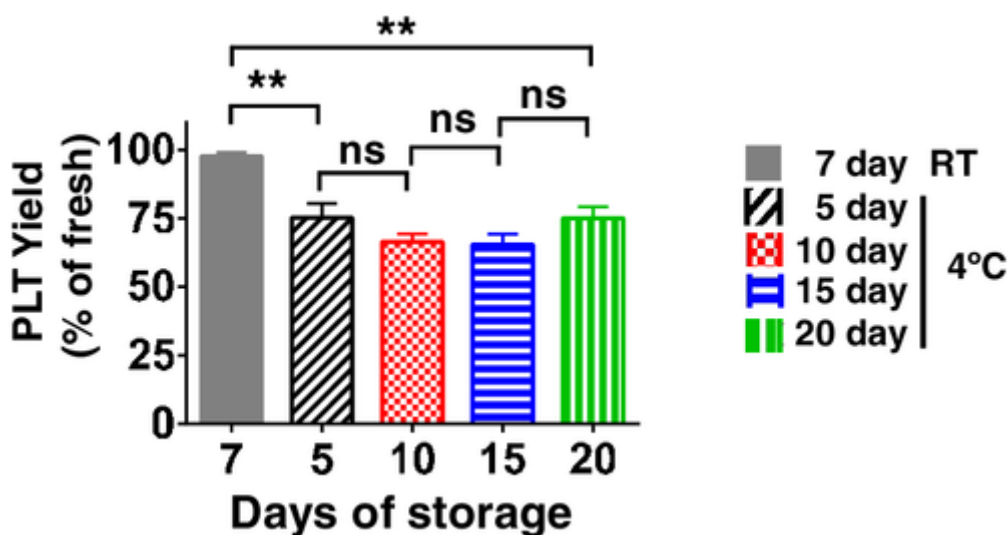
Το μέγεθος, το σχήμα και ο αριθμός.

Αριθμός αιμοπεταλίων

Μια αρχική και στοιχειώδης προσέγγιση αφορά τον ίδιο τον αριθμό των αιμοπεταλίων που είναι μετά την αποθήκευση διαθέσιμα προς μετάγγιση. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων, ανεξάρτητα από τις συνθήκες σχετίζεται με σχετική μείωση της συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων.

Ο προσδιορισμός γίνεται συνήθως με τη χρήση αιματολογικού αναλυτή και την εφαρμογή της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής. Σε κάποιες περιπτώσεις η μέτρηση γίνονταν και με μη αυτόματες μεθόδους όπως η χρήση κυτταρομετρικού θαλάμου επί κατάλληλης πλάκας (Newbauer ή Rosenthal).

Ο Stolla και συν. υπολόγισαν την συνολική ποσότητα αιμοπεταλίων σε κάθε μονάδα και τη σύγκριναν ως ποσοστό της αρχικής. Διαπίστωσαν σημαντική διαφορά της ποσότητας των αιμοπεταλίων μετά από 5 ημέρες στους 4°C σε σύγκριση με την αντίστοιχη ποσότητα αιμοπεταλίων μετά από 7 ημέρες στους 22°C. Στη συνέχεια ο αριθμός των αιμοπεταλίων δεν παρουσίασε σημαντική μείωση μέχρι και την 20η ημέρα φύλαξης στους 4°C. (Stolla, et al., 2020)



Εικόνα 19 Αποδόσεις αιμοπεταλίων in vitro: (Συνολική απόδοση αιμοπεταλίων στο προϊόν [Αριθμός αιμοπεταλίων × Όγκος = Απόδοση αιμοπεταλίων]) Τα αιμοπετάλια φυλάχθηκαν στο πλάσμα είτε για 7 ημέρες στους 22°C (συμπαγείς γκρι ράβδοι), 5 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C (λευκό με μαύρες διαγώνιες ρίγες), 10 ημέρες στους 4°C (κόκκινο με λευκά τετράγωνα), 15 ημέρες στους 4°C (μπλε με οριζόντιες λευκές ρίγες), 20 ημέρες στους 4°C (πράσινο με κάθετες λευκές ρίγες). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως το ποσοστό του αντίστοιχου φρέσκου δείγματος. ns = μη σημαντικό. ** $p < 0,01$, $n = 5$ για δείγματα RT, $n = 5-7$ για ομάδες ψυχρής αποθήκευσης. (Stolla, et al., 2020)

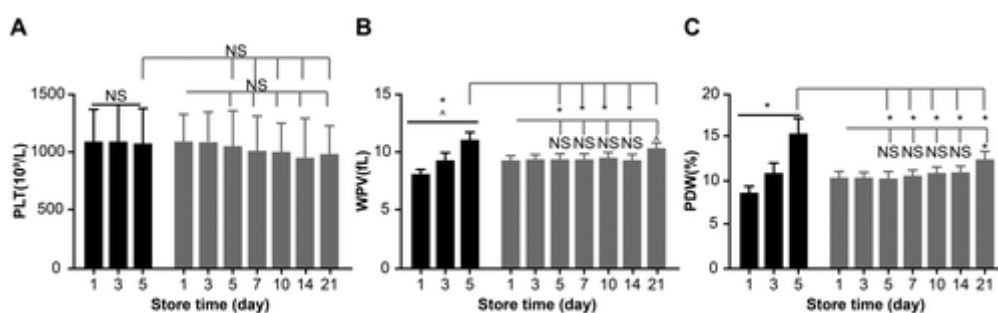
Παρόμοια ευρήματα είχαν και οι Reddoch και συν. το 2014 οι οποίοι παρατήρησαν σημαντική πτώση, της τάξης του 20%, του αριθμού των αιμοπεταλίων μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C. Αυτοί όμως απέδωσαν την πτώση στο σχηματισμό συσσωματωμάτων μέσα στους μικρούς ασκούς που χρησιμοποίησαν για αποθήκευση. Μάλιστα όταν

χρησιμοποίησαν κανονικού μεγέθους ασκούς οι μετρήσεις του αριθμού των αιμοπεταλίων ήταν συγκρίσιμες τόσο στους 4°C όσο και στους 22°C. (Reddoch, et al., 2014)

Ο Μέσος Όγκος Αιμοπεταλίων (MPV) παρέμεινε αμετάβλητος και στους 4°C και στη θερμοκρασία δωματίου, υποδηλώνοντας ότι το μέγεθος των αιμοπεταλίων δεν υπέστη σοβαρή μεταβολή. Αντίστοιχα ο MPC (mean platelet component) μειώθηκε σημαντικά μετά από αποθήκευση 5 ημερών σε θερμοκρασία δωματίου, υποδηλώνοντας την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων. (Reddoch, et al., 2014)

Ο Getz και οι συν. διαπίστωσαν μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων όταν αυτά αποθηκεύτηκαν στους 4°C για μια περίοδο 5 ημερών σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια των 22°C. Αυτή τη διαφορά την απέδωσαν στο σχηματισμό συσσωματωμάτων που ήταν και ορατά. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αποθήκευση στους 4°C οδηγεί σε μερική ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης GPIIb-IIIa που επιτρέπει έτσι τη δέσμευση του ινωδογόνου και τη συνακόλουθη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον όταν τα αιμοπετάλια αποθηκεύτηκαν σε 100% PAS, ο αριθμός τους διατηρήθηκε πρακτικά σταθερός και για τις 5 ημέρες παρατήρησης. (Getz, et al., 2016)

Ο Jiangcun και οι συν. διαπίστωσαν σταδιακή μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι και 21 ημέρες μετά τη συλλογή σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια θερμοκρασίας δωματίου 5 ημερών. Ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. (Jiangcun, et al., 2018)

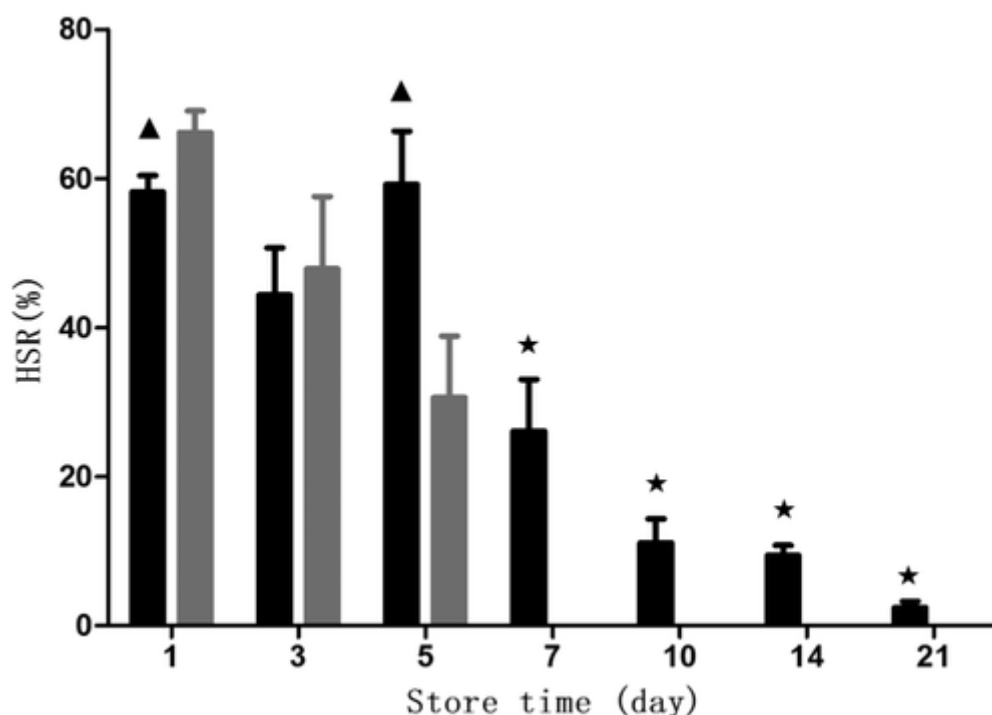


Εικόνα 20 Πλήρης αιματολογική εξέταση των PLT που αποθηκεύονται στους 4 (■) και 22°C (•). Αποτελέσματα των μετρήσεων PLT, MPV και PDW των PLT που αποθηκεύτηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες και χρόνους. * $p < 0,05$; NS = μη σημαντικό, $p > 0,05$. (Jiangcun, et al., 2018)

Ο μέσος όγκος των αιμοπεταλίων (MPV) και το εύρος κατανομής τους (PDW) παρουσίασαν σημαντική αύξηση στις 5 ημέρες αποθήκευσης στους 22°C. Τα αιμοπετάλια όμως που αποθηκεύτηκαν στους 4°C δεν παρουσίασαν αντίστοιχη μεταβολή στους δείκτες MPV και PDW για πάνω από 14 ημέρες αποθήκευσης. (Jiangcun, et al., 2018)

Η αντίδραση στο υποτονικό σοκ (HSR)

Ο Jiangcun και οι συν. διαπίστωσαν ότι οι ρυθμοί HSR των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν στους 4°C για όχι περισσότερο από 5 ημέρες δεν παρουσίασαν εμφανείς αλλαγές. Υπήρχε διαφορά ($p < 0,05$) στους ρυθμούς HSR μεταξύ των δύο ομάδων την 5^η ημέρα αποθήκευσης στους 22°C. Οι μειώσεις του ρυθμού HSR στις Ημέρες 7, 10, 14 και 21 αποθήκευσης στους 4°C ήταν όλες σημαντικά διαφορετικές ($p < 0,05$) από εκείνη της ημέρας 5 αποθήκευσης στους 22°C. (Jiangcun, et al., 2018)

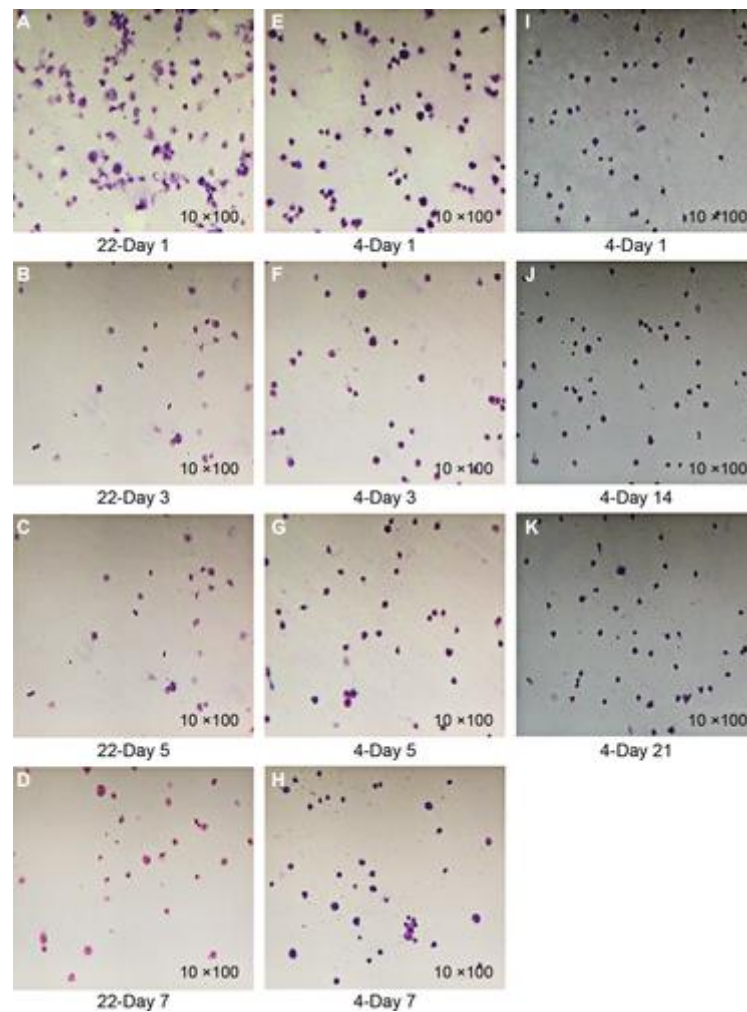


Εικόνα 21 Η HSR των PLT αποθηκεύονται υπό διαφορετικές συνθήκες. (▲) Σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων με τον ίδιο χρόνο αποθήκευσης ($p < 0,05$). (★) Σύγκριση μεταξύ PLT που αποθηκεύτηκαν στους 4°C (•; 7, 10, 14 και 21 ημέρες) και PLT που αποθηκεύτηκαν στους 22°C (■; 5 ημέρες, $p < 0,05$). (Jiangcun, et al., 2018)

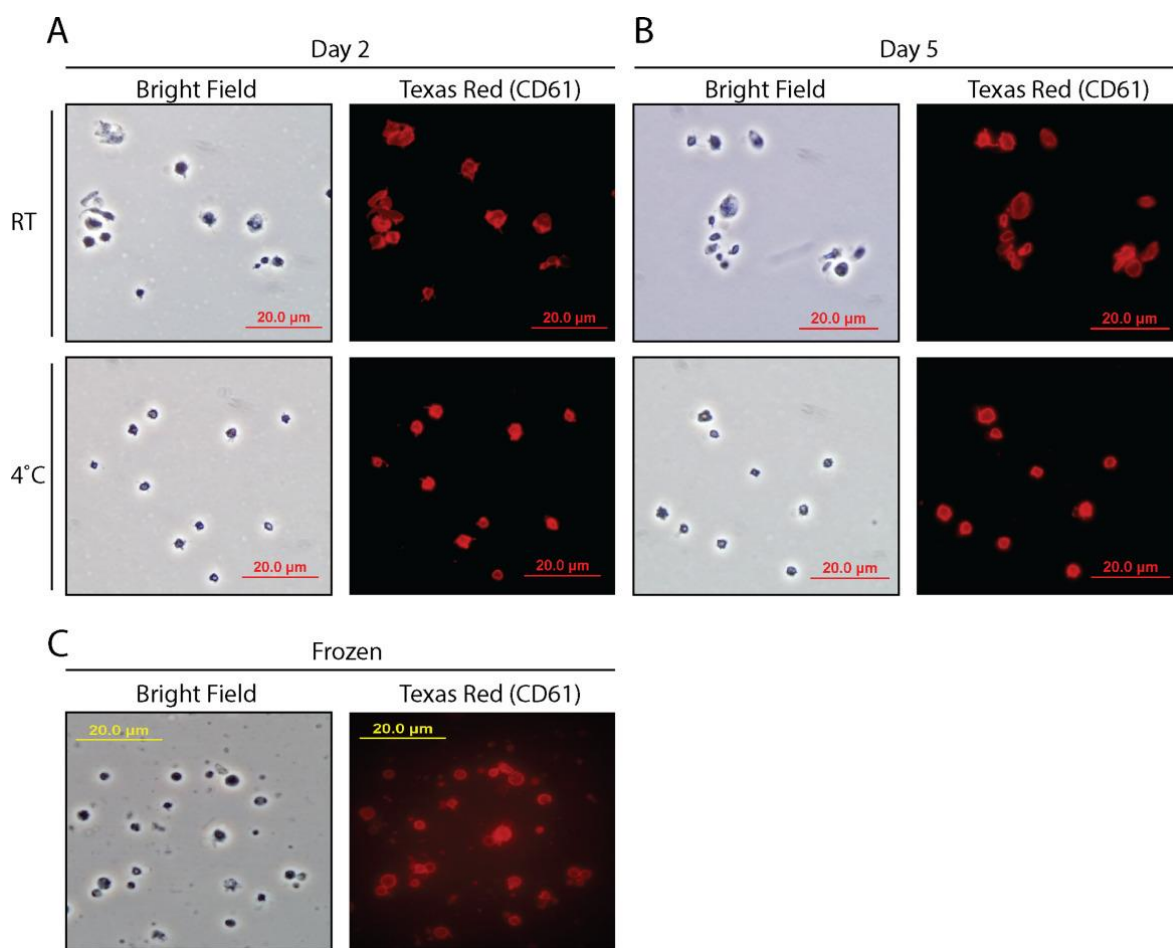
Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο Jiangcun και οι συν. μελέτησαν αποθηκευμένα αιμοπετάλια στους 4°C και 22°C σε οπτικό μικροσκόπιο με χρώση Wright. Δεν διαπίστωσαν σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία και το μέγεθος των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Διατηρούσαν ομοι-

όμορφη δομή, ακανόνιστο σχεδόν κυκλικό σχήμα και λίγες συσσωρεύσεις. Τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν στους 22°C εμφανίζονταν πιο αχνά χρωματισμένα και σε μικρότερους αριθμούς. (Jiangcun, et al., 2018)

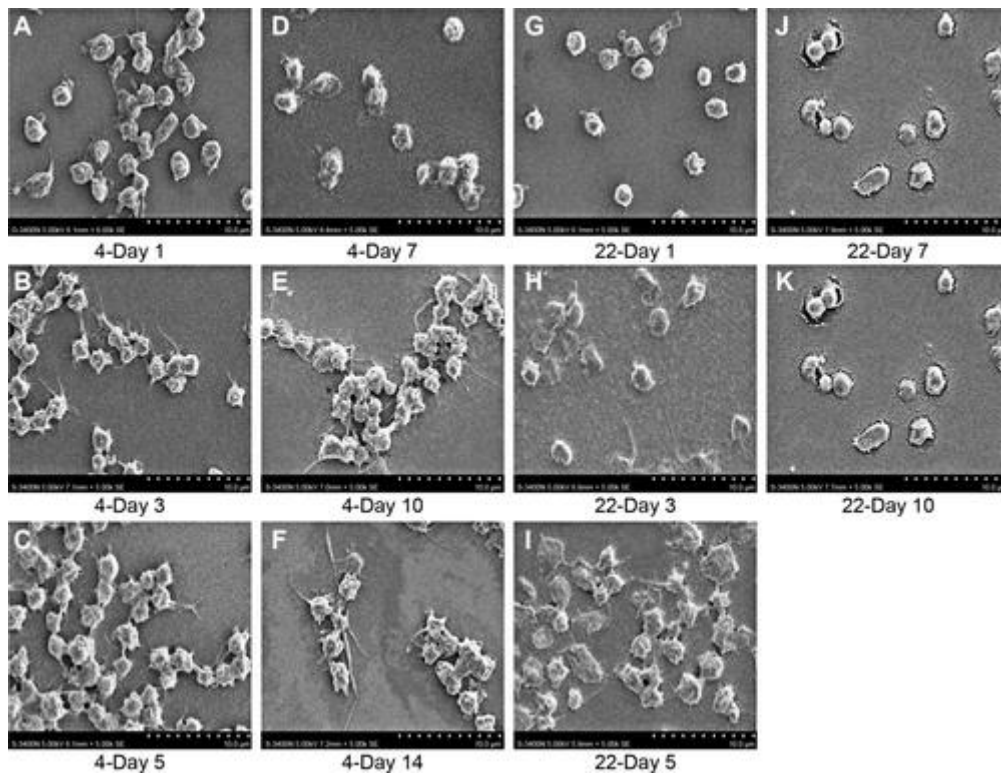


Εικόνα 22 Μικροσκοπική εξέταση των επιχρισμάτων με τη χρώση Wright αιμοπεταλίων αποθηκευμένων στους 4°C (4-) και στους 22°C (22-). (AD) Αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης των επιχρισμάτων με τη χρώση Wright τις Ημέρες 1, 3, 5 και 7 αποθήκευσης στους 22°C, αντίστοιχα. (ΕΚ) Αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης των επιχρισμάτων με τη χρώση Wright τις Ημέρες 1, 3, 5, 7, 10, 14 και 21 αποθήκευσης στους 4°C, αντίστοιχα. (Jiangcun, et al., 2018)



Εικόνα 23. Η μορφολογία των αιμοπεταλίων άλλαξε με την αποθήκευση σε ψύξη και κρυοσυντήρηση. Τα δείγματα σταθεροποιήθηκαν με παραφορμαλδεΐδη και χρωματίστηκαν με έναν ειδικό για τα PLT δείκτη, GPIIb (CD61-APC). Η μορφολογία PLT απεικονίστηκε με μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας ρυθμίσεις φωτεινού πεδίου και φθορισμού (κόκκινο του Τέξας). Εμφανίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες για PLT την (Α) Ημέρα 2 και (Β) Ημέρα 5 και (Γ) κατεψυγμένα δείγματα. (Johnson, et al., 2016)

Ο Jiangcun και οι συν. μελέτησαν τα αποθηκευμένα στους 4°C και 22°C αιμοπετάλια και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (scanning electron microscope) (SEM). Τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια, ήδη από τις πρώτες ημέρες (1-3-5) αποθήκευσης εμφάνιζαν τάση για συσσωμάτωση και ενεργοποίηση. Παρουσίαζαν πολλά και μακριά ψευδοπόδια και ακανόνιστη μορφολογία. Τα αιμοπετάλια από την άλλη πλευρά που αποθηκεύτηκαν στους 22°C εμφάνιζαν περισσότερο κυκλικό σχήμα και μικρή τάση ενεργοποίησης. Μετά από 3 ημέρες άρχισαν να μειώνονται σε αριθμό και κάποια από αυτά καταστρέφονταν. Τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 7, 10, και 14 ημέρες δεν έδειξαν εμφανείς αλλαγές στους όγκους τους και οι επιφάνειές τους ήταν τραχιές, εμφανίζοντας σαφώς μακρά ψευδοπόδια με σημαντικό βαθμό συσσωμάτωσης και ενεργοποίησης. (Jiangcun, et al., 2018)



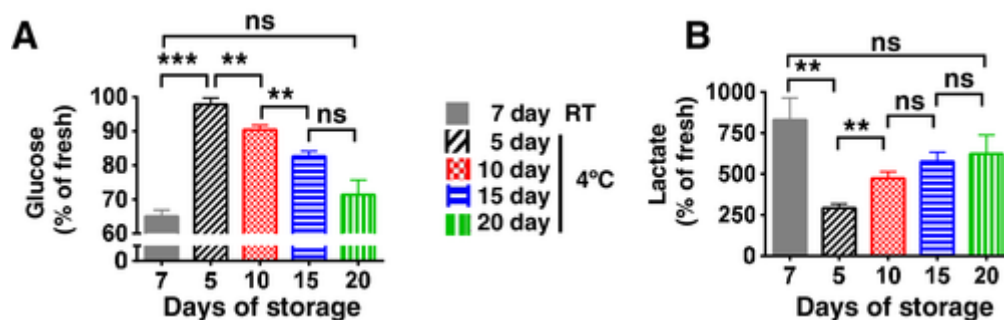
Εικόνα 24 Αποτελέσματα της εξέτασης των επιφανειών PLT που αποθηκεύτηκαν στους 4°C (4-) και 22°C (22-) με το SEM. (ΑΓ) Αποτελέσματα παρατήρησης των PLT που αποθηκεύτηκαν στους 4°C για τις Ημέρες 1, 3, 5, 7, 10 και 14, αντίστοιχα. (ΓΚ) Αποτελέσματα παρατήρησης των PLT που αποθηκεύτηκαν στους 22°C για τις Ημέρες 1, 3, 5, 7 και 10, αντίστοιχα.

3.4 Δείκτες μεταβολισμού των αιμοπεταλίων

Ο Stolla και οι συν. διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα γλυκόζης ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε δείγματα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου σε σύγκριση με δείγματα ψυχρής αποθήκευσης 5 ημερών ($65 \pm 2\%$ έναντι $98 \pm 2\%$, $p < 0,0001$). Αντίθετα, υπήρξε σταδιακή μείωση στα ψυχρά αιμοπετάλια από τις 5 έως τις 20 ημέρες αποθήκευσης, η οποία ήταν σημαντική μεταξύ 5 και 10 ημερών και 10 και 15 ημερών ($98 \pm 2\%$ έναντι $90 \pm 1\%$, $p = 0,007$ και $90 \pm 1\%$ έναντι $83 \pm 2\%$, $p = 0,003$ αντίστοιχα). Δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αιμοπεταλίων 20 ημερών που είναι αποθηκευμένα στους 4°C και των αιμοπεταλίων 7 ημερών που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου. (Stolla, et al., 2020)

Αντίστοιχα οι Reddoch και συν. που μελέτησαν τα αιμοπετάλια μέχρι την 5η ημέρα διαπίστωσαν αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης από τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (8% και 25% την 3η και 5η ημέρα αντίστοιχα). (Reddoch, et al., 2014)

Αντίστοιχα, η συγκέντρωση γαλακτικού ήταν σημαντικά υψηλότερη σε θερμοκρασία δωματίου από τα αιμοπετάλια ψυχρής αποθήκευσης 5 ημερών ($830 \pm 134\%$ έναντι $292 \pm 26\%$, $p = 0,003$) και παρατηρήθηκε μια σταδιακή, σημαντική αύξηση από 5 σε 10 ημέρες ($292 \pm 26\%$ έναντι $473 \pm 41\%$). Μετά από 10 ημέρες, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές. Παρόμοια με την ανάλυση γλυκόζης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 7 ημερών αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπεταλίων και του τελευταίου χρονικού σημείου της χρονικής περιόδου αποθήκευσης στους 4°C (20 ημέρες). (Stolla, et al., 2020)



Εικόνα 25 Παράμετροι μεταβολισμού αιμοπεταλίων in vitro: Επίπεδα γλυκόζης και γαλακτικού οξέος που μετρήθηκαν με αναλυτή αερίων αίματος. Αποθήκευση RT επτά ημερών (γκρι ράβδοι), 5 ημέρες αποθήκευσης 4°C (λευκό με μαύρες διαγώνιες ρίγες), 10 ημέρες αποθήκευσης 4°C (κόκκινο με λευκά τετράγωνα), 15 ημέρες αποθήκευσης 4°C (μπλε με οριζόντιες λευκές ρίγες), 20 ημέρες αποθήκευσης 4°C (πράσινο με κάθετες λευκές ρίγες). (Α) Τα επίπεδα γλυκόζης που εμφανίζονται ως ποσοστό των αντίστοιχων φρέσκων δειγμάτων. (Β) Τα επίπεδα γαλακτικού οξέος που εμφανίζονται ως ποσοστό των αντίστοιχων νωπών δειγμάτων. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$; ns = μη σημαντικό, $n = 5$ για όλα τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου δείγματα, $n = 5-7$ για όλα τα δείγματα ψυχρής αποθήκευσης. (Stolla, et al., 2020)

Οι Reddoch και συν. διαπίστωσαν αύξηση του γαλακτικού οξέος 300% και 600% την 3η και 5η ημέρα της αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου. Από την άλλη πλευρά στα εν ψυχρώ αιμοπετάλια η αύξηση του γαλακτικού ήταν μόνο 150% και 225% τις αντίστοιχες ημέρες φύλαξης.

Ο Jiangcun και οι συν. διαπίστωσαν ότι όταν τα PLT αποθηκεύτηκαν στους 22°C , τα επίπεδα pH , Na^+ , Ca^+ , Cl^- , pCO_2 , pO_2 , γαλακτικού οξέος, HCO_3^- , ctCO_2 και $\text{Gap}(\text{K}^+)$ άλλαξαν σημαντικά ($p < 0,005$). Συγκεκριμένα, το pH παρουσίασε πτωτική τάση με την αύξηση του χρόνου αποθήκευσης και η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξήθηκε σημαντικά. Από τη άλλη, στους 4°C , το K^+ , το γαλακτικό οξύ και το χάσμα ανιόντων έτειναν

να αυξάνουν και η μερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα ($p\text{CO}_2$), η μερική πίεση του οξυγόνου ($p\text{O}_2$), των διττανθρακικών (HCO_3^-) και η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα (ctCO_2) έτεινε να μειώνεται. Οι μεταβολές αυτές γενικά στα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν στους 22°C ήταν σημαντικές και κυρίως το pH παρουσίασε πτωτική τάση με την αύξηση του χρόνου αποθήκευσης και η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξήθηκε σημαντικά. (Jiangcun, et al., 2018)

Ο Getz και οι συν. αξιολόγησαν το μεταβολισμό με δείκτη τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος. Διαπίστωσαν ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε PAS στους 4°C είχαν μειωμένο μεταβολικό ρυθμό σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια των 22°C. Τα δεδομένα τους συνάδουν με το γεγονός ότι η μειωμένη θερμοκρασία επιβραδύνει το μεταβολισμό, ενώ το οξικό νάτριο του PAS υποστηρίζει καλύτερα τις μεταβολικές ανάγκες των αιμοπεταλίων. (Bertolini, et al., 1992) (Sandgren, et al., 2006)

3.5 Δείκτες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

Απελευθέρωση μικροσωματιδίων

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles) (EVs) είναι σωματίδια που παράγονται φυσικά από τα κύτταρα και οριοθετούνται από λιπιδική διπλοστιβάδα, ενώ δεν μπορούν να αναπαραχθούν. Το 90% των κυκλοφορούντων στο αίμα εξωκυτταρικών κυστιδίων προέρχεται από τα αιμοπετάλια. (Burnier, et al., 2009) Υπάρχει διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον ρόλο τους στην υγεία και τη νόσο και ήδη έχουν σχετιστεί με αγγειακές και μεταβολικές ασθένειες, αυτοάνοσα νοσήματα, τη φλεγμονή και τον καρκίνο. (Nomura, et al., 2009)

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης αρχικά είχαν χαρακτηριστεί σαν αιμοπεταλιακή σκόνη, υπονοώντας ότι αποτελούν τα κυτταρικά σκουπίδια των αιμοπεταλίων και των άλλων κυττάρων. Αποδείχθηκε στην πορεία ότι σχετίζονται με την ενεργοποίηση και τη γήρανση των αιμοπεταλίων και παίζουν πολλαπλούς ρόλους, όπως στην αθηρωμάτωση και τη θρόμβωση. Τα εξωκυτταρικά κυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς το μέγεθος, τη λιπιδική και πρωτεϊνική σύνθεση, την προέλευση και το μηχανισμό σχηματισμού τους (Pienimaeki-Roemer, et al., 2015)

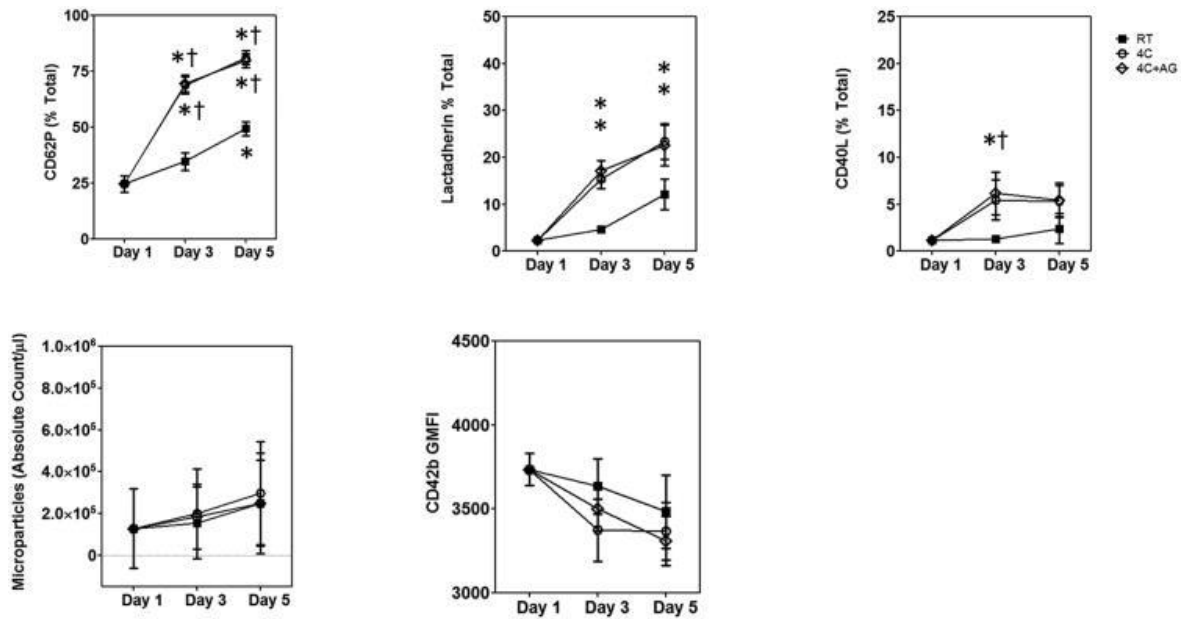
Η απελευθέρωση όμως μικροσωματιδίων αιμοπεταλίων είναι δείκτης για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και αυξάνεται με τον χρόνο αποθήκευσης στα προϊόντα αιμοπεταλίων. Οι Stolla και συν. δεν βρήκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποθηκευμένων σε RT 7 ημερών και των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν στους 4°C 5 ημερών. Υπήρξε μια σταδιακή αύξηση στα μικροσωματίδια στα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια από 5 σε 20 ημέρες, η οποία ήταν σημαντική όταν οι τιμές των 20 ημερών συγκρίθηκαν με αυτές των 7 ημερών σε RT ($2326 \pm 567\%$ έναντι $235 \pm 32\%$, $p = 0,0095$). (Stolla, et al., 2020)

Αποκοκκίωση αιμοπεταλίων

Η P-σελεκτίνη (P-selectin) είναι διαμεμβρανικό μόριο προσκόλλησης που εντοπίζεται στην επιφάνεια και των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Πριν την ενεργοποίηση εντοπίζεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και μάλιστα στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης τους. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, με τη δράση αγωνιστών όπως η θρομβίνη, το κολλαγόνο ή το ADP, οδηγεί στην αποκοκκίωσή τους. Έτσι η μεμβράνη των α κοκκίων συντήκεται με την πλασματική μεμβράνη και η P-σελεκτίνη παρουσιάζεται πλέον στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του αιμοπεταλίου. Η P-σελεκτίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την προσκόλληση σε περιοχές αγγειακής βλάβης και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους. (Merten & Thiagarajan, 2000)

Η αποκοκκίωση των α κοκκίων των αιμοπεταλίων είναι ένα από τα χαρακτηριστικά γνώρισμα της αποθηκευτικής βλάβης των αιμοπεταλίων. Η έκφραση της P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια, η οποία αναφέρεται και ως CD62P, είναι ένας χρήσιμος δείκτης της ενεργοποίησής τους. Η ανίχνευσή της γίνεται με κυτταρομετρία ροής και τη χρήση κατάλληλου αντισώματος (αντι-CD62-P) συζευγμένο με κατάλληλη φθορίζουσα ουσία.

Οι Reddoch και συν. παρατήρησαν μια σημαντική αύξηση στο ποσοστό των αιμοπεταλίων που εκφράζουν P-σελεκτίνη (CD62-P) κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τόσο σε θερμοκρασία δωματίου όσο και στους 4°C. Τα αποθηκευμένα στους 4°C αιμοπετάλια έδειξαν μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση του CD62-P σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου. (Reddoch, et al., 2014)



Εικόνα 26 Εκτίμηση των επιπέδων των επιφανειακών υποδοχέων με κυτταρομετρία ροής. (Α) Ρ-σελεκτίνη; (Β) δέσμευση λακταδερίνης (έκθεση PS). (C) έκφραση CD40L. (Δ) Απελευθέρωση μικροσωματιδίων. και (Ε) GP Iba. Οι συνθήκες αποθήκευσης αντιπροσωπεύονται ως εξής: RT = ■; 4C = ○; 4C+AG = ◇. Τα επίπεδα έκφρασης αντιπροσωπεύονται ως μέσος όρος±SEM. (Reddoch, et al., 2014)

Ο Stolla και οι συν. εξέτασαν την έκφραση της Ρ-σελεκτίνης με την πρόοδο του χρόνου στους ασκούς αποθήκευσης (χωρίς διέγερση αγωνιστή). Βρήκαν μια τάση για υψηλότερη έκφραση της Ρ-σελεκτίνης μετά από 7 ημέρες σε σύγκριση με 5 ημέρες αποθήκευσης στο ψυγείο ($315 \pm 151\%$ έναντι $1013 \pm 368\%$, $p = 0,119$). Όταν τα αιμοπετάλια αποθηκεύτηκαν στους 4°C, υπήρχε μια συνεχής αύξηση στην αποκοκκίωση και μέχρι την ημέρα 20, το επίπεδο ήταν παρόμοιο και δεν εμφάνιζε σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε RT 7 ημερών ($841 \pm 215\%$ έναντι $1013 \pm 368\%$, $p = 0,685$).

Ο Getz και οι συν που μελέτησαν αιμοπετάλια διαλυμένα σε προσθετικό διάλυμα (65% PAS και 35% πλάσμα) δεν παρατήρησαν σημαντική διαφορά στην έκφραση της Ρ-σελεκτίνης σε όλη την περίοδο αποθήκευσης (5 ημέρες) ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία φύλαξης. (Getz, et al., 2016)

Αντίστοιχα ευρήματα είχαν και οι Sandgren και συν. για αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε PAS προερχόμενα από τη διάμεση στιβάδα (Buffy Coat). (Sandgren, et al., 2006)

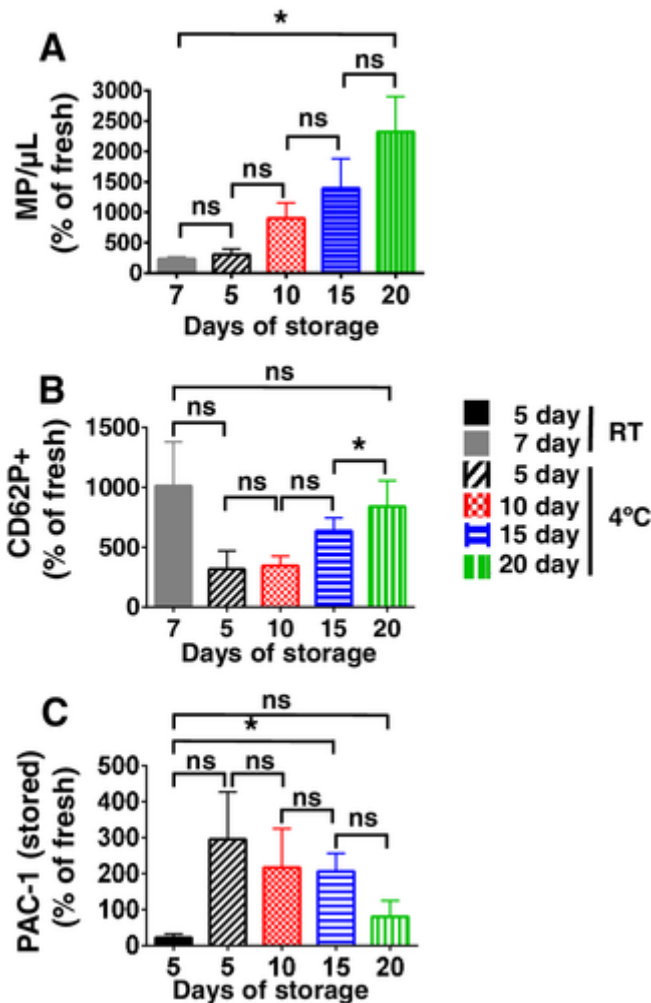
Ενεργοποίηση ιντεγκρίνης αIIbβ3 των αιμοπεταλίων

Οι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς gpIIb και gpIIIa μπορούν να σχηματίσουν σύμπλεγμα τη γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa (GPIIb/IIIa, επίσης γνωστή ως ιντεγκρίνη αIIbβ3 ή και CD41/CD61), όπως συμβαίνει κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου πυροδοτείται και εξαρτάται από την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Το σύμπλοκο του ενεργοποιημένου υποδοχέα gpIIb/IIIa δεσμεύει το ινωδογόνο κυρίως αλλά και τον παράγοντα von Willebrand (VWF) και παίζει ρόλο στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς αυτά συνδέονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση του ινωδογόνου. (Chen, et al., 2015)

Η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 των αιμοπεταλίων απαιτεί σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω και είναι κρίσιμη για τη συμμετοχή των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση στο σημείο της αγγειακής βλάβης.

Η αναζήτηση της ενεργοποιημένης δομής της GPIIb/IIIa γίνεται με την κυτταρομετρία ροής που επιτρέπει την ταχεία ανάλυση του υποδοχέα σε μεμονωμένα κύτταρα. Για την ανίχνευση αυτή χρησιμοποιείται το ειδικό αντίσωμα PAC-1 σημασμένο με το κατάλληλο φθοριόχρωμα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αναγνώριση των αιμοπεταλίων που φέρουν στην επιφάνεια τους την ενεργοποιημένη διαμόρφωση του υποδοχέα. (Frelinger, 2018)

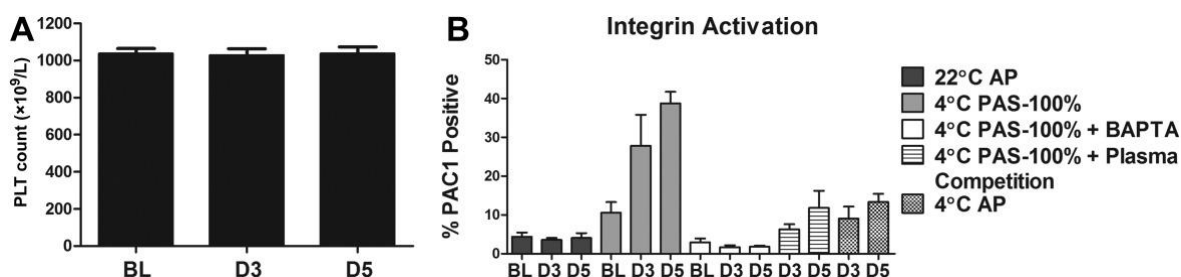
Ο Stolla και οι συν δοκίμασαν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο. Η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 των αιμοπεταλίων μετρήθηκε με το αντίσωμα PAC-1, το οποίο δεσμεύει ειδικά την ενεργό διαμόρφωση της ιντεγκρίνης. Όλα τα δείγματα ανταποκρίθηκαν κατάλληλα στο κολλαγόνο πριν από την αποθήκευση (φρέσκα αιμοπετάλια). Βρήκαν μια τάση για υψηλότερα επίπεδα δέσμησης PAC-1 σε ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια σε όλα τα χρονικά σημεία, αλλά λόγω της υψηλής μεταβλητότητας αυτής της ανάλυσης βρήκαν στατιστική σημασία μόνο μεταξύ αιμοπεταλίων ψυχρής αποθήκευσης 15 ημερών σε σύγκριση με RT- 5 ημερών αποθηκευμένα αιμοπετάλια στο ποσοστό σύγκρισης με τα φρέσκα αιμοπετάλια ($26,7 \pm 6,6$ έναντι $4,4 \pm 0,3$, $p = 0,018$). (Stolla, et al., 2020)



Εικόνα 27 Παράμετροι ενεργοποίησης αιμοπεταλίων *in vitro*: Αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε RT 5 ή 7 ημερών (μαύρες και γκρι ράβδοι αντίστοιχα), 5 ημέρες, 4°C-αποθηκευμένα (λευκά με μαύρες διαγώνιες ρίγες), 10-ημέρες αποθήκευση 4°C (κόκκινο με λευκά τετράγωνα), 15 ημέρες αποθήκευσης 4°C (μπλε με οριζόντιες λευκές ρίγες), 20 ημέρες αποθήκευσης 4°C (πράσινο με κάθετες λευκές ρίγες). (Α) Μικροσωματίδια (MP) που μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής ως ποσοστό φρέσκων δειγμάτων. Τα μικροσωματίδια μετρήθηκαν χωρίς προσθήκη αγωνιστή. (Β) Έκκριση άλφα κόκκων που μετρήθηκε με έκθεση σε Ρ-σελεκτίνη με κυτταρομετρία ροής (εμφανίζεται ως ποσοστό των αντίστοιχων φρέσκων δειγμάτων). Η Ρ-σελεκτίνη μετρήθηκε χωρίς προσθήκη αγωνιστή. (Γ) Η ενεργοποίηση ιντεγκρίνης αΙΙββ3 αιμοπεταλίων μετρήθηκε με δέσμευση αντισώματος PAC-1. Η δέσμευση του αντισώματος PAC-1 μετρήθηκε μετά από διέγερση με τον αγωνιστή κολλαγόνο στα 20 μg/mL. * $p < 0,05$; ns = μη σημαντικό, $n = 8$ για δείγματα που έχουν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου 5 ημερών, $n = 5$ για τα δείγματα που έχουν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου 7 ημερών, $n = 5-7$ για όλα τα δείγματα που έχουν αποθηκευτεί σε ψυχρή θερμοκρασία (Stolla, et al., 2020)

Ο Getz και οι συν. μελέτησαν την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης GPIIb-IIIa, υποδοχέα του ινωδογόνου σε αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε 100% PAS. Για την ανάδειξή της χρησιμοποιήθηκε χρώση PAC-1. Παρατηρήθηκε αύξηση της δέσμευσης του PAC-1 κατά την αποθήκευση στους 4°C για 5 ημέρες. Η ενεργοποίηση αυτή σχετίζεται με την αύξηση

του ενδοκυττάριου ασβεστίου κατά την ψύξη. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως χηλικός παράγοντας για το ασβέστιο η ουσία BAPTA-AM η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης GPIIb-IIIa καταργήθηκε. (Getz, et al., 2016)



Εικόνα 28 Αριθμός PLT και ενεργοποίηση ιντεγκρίνης. (A) Οι μετρήσεις PLT αξιολογήθηκαν για PLT που αποθηκεύτηκαν στους 4°C σε 100% PAS (■). (B) Η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αναλύθηκε με δέσμευση PAC-1 σε AP αποθηκευμένο στους 22 ή 4°C ή PLT αποθηκευμένα στους 4°C σε 100% PAS παρουσία ή απουσία 100 μmol/L BAPTA (n = 4). Για τη δοκιμασία ανταγωνισμού πλάσματος, 4°C 100% αποθηκευμένα σε PAS PLT επώαστηκαν με PPP για 15 λεπτά πριν από τη χρώση PAC-1. (Getz, et al., 2016)

Ο Jiangsun και οι συν. μελέτησαν επίσης την κατάσταση ενεργοποίησης των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων με κυτταρομετρία ροής και τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (αντι-CD61, PAC-1 και CD62P) και διαπίστωσαν ότι όλα τα PLT βρίσκονταν σε τελευταία στάδια υψηλών δραστηριοτήτων τις Ημέρες 1 έως 5 αποθήκευσης στους 22°C, με το ποσοστό έκφρασης του PAC-1-,62p+ να είναι 80% έως 90%. Για αποθήκευση στους 4°C, τα αιμοπετάλια βρίσκονταν στα μεσαία έως τα τελευταία στάδια ενεργοποίησης, με το ποσοστό έκφρασης του PAC-1-,62p+ να είναι 30% έως 60%, και την ημέρα 7 αποθήκευσης, το ποσοστό ήταν περισσότερο από 60%. , υποδεικνύοντας ότι τα PLT βρίσκονταν σε μεταγενέστερο στάδιο ενεργοποίησης. Ωστόσο, δεν υπήρχε διαφορά στο συνολικό ποσοστό ενεργοποίησης του CD62P μεταξύ των δύο ομάδων, καθώς και οι δύο είχαν υψηλή δραστηριότητα και ο ρυθμός ενεργοποίησης του CD62P ήταν περισσότερο από 80%.(βλ. πιν 2) (Jiangsun, et al., 2018)

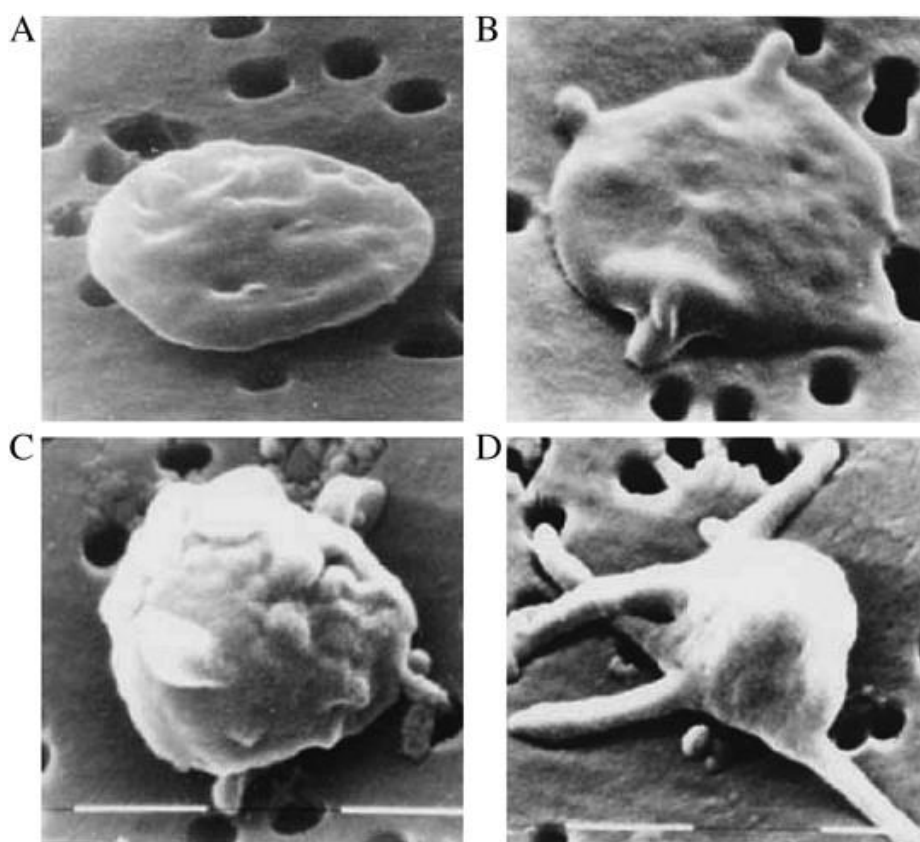
Δείκτης	Κατά- σταση αποθή- κευσης	1	3	5	7	10	14	21
PAC-1 + 62p- (%)	4°C	3,12 ± 2,73 β	2,36 ± 1,42 β	0,86 ± 1,05 β	1,09 ± 0,52 γ	0,13 ± 0,09	0,09 ± 0,06	0,19 ± 0,12
	22°C	0,18 ± 0,14	0,24 ± 0,38	0,27 ± 0,26				
PAC-1 + 62p+ (%)	4°C	34,88 ± 25,93 β	59,95 ± 21,1 β	36,78 ± 29,37 β	32,86 ± 16,47 γ	20,06 ± 15,35 γ	8,91 ± 8,15	27,44 ± 13,66 γ
	22°C	5,91 ± 7,33	2,99 ± 3,26	6,56 ± 6,21				
PAC-1- 62p+ (%)	4°C	44,87 ± 15,07 β	31,43 ± 15,99 β	57,92 ± 28,85 β	60,06 ± 15,14 γ	76,71 ± 14,29 γ	85,99 ± 7,5	69,22 ± 12,08 γ
	22°C	83,51 ± 7,23	89,18 ± 4,5	88,53 ± 7,66				
CD62p (%)	4°C	82,88 ± 12,18	93,75 ± 4,36	95,56 ± 1,96	94,02 ± 2,6	96,9 ± 2,13	94,99 ± 2,87	96,85 ± 2,73
	22°C	89,59 ± 7,14	92,41 ± 3,76	95,36 ± 3,94				

Πίνακας 2 Αλλαγές στους δείκτες κυτταρομετρίας ροής των PLT που αποθηκεύονται υπό διαφορετικές συνθήκες (n = 19) (Jiangsun, et al., 2018)

3.6 Δείκτες απόπτωσης των αιμοπεταλίων

Η απόπτωση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός που καθορίζει τη διάρκεια ζωής του κυττάρου και απαιτεί ενέργεια για τη διεκπεραίωσή του. Στα αιμοπετάλια, που δεν διαθέτουν πυρήνα, η διαδικασία της απόπτωσης ακολουθεί την ενδογενή οδό που σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια.

Μια σειρά από παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι επάγουν την απόπτωση στα αιμοπετάλια. Τέτοιοι παράγοντες είναι, η θρομβίνη, ιοντοφόρα ασβεστίου, αντιαιμοπεταλιακά αντισώματα, ισχυρές διατμητικές τάσεις κατά τη ροή του αίματος αλλά και αυτή η φύλαξη των αιμοπεταλίων στις τράπεζες αίματος. (Leytin, 2012)



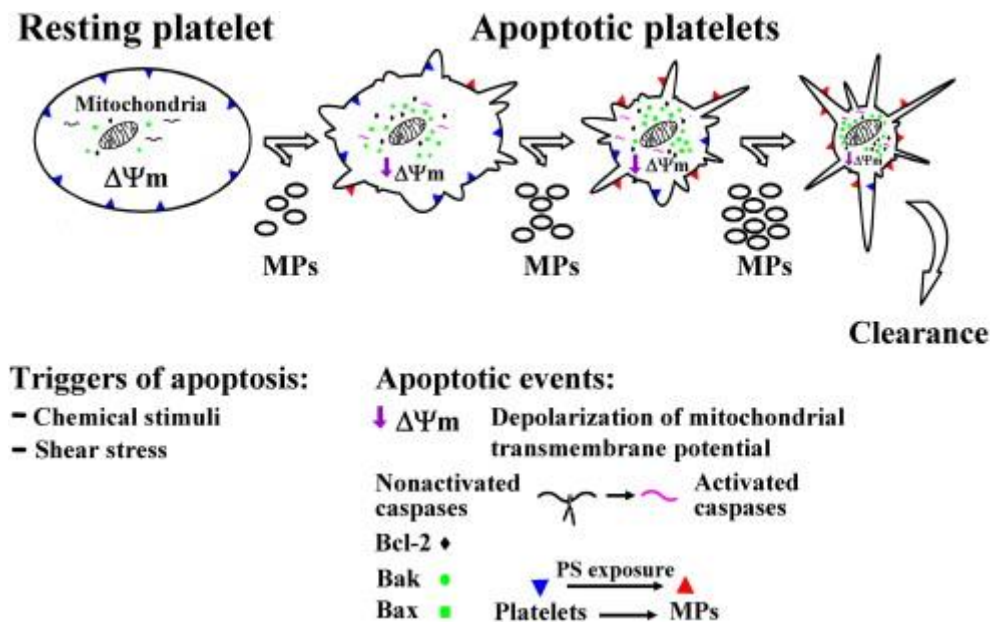
Εικόνα 29 Μορφολογία αποπτωτικών αιμοπεταλίων. Οι αποπτωτικές μορφολογικές αλλαγές στα αιμοπετάλια προκλήθηκαν από διάφορα αίτια. Μετά την απομόνωση, τα αιμοπετάλια σταθεροποιήθηκαν, εφαρμόστηκαν στο φίλτρο Nucleopore και αναλύθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Σημειώστε ότι αυτή η διαδικασία προκαλεί αποπτωτικές αλλαγές σε ένα μικρό κλάσμα απομονωμένων αιμοπεταλίων που μοιάζουν με αυτά των αποπτωτικών εμπύρηνων κυττάρων. Τα αιμοπετάλια σε ηρεμία (μη αποπτωτικά) έχουν δισκοειδές σχήμα με λεία κυτταρική επιφάνεια (A), τα αιμοπετάλια με αποπτωτική μορφολογία χαρακτηρίζονται από φυσαλίδες (B, C), προσεκβολή ψευδοποδίων (D), συρρίκνωση κυττάρων (D) και κατακερματισμό σε μικροσωματίδια (C, D). (Leytin, 2012)

Αυτά τα χημικά και φυσικά ερεθίσματα προκαλούν μετασχηματισμό των αιμοπεταλίων σε ηρεμία (μη αποπτωτικά) σε αποπτωτική κατάσταση. Ανάλογα με τη φύση της

ενεργοποίησης, αυτός ο μετασχηματισμός συνοδεύεται από διέγερση διαφόρων αποπτωτικών γεγονότων, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν:

- αποπόλωση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\Psi_m$)
- σχηματισμό Μεταβατικού Πόρου Μιτοχονδριακής Διαπερατότητας Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP)
- έκφραση προ-αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (όπως Bax, Bak and Bid),
- απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτοσόλιο,
- ενεργοποίηση ειδικών πρωτεασών για την ασπαρτική κυστεΐνη (κασπάσες),
- διάσπαση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού,
- έκθεση PS στο εξωτερικό της πλασματικής μεμβράνης,
- συρρίκνωση αιμοπεταλίων,
- αποβολή MPs που προέρχονται από αιμοπετάλια
- σχηματισμός ινιδώματος μεμβράνη αιμοπεταλίων

Η μελέτη των διαδικασιών απόπτωσης των αιμοπεταλίων συνήθως περιλαμβάνουν μεθόδους όπως η κυτταρομετρία ροής, η ανάλυση Western Blot και η ηλεκτρονική μικροσκοπία. (Gyulkhandanyan, et al., 2012)



Εικόνα 30 Μοντέλο απόπτωσης αιμοπεταλίων και κάθαρσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από χημικά ερεθίσματα και διατμητικές τάσεις. Η απόπτωση μπορεί να πυροδοτηθεί σε αιμοπετάλια ηρεμίας από πολλαπλά χημικά ερεθίσματα και πολύ υψηλές παθολογικές τάσεις διάτμησης προκαλώντας μετασχηματισμό των αιμοπεταλίων σε ηρεμία (μη αποπτωτικά) σε αποπτωτική κατάσταση. Ανάλογα με τη φύση της ενεργοποίησης της απόπτωσης, αυτός ο μετασχηματισμός

συνοδεύεται από διέγερση αποπτωτικών γεγονότων, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν εκπόλωση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ($\Delta\Psi_m$), σχηματισμό μεταβατικού πόρου της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP), έκφραση, ενεργοποίηση και μετατόπιση σε μιτοχόνδρια προ-αποπτωτικών μελών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (όπως Bax, Bak και Bid), απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτοσόλιο, ενεργοποίηση των κασπασών 3, 9 και 8, διάσπαση πρωτεϊνών κυτταροσκελετού, έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, συρρίκνωση αιμοπεταλίων, απόρριψη μικροσωματιδίων που προέρχονται από αιμοπετάλια και τέλος μπορεί να οδηγήσει στην κάθαρση των αποπτωτικών αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία (Gyulkhandanyan, et al., 2012)

Ο Stolla και συν. προκειμένου να συγκρίνουν τις διαδικασίες απόπτωσης μεταξύ των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε ψύξη και αυτών που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου εξέτασαν:

Την ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης,

Την ενεργοποίηση της κασπάσης 3, 7

και την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης.

Ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης,

Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων έχει την ικανότητα να διατηρεί διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού ως αποτέλεσμα της κλίσης συγκέντρωσης πρωτονίων. Το δυναμικό αυτό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης $\Delta\Psi_m$ διαταράσσεται μετά την ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών.

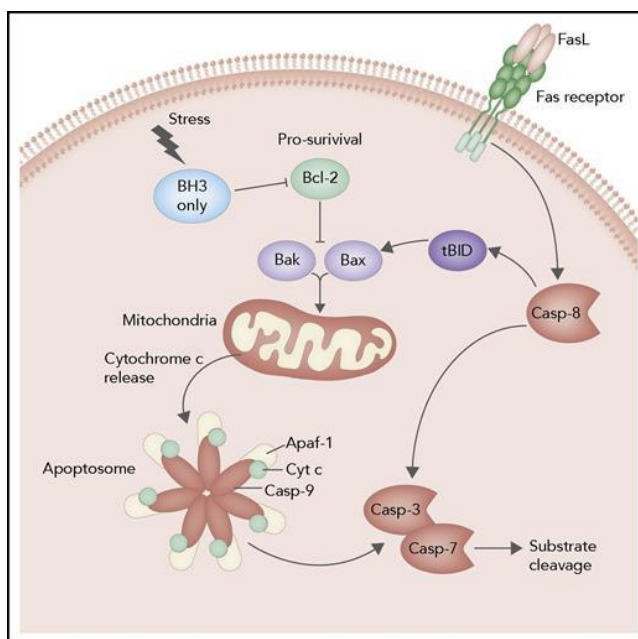
Ο κυτταρομετρικός προσδιορισμός του δυναμικού της μιτοχονδριακής εσωτερικής μεμβράνης $\Delta\Psi_m$ γίνεται με τη χρήση των κατάλληλων φθοριζόντων ανιχνευτών όπως ο DiOC 6 και ο JC-1. Πρόκειται για κατιονικές ουσίες που εισέρχονται στα κύτταρα και συγκεντρώνονται μέσα στη μιτοχονδριακή ουσία οδηγούμενη από το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης $\Delta\Psi_m$. Η ενεργοποίηση της απόπτωσης οδηγώντας στη διαταραχή του δυναμικού έχει αποτέλεσμα το μειωμένο φθορισμό των αιμοπεταλίων.

Ο Stolla και οι συν. αξιολόγησαν την ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τη χρωστική JC-1. Όταν η χρωστική είναι πολύ συγκεντρωμένη στα μιτοχόνδρια, σχηματίζει συσσωματώματα J με μέγιστη εκπομπή στα 590 nm περίπου (FL2). Αντίθετα όταν αραιώνεται περισσότερο στο κυτταρόπλασμα, η χρωστική εκπέμπει σε περίπου 530 nm (FL1). Χρησιμοποιήθηκε ο αποζεύκτης βαθμίδας πρωτονίων καρβονυλοκυανίδιο m-χλωροφαινυλδραζίνη (CCCP) ως θετικό control, για να

δειχθεί η επιτυχής διακοπή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Όλα τα φρέσκα δείγματα έδειξαν σημαντική πτώση της αναλογίας FL2/FL1 μετά την προσθήκη CCCP στο δείγμα. Κατά τον έλεγχο των αποθηκευμένων δειγμάτων, βρέθηκε σημαντικά μειωμένη αναλογία FL2/FL1 σε αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε RT 5 ημερών, σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν εν ψυχρώ στις 5 ημέρες ($2 \pm 1\%$ έναντι $184 \pm 62\%$, $p = 0,009$). Η διαφορά αυτή μάλιστα διατηρήθηκε και μέχρι τον μέγιστο χρόνο αποθήκευσης. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η φύλαξη εν ψυχρώ σχετίζεται με διατήρηση της μιτοχονδριακής ακεραιότητας και λειτουργικότητας ($2 \pm 1\%$ έναντι $55 \pm 16\%$, $p = 0,004$).

Ενεργοποίηση της κασπάσης 3, 7

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, η διάσπαση της μιτοχονδριακής μεμβράνης ακολουθείται από την ενεργοποίηση της κασπάσης 3,7. (McArthur, et al., 2018)



Εικόνα 31 Η ενδογενής οδός απόπτωσης. Σε ένα υγιές κύτταρο, τα μέλη προεπιβίωσης (BCL2, BCL-XL, BCL2L2, MCL1 και BCL2A1) περιορίζουν τη δραστηριότητα των προθανάτων BAK και BAX. Τα σήματα στρες ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες μόνο BH3, οι οποίες υπερκαλύπτουν τις πρωτεΐνες προεπιβίωσης, ενεργοποιώντας έτσι το BAK και το BAX. Το τελευταίο ολιγομερίζεται και εισάγεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, προκαλώντας διαπερατότητα και απελευθέρωση του κυτοχρώματος από τα μιτοχόνδρια. Αυτό πυροδοτεί το σχηματισμό του αποπτοσώματος και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και του υπόλοιπου καταρράκτη της αποπτωτικής κασπάσης. Η εξωτερική οδός απόπτωσης επάγεται κατά τη δέσμευση συνδέτη με υποδοχείς θανάτου (π.χ. συνδέτης FAS [FasL] σε υποδοχέα FAS). Αυτό ξεκινά τη στρατολόγηση πρωτεϊνών προσαρμογής στην ενδοκυτταρική περιοχή του υποδοχέα, που έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8. Η ενεργή κασπάση-8 μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα τις κασπάσες 3 και

7. Επιπλέον, μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την εγγενή οδό διασπώντας το BID για την παραγωγή tBID, το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί το BAK και το BAX. Επαγγελματική εικονογράφιση από Somersault. (McArthur, et al., 2018)

Οι κασπάσες είναι ειδικές πρωτεάσες κυστεΐνης και εντοπίζονται κατεχοχίν στο κυτταρόπλασμα. Πρόδρομα ανενεργά μόρια, οι προκασπάσες, ενεργοποιούνται με διάσπαση προς το ενεργό μόριο.

Η αναζήτηση της δράσης τους στα κύτταρα γίνεται με κυτταρομετρία ροής και τη χρήση του κατάλληλου probe. Χρησιμοποιείται ο κατάλληλος συνδεδεμένος με φθοροορσκειΐνη ανιχνευτής FAM-DEVD-FMK που είναι ειδικός για την ενεργό μορφή της κασπάσης 3 και μετά την επώαση με τα υπό εξέταση αιμοπετάλια, μετράται ο φθορισμός με κυτταρόμετρο ροής. (Gyulkhandanyan, et al., 2012)

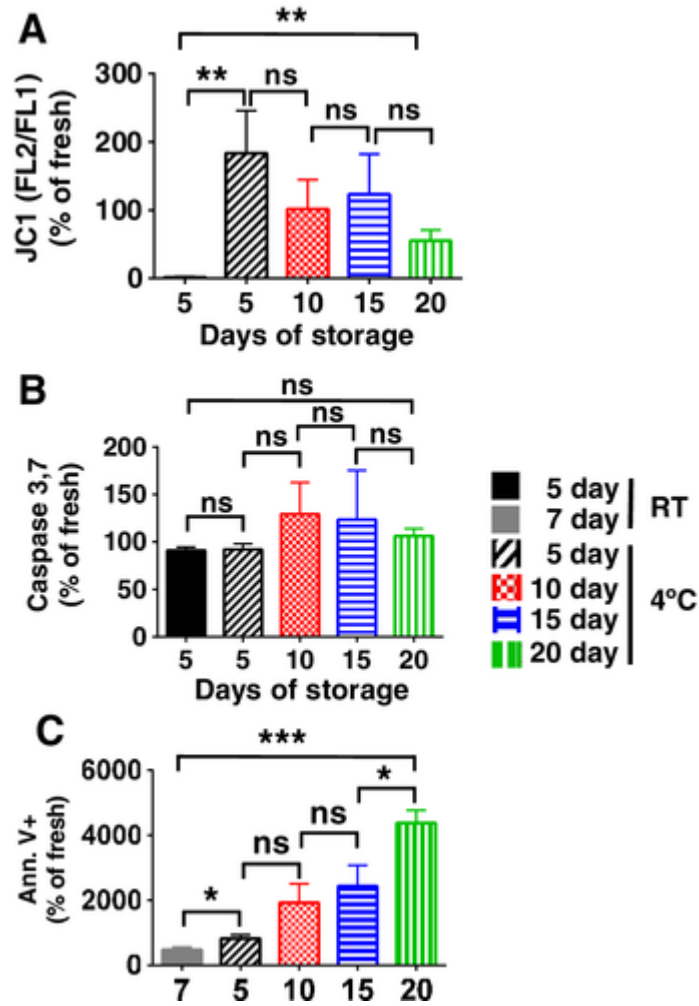
Αν και υπήρχε μια τάση αυξημένης ενεργοποίησης της κασπάσης 3 στα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν εν ψυχρώ μετά τις 10 και 15 ημέρες αποθήκευσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση δραστηριότητας για καμία συνθήκη φύλαξης. Για την επιβεβαίωση μάλιστα της ικανότητας των αιμοπεταλίων να υποστούν απόπτωση, χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control η επίδραση του αναστολέα BCL-2 και BCL-x1 ABT 737, που είχε σε όλα τα δείγματα αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης 3. (Stolla, et al., 2020)

Έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης.

Κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας ή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων η φωσφατιδυλοσερίνη, που εντοπίζεται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης εκτίθεται προς την εξωτερική πλευρά. Για την ανίχνευση αυτής της μετατόπισης χρησιμοποιείται κυτταρομετρία ροής και η αννεξίνη V συνδεδεμένη με PE ή FITC ως ανιχνευτές.

Ο Stolla και οι συν. χρωμάτισαν δείγματα με αννεξίνη V χωρίς αγωνιστή για ενεργοποίηση ή απόπτωση. Βρήκαν σημαντικά περισσότερη δέσμευση της αννεξίνης V σε αιμοπετάλια 5 ημερών σε ψυχρή αποθήκευση σε σύγκριση με αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου 7 ημερών. Τα ψυχρά αιμοπετάλια έδειξαν υψηλότερη έκθεση σε PS σε κάθε χρονικό σημείο και αυτό ήταν σημαντικό όταν η αποθήκευση 5 ημερών στους 4°C συγκρίθηκε με την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου 7 ημερών ($817 \pm 118\%$ έναντι $478 \pm 76\%$, $p = 0,043$), 15 ημέρες συγκρίθηκαν με 20 ημέρες ($2431 \pm 646\%$

έναντι $4376 \pm 390\%$, $p = 0,025$) και 20 ημέρες με 7 ημέρες σε RT ($4376 \pm 390\%$ έναντι $478 \pm 76\%$, $p < 0,0001$). (Stolla, et al., 2020)



Εικόνα 32 Παράμετροι απόπτωσης αιμοπεταλίων in vitro: Το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης των αιμοπεταλίων μετρήθηκε ως αναλογία κόκκινου JC-1 (FL2) προς πράσινο (FL-1). Πενθήμερη αποθήκευση σε 4°C (λευκό με μαύρες διαγώνιες ρίγες), 10 ημέρες 4°C σε αποθήκευση (κόκκινο με λευκά τετράγωνα), 15 ημέρες αποθήκευσης 4°C (μπλε με οριζόντιες λευκές ρίγες), 20 ημέρες 4°C–αποθηκευμένο (πράσινο με κάθετες λευκές ρίγες). (Α) Το JC-1 (FL2/FL1) αποθήκευσε δείγματα γραμμής βάσης ως ποσοστό των αντίστοιχων φρέσκων δειγμάτων γραμμής αναφοράς (προ-αποθήκευση) που εμφανίζεται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. (Β) Η ενεργοποίηση κασπάσης 3,7 εμφανίζεται ως ποσοστό του δείγματος πριν την αποθήκευση. (Γ) Σύνδεση της αννεξίνης V με κυτταρομετρία ροής ως ποσοστό φρέσκων δειγμάτων. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns = μη σημαντικό, $n = 4-7$ για δείγματα αποθηκευμένα σε RT 5 ημερών, $n = 5$ για δείγματα αποθηκευμένα σε RT 7 ημερών, $n = 5-7$ για όλα τα δείγματα ψυχρής αποθήκευσης. (Stolla, et al., 2020)

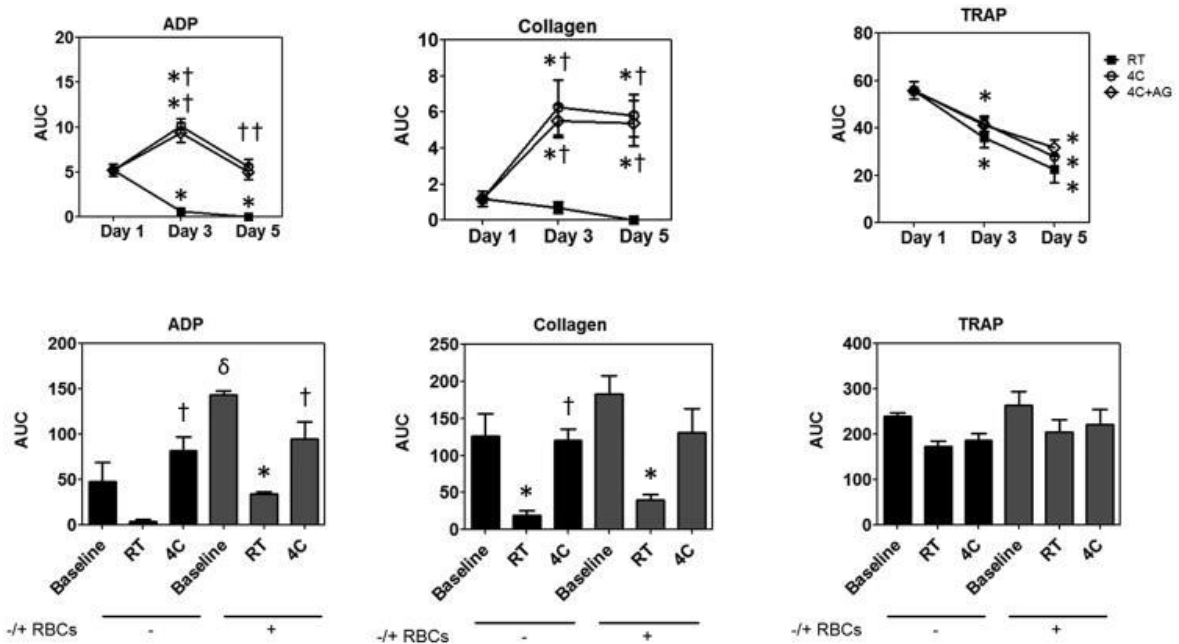
3.7 Αιμοπεταλιακές Λειτουργικές δοκιμασίες

Η απόκριση συσσωμάτωσης είναι η πιο συχνά μετρούμενη παράμετρος εκτίμησης της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας. Έχει αποδειχθεί ότι η *in vitro* συσσωρευσιμότητα συσχετίζεται σχετικά καλά με τις βαθμολογίες συσσωρευτικότητας σε ένα μοντέλο μετάγγισης *ex vivo*, (Shams Hakimi, et al., 2015) Επιπλέον κλινικά, η συσσωματομετρία σύνθετης αντίστασης συσχετίζεται ισχυρά με τις απαιτήσεις μετάγγισης μετά από καρδιοχειρουργική επέμβαση. (Görlinger, et al., 2013) (Romlin, et al., 2014) Αυτό υποδηλώνει ότι αυτές οι *in vitro* δοκιμές λειτουργίας μπορεί να είναι ένας χρήσιμος δείκτης της αιμοστατικής αποτελεσματικότητας αλλά απαιτείται περαιτέρω επικύρωση αυτών των μεθόδων.

Συσσωματομετρία

Η συσσωματομετρία σύνθετης αντίστασης (Impedance Aggregometry) εκτιμά την επαγόμενη από αγωνιστές ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η εκτίμηση γίνεται με τη μέτρηση της μεταβολής της αντίστασης μεταξύ δυο ηλεκτροδίων που βρίσκονται βυθισμένα μέσα στο δείγμα καθώς προστίθεται ο κατάλληλος αγωνιστής των αιμοπεταλίων και τα αιμοπετάλια συσσωματώνονται. Εκτιμάται το ύψος της καμπύλης συσσωμάτωσης, η ταχύτητα και η περιοχή κάτω από την καμπύλη AUC που αντανακλά τη συνολική αιμοπεταλιακή δραστηριότητα. (Bochsen, et al., 2011)

Οι Reddoch και συν μελέτησαν τη λειτουργικότητα των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων με τη χρήση συσσωματομετρίας σύνθετης αντίστασης. Διαπίστωσαν ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια συσσωματώνονται σημαντικά καλύτερα από τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και από τα φρέσκα αιμοπετάλια όταν διεγείρονται με ADP και κολλαγόνο. Ωστόσο, στην περίπτωση του TRAP, όλα τα προϊόντα αποθήκευσης είχαν μειωμένη ανταπόκριση σε σύγκριση με τα φρέσκα αιμοπετάλια ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων. (Reddoch, et al., 2014)



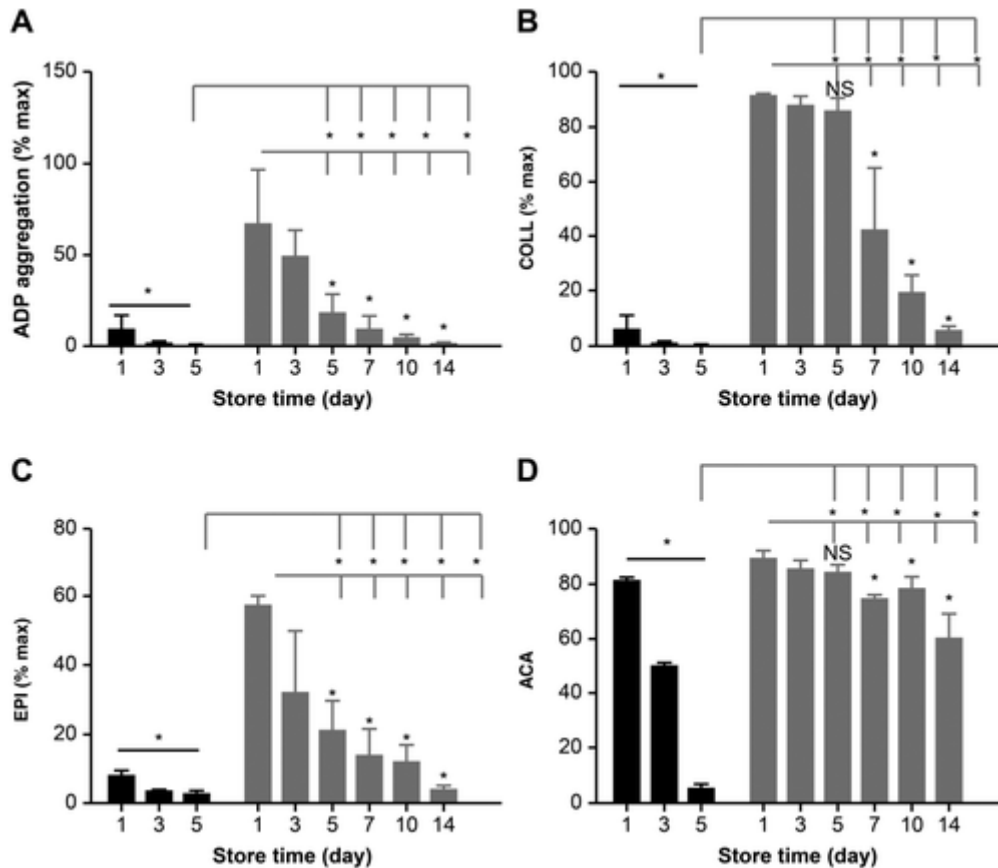
Εικόνα 33 Συσσωμάτωση αιμοπεταλίων χωρίς (A, B, C) και με RBC (D, E, F) όταν διεγείρονται με (A, D) ADP, (B, E) Collagen και (C, F) TRAP. Τα γραφήματα ράβδων D, E και F είναι συγκρίσεις μεταξύ της γραμμής βάσης έναντι της ημέρας 5 RT και του 4C AP. Οι συνθήκες αποθήκευσης αντιπροσωπεύονται ως εξής: RT = ■ ; 4C = ○ ; 4C+AG = ◇ . Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) αντιπροσωπεύεται ως μέσος όρος ± SEM. Οι τιμές AUC του RBC είναι υψηλότερες στα γραφήματα DF σε σύγκριση με το AC επειδή η συσσώρευση μετρήθηκε σε 12 λεπτά αντί για 6.) (Reddoch, et al., 2014)

Και ο Jiangcun και οι συν. μελέτησαν το ρυθμό συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από 4 αγωνιστές ADP, COLL, EPI και ACA. Μετά από 1 ημέρα αποθήκευσης στους 4°C, οι μέγιστοι ρυθμοί συσσώρευσης που προκλήθηκαν από τέσσερις επαγωγείς, ADP, COLL, EPI και ACA, ήταν 66,5 91,2 57,0 και 89,5%, αντίστοιχα. Ωστόσο, μετά από 1 ημέρα αποθήκευσης στους 22°C, οι μέγιστοι ρυθμοί συσσώρευσης που προκλήθηκαν από την ADP και την EPI ήταν μόνο 8,8 και 8%, αντίστοιχα, και υπήρχε σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης στη μέγιστη συσσώρευση που προκαλείται από τους τέσσερις επαγωγείς.

Όταν τα PLT αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 3 ημέρες, οι μέγιστοι ρυθμοί συσσώρευσης PLT που προκλήθηκαν από COLL και ACA παρέμειναν στο 85%, και οι ADP και EPI ήταν 48,9 και 32,0%, αντίστοιχα. Ωστόσο, σε αποθηκευμένα στους 22°C αιμοπετάλια για 3 ημέρες, ο μέγιστος ρυθμός συσσώρευσης PLT που προκλήθηκε από το ACA ήταν 49,8%, ενώ οι άλλοι τρεις μέγιστοι ρυθμοί συσσώρευσης ήταν χαμηλότεροι από 5%.

Όταν τα PLT αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 5 ημέρες, οι μέγιστοι ρυθμοί συσσώρευσης PLT που προκλήθηκαν από COLL και ACA παρέμειναν στο 80%, και οι ADP και EPI

ήταν 18,8 και 21,0%, αντίστοιχα. Όταν φυλάσσονταν στους 22°C για 5 ημέρες, όλοι οι μέγιστοι ρυθμοί συσσωμάτωσης που προκλήθηκαν από τους τέσσερις επαγωγείς ήταν χαμηλότεροι από 5%. Όταν τα PLT αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 10 έως 14 ημέρες, οι μέγιστοι ρυθμοί συσσωμάτωσης που προκλήθηκαν από το ACA ήταν 78,1 και 60,4%, αντίστοιχα. (Jiangsun, et al., 2018)



Εικόνα 34 Αλλαγές στις μεταβλητές συνάθροισης των PLT που αποθηκεύονται υπό διαφορετικές συνθήκες. Αποτελέσματα ADP, COLL, EPI και ACA των PLT που αποθηκεύτηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες και για διαφορετικούς χρόνους. * $p < 0,05$; NS = μη σημαντικό, $p > 0,05$. (Jiangsun, et al., 2018)

Θρομβοελαστογραφία(TEG)-Θρομβοελαστομετρία (TEM)

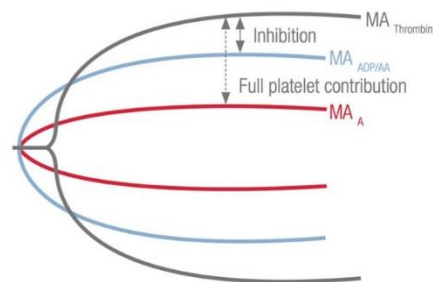
Οι ιξωδοελαστικές δοκιμασίες της πήξης μελετούν τις τάσεις που αναπτύσσονται κατά τη μετάβαση από τη ρευστή κατάσταση του αίματος στη στερεά μορφή κατά το σχηματισμό του θρόμβου. Τα ιδανικά στερεά είναι υλικά που παραμορφώνονται ελαστικά. Αντίθετα τα ιδανικά ρευστά παραμορφώνονται μη αντιστρεπτά.

Η TEG μετρά το χρόνο μέχρι τον αρχικό σχηματισμό ινώδους (χρόνος αντίδρασης ή R), το χρόνο μέχρι το σχηματισμό θρόμβου (χρόνος θρόμβου ή K), το ρυθμό σχηματισμού θρόμβου (γωνία α), τη δύναμη του θρόμβου (μέγιστο πλάτος ή MA) και τη λύση του θρόμβου στα 30 λεπτά (LY30). (Faraoni & DiNardo, 2021)

Global Hemostasis Cartridge



TEG PlateletMapping



Εικόνα 35 Συσκευή και φυσιγγίο TEG 6s. (Faraoni & DiNardo, 2021)



Εικόνα 36 ROTEM Sigma και φυσιγγίο. (Faraoni & DiNardo, 2021)

Οι Reddoch και συν. μελέτησαν το σχηματισμό θρόμβου και τη δύναμή του με τη χρήση της θρομβοελαστογραφίας. Διαπίστωσαν ότι:

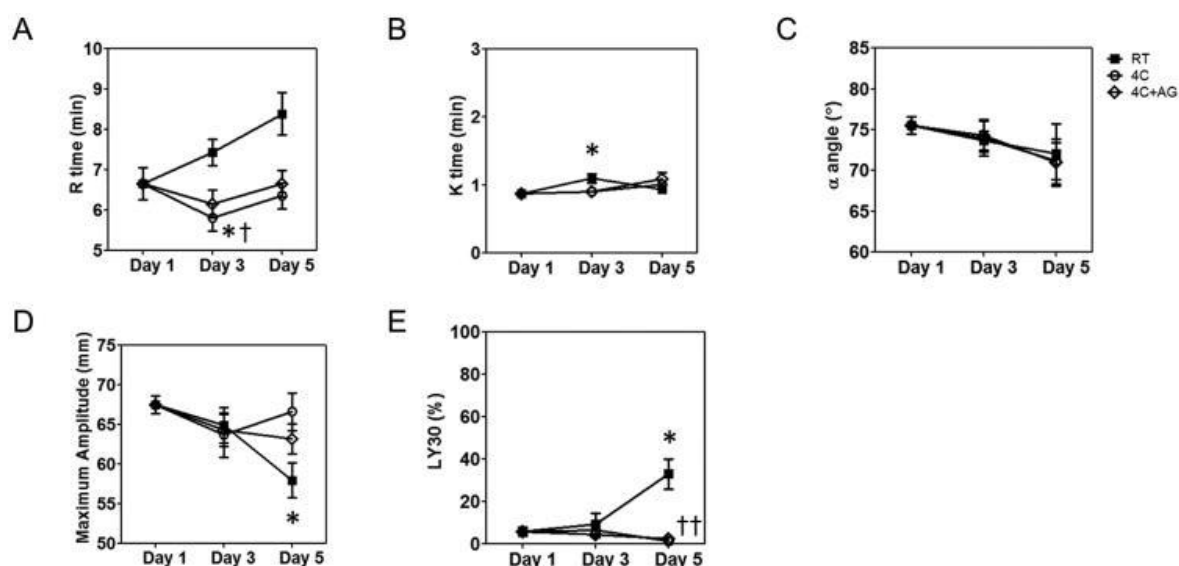
ο χρόνος μέχρι τον αρχικό σχηματισμό ινώδους, ο χρόνος R, ήταν σημαντικά ταχύτερος για τα αιμοπετάλια αποθήκευσης στους 4°C χωρίς ανάδευση, με αποτέλεσμα ταχύτερο σχηματισμό θρόμβων την Ημέρα 3, τόσο σε σύγκριση με την αρχική όσο και με την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου(RT).

Ο χρόνος δημιουργίας θρόμβου, K, για τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου(RT) ήταν στατιστικά διαφορετικός από την αρχική τιμή την Ημέρα 3, αλλά οι διαφορές ήταν κλινικά ασήμαντες.

Η γωνία α δεν άλλαξε σημαντικά από τη μέθοδο αποθήκευσης ή τη διάρκεια.

Η ισχύς του θρόμβου μειώθηκε σημαντικά την Ημέρα 5 για τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου(RT) αιμοπετάλια, αλλά παρέμεινε ανεπηρέαστη σε αιμοπετάλια αποθηκευμένα στους 4°C.

Η λύση του θρόμβου, όπως μετρήθηκε με LY30, αυξήθηκε σημαντικά μετά από 5 ημέρες για τα αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου(RT), αλλά παρέμεινε σταθερή για τα αιμοπετάλια που ήταν αποθηκευμένα στους 4°C.



Εικόνα 37 Μέτρηση ιδιοτήτων θρόμβου με θρομβοελαστογραφία. (Α) χρόνος R. (Β) K χρόνος. (Γ) γωνία α; (Δ) Μέγιστο πλάτος. Οι συνθήκες θεραπείας αντιπροσωπεύονται ως εξής: RT = ■; 4C = ○; 4C+AG = ◇. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύονται ως μέσος όρος ± SEM. (Reddoch, et al., 2014)

Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται στους 4°C διατηρούν την ικανότητα να υποστηρίζουν φυσιολογική πήξη, συγκρίσιμη με τα φρέσκα αιμοπετάλια ακόμη και μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης, ενώ τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (RT) αιμοπετάλια σχηματίζουν θρόμβους που είναι αδύναμοι και επιρρεπείς στη λύση. Αντιστρόφως, η αποθήκευση σε ψύξη ενίσχυσε την έναρξη του σχηματισμού ινώδους. (Reddoch, et al., 2014)

Και ο Jiangcun και οι συν. μελέτησαν με τη χρήση της θρομβοελαστογραφίας (TEG) το σχηματισμό θρόμβου και τη δύναμή του, συγκρίνοντας αιμοπετάλια αποθηκευμένα στους 22°C για 7 ημέρες και αιμοπετάλια αποθηκευμένα στους 4°C για μέχρι 21 ημέρες.

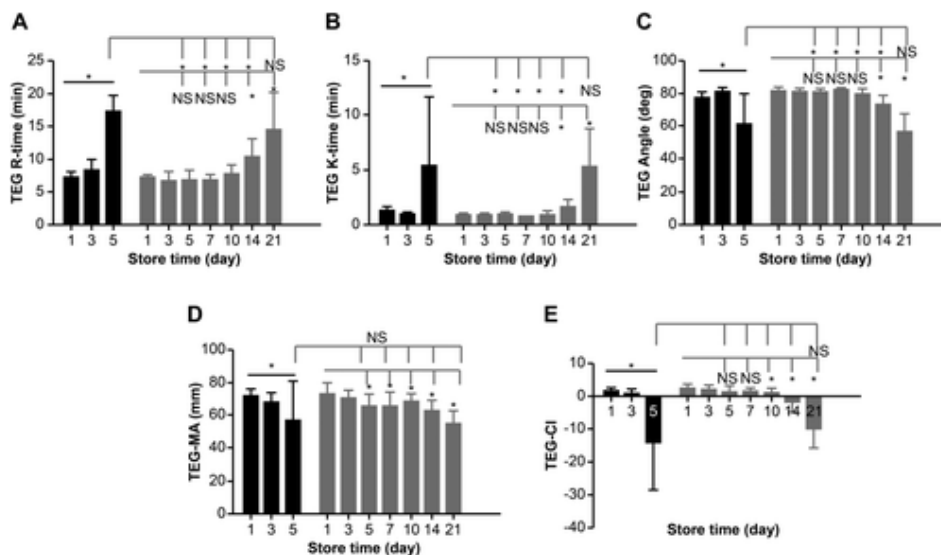
Διαπίστωσαν ότι υπήρχε μια σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) στις πέντε μεταβλητές TEG μεταξύ των δύο ομάδων όταν τα PLT αποθηκεύτηκαν στους 22°C μέχρι 5 ημέρες. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, ο χρόνος αντίδρασης (R) αυξήθηκε και η MA μειώθηκε και ο δείκτης πήξης (CI) έδειξε σημαντική αύξηση την 5η ημέρα αποθήκευσης.

Τις Ημέρες 3 και 5, το TEG-R ήταν χαμηλότερο στους 4°C από ότι στους 22°C ($p < 0,05$).

Τις Ημέρες 1 και 5, η κινητική TEG (K) ήταν χαμηλότερη στους 4°C από ότι στους 22°C ($p < 0,05$).

Τις Ημέρες 1 και 5, το TEG-α ήταν υψηλότερο στους 4°C παρά στους 22°C ($p < 0,05$).

Τις Ημέρες 1, 3 και 5, ο TEG-CI ήταν υψηλότερος στους 4°C παρά στους 22°C ($p < 0,05$).

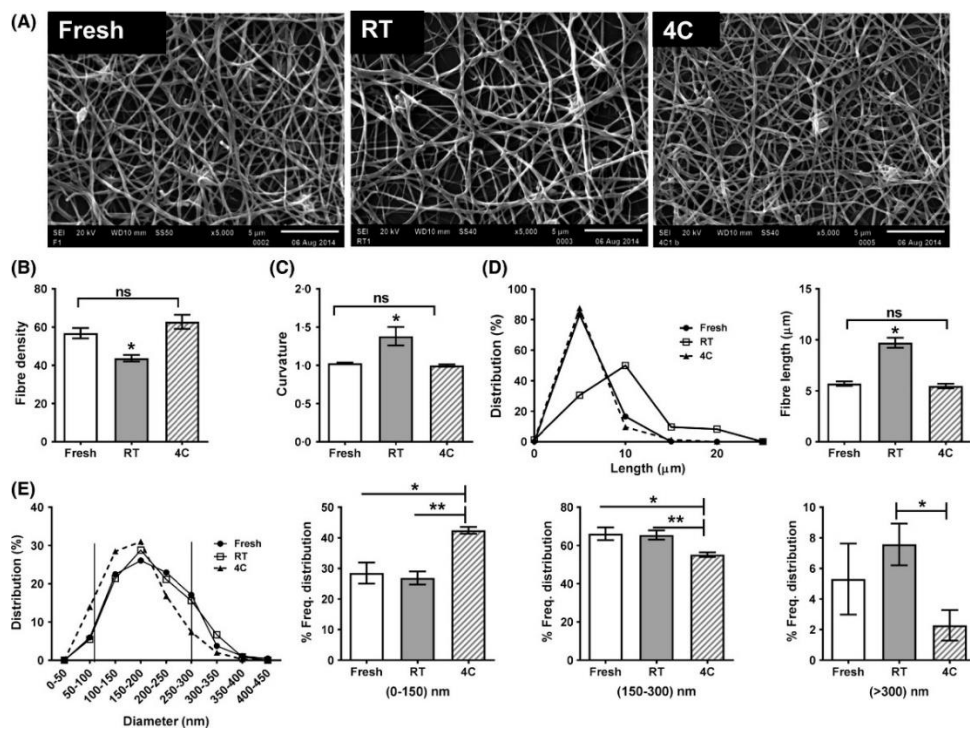


Εικόνα 38 Αλλαγές στις μεταβλητές TEG των PLT που αποθηκεύονται υπό διαφορετικές συνθήκες. Αποτελέσματα των TEG-R, TEG-K, TEG-α, TEG-MA και TEG-CI των PLT που αποθηκεύτηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες και για διαφορετικούς χρόνους. * $p < 0,05$; NS = μη σημαντικό, $p > 0,05$. κανονικό εύρος αναφοράς TEG: R, 5 έως 10 λεπτά. K, 1 έως 3 λεπτά. γωνία, 53-72°; MA, 50 έως 70 mm. CI, -3,0 έως 3,0. (●) 22°C; (■) 4°C. (Jiangcun, et al., 2018)

3.8 Η δομή του θρόμβου

Για τον αποτελεσματικό έλεγχο της αιμορραγίας ο ρόλος της ανάπτυξης ανθεκτικού και σταθερού θρόμβου είναι καθοριστικός. Οι Nair και συν. μελέτησαν τις ρεολογικές ιδιότητες του θρόμβου που σχηματίζεται από αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν εν ψυχρώ και σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποίησαν ρεομετρία κώνου και πλάκας σε συνδυασμό με δυναμική μηχανική ανάλυση (DMA). Ανέλυσαν επίσης τη θραύση του σχηματιζόμενου θρόμβου υπό διατμητική τάση. Ακόμη με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης εξέτασαν την υπερδομή του σχηματιζόμενου θρόμβου (βλ. Εικ.). Εκτίμησαν τέλος την παραγωγή θρομβίνης και τα επίπεδα του παράγοντα XIII.

Διαπίστωσαν ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια συνέβαλαν σημαντικά περισσότερο από τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (RT) τόσο στην ακαμψία του θρόμβου όσο και στην αντοχή του θρόμβου. Ακόμη αποφάνθηκαν ότι οι πιο ευθείες ίνες σε θρόμβους από τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρέχουν πιο σκληρούς και ισχυρότερους θρόμβους σε σχέση με τις λεπτότερες, λιγότερο πυκνές ίνες που σχηματίζονται από αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (RT) που καθιστούν τους θρόμβους λιγότερο άκαμπτους και ασθενέστερους (βλ. Εικ.).(Nair, et al., 2017)

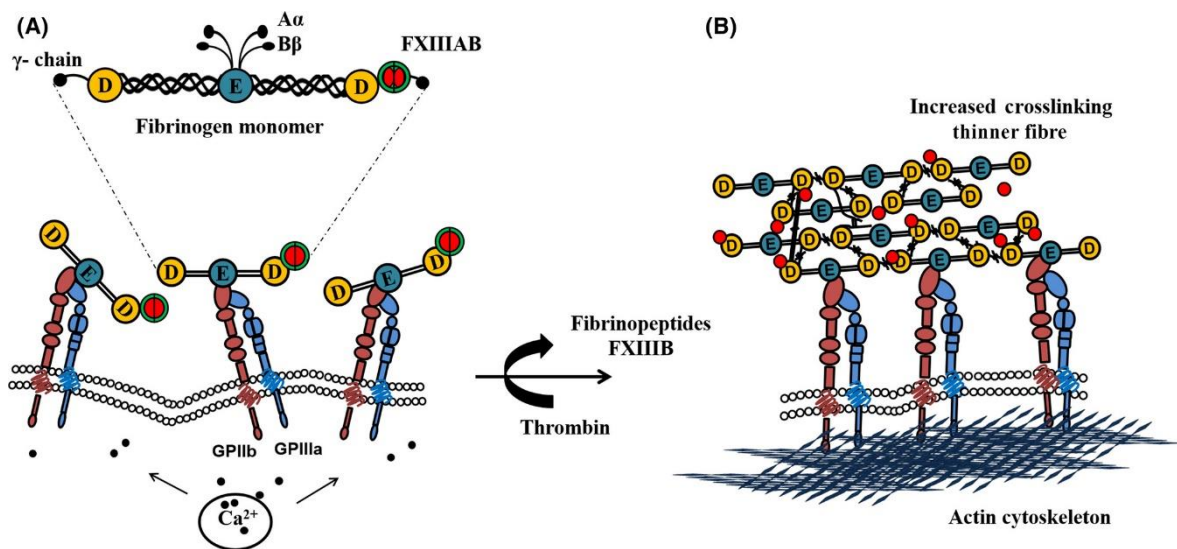


Εικόνα 39 Αρχιτεκτονική θρόμβων. Σχηματίστηκαν θρόμβοι από φρέσκα/αποθηκευμένα αιμοπετάλια με 20 mmol/l ασβεστό, σταθεροποιήθηκαν, χρωματίστηκαν, αφυδατώθηκαν και αναλύθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (5000x στα 20 kV, Jeol 6610LV· Jeol, Τόκιο, Ιαπωνία). (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες θρόμβων που σχηματίζονται από

φρέσκα και αποθηκευμένα αιμοπετάλια. (B–E) Ποσοτικοποίηση της μορφολογίας των θρόμβων από φρέσκα και αποθηκευμένα αιμοπετάλια: (B) Πυκνότητα. (Γ) Καμπυλότητα. (D, E) Κατανομή συχνότητας των μηκών ινών και του τρόπου λειτουργίας (D) και των διαμέτρων ινών και του τρόπου λειτουργίας (E). Με βάση τη διάμετρο, οι ίνες ταξινομήθηκαν είτε ως λεπτές (<150 nm), ενδιάμεσες (150–300 nm) ή παχιές (>300 nm). ($n = 3$). ns, μη σημαντικό ($P > 0.05$); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. 4C, αιμοπετάλια αποθηκευμένα στους 4°C. RT, τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (Nair, et al., 2017).

Τέλος πρότειναν ότι η επιφάνεια των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων είναι μοναδικά προετοιμασμένη, όχι μόνο για την έναρξη και τη διάδοση του πολυμερισμού του ινώδους με ταχεία παραγωγή θρομβίνης, αλλά επίσης ευνοεί τη διασύνδεση για σχηματισμό λεπτότερων ινών λόγω της παρουσίας υψηλών τοπικών συγκεντρώσεων ινωδογόνου και FXIII A2 στις επιφάνειες των αιμοπεταλίων. Η επιφάνεια των ψυχρών αιμοπεταλίων επομένως όχι μόνο παρέχει μια πλούσια καταλυτική επιφάνεια για την παραγωγή θρομβίνης αλλά επίσης μια θέση έναρξης για τη συναρμολόγηση και τη διασύνδεση του ινώδους. (βλ. Εικ.).(Nair, et al., 2017)

Η ανώτερη διασύνδεση ινών στα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια, θα μπορούσε να προκληθεί από τον παράγοντα XIII μέσω της δέσμευσης στην ενεργοποιημένη γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa στις επιφάνειες τους.

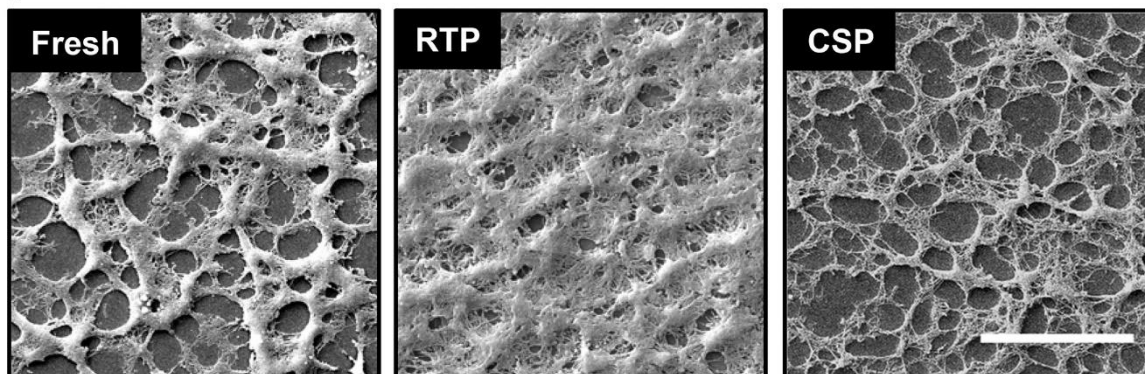


Εικόνα 40Μηχανισμός διασταυρούμενης σύνδεσης με τη μεσολάβηση FXIII σε ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια. (A) Η αποθήκευση στο κρύο οδηγεί σε ενδοκυτταρική διαρροή ασβεστίου στα αιμοπετάλια, με αποτέλεσμα την αλλαγή του σχήματος και την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb/IIIa μέσω σηματοδότησης ασβεστίου από μέσα προς τα έξω. Το ινωδογόνο (συμπλεγμένο με FXIII στην γ αλυσίδα) σε αποθηκευμένο αυτόλογο πλάσμα δεσμεύεται στο GPIIb/IIIa (B) Κατά την ενεργοποίηση, η θρομβίνη διασπά τα ινωδοπεπτιδικά για να μετατρέψει το μονομερές ινωδογόνου σε ινώδες, καθώς και το FXIII B για να ενεργοποιήσει το FXIII A. Τα αιμοπετάλια δρουν ως θέση πυρήνων για τον πολυμερισμό του

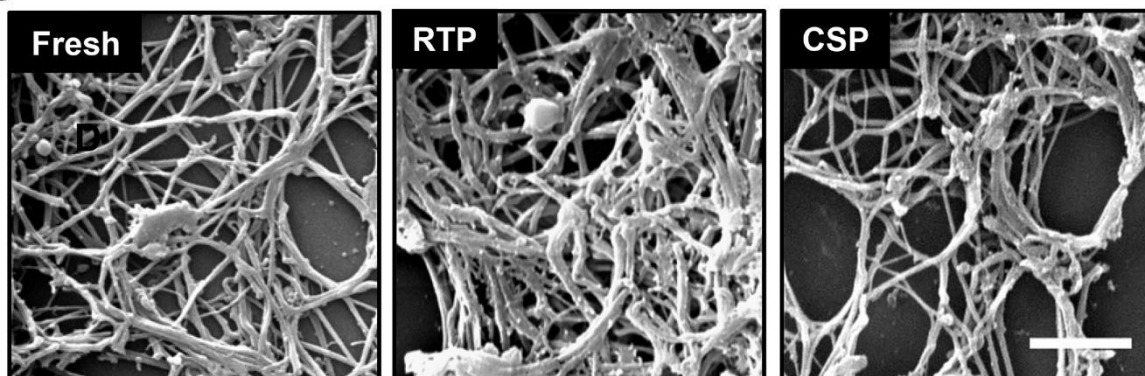
ινώδους και το FXIIIa μεσολαβεί γ-διμερές (διαμήκη και εγκάρσια), γ-τετραμερές, α-πολυμερές, αγ-υβριδικές διασταυρώσεις (ομοιοπολικοί δεσμοί) σε πλευρικά συσσωματωμένο πολυμερές ινώδους (μαλακός θρόμβος) για να σχηματίσει έναν ισχυρό θρόμβος (σκληρός θρόμβος) με λεπτότερες ίνες. D, ινωδοπεπτιδίο D; E, ινωδοπεπτιδίο E; GP, γλυκοπρωτεΐνη. (Nair, et al., 2017)

Οι Nair και συν αργότερα μελέτησαν και άλλα χαρακτηριστικά των σχηματιζόμενων θρόμβων με έμφαση στη συστολή του θρόμβου. (Nair, et al., 2021)

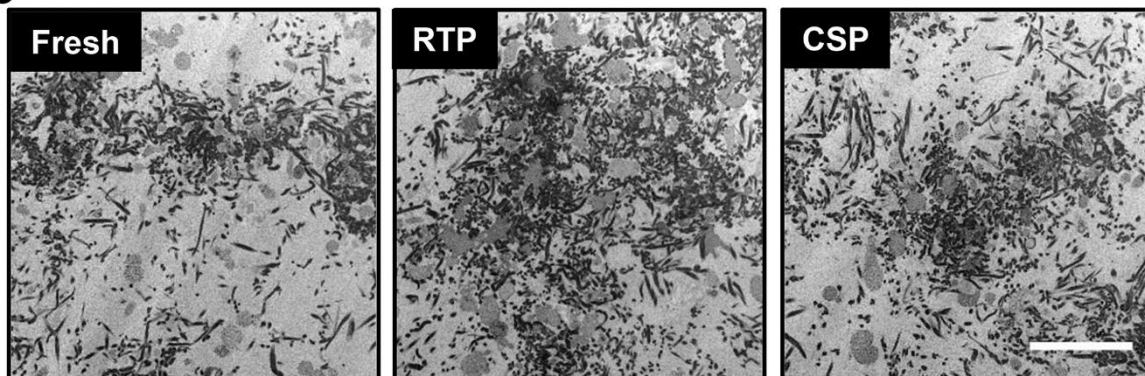
A



B

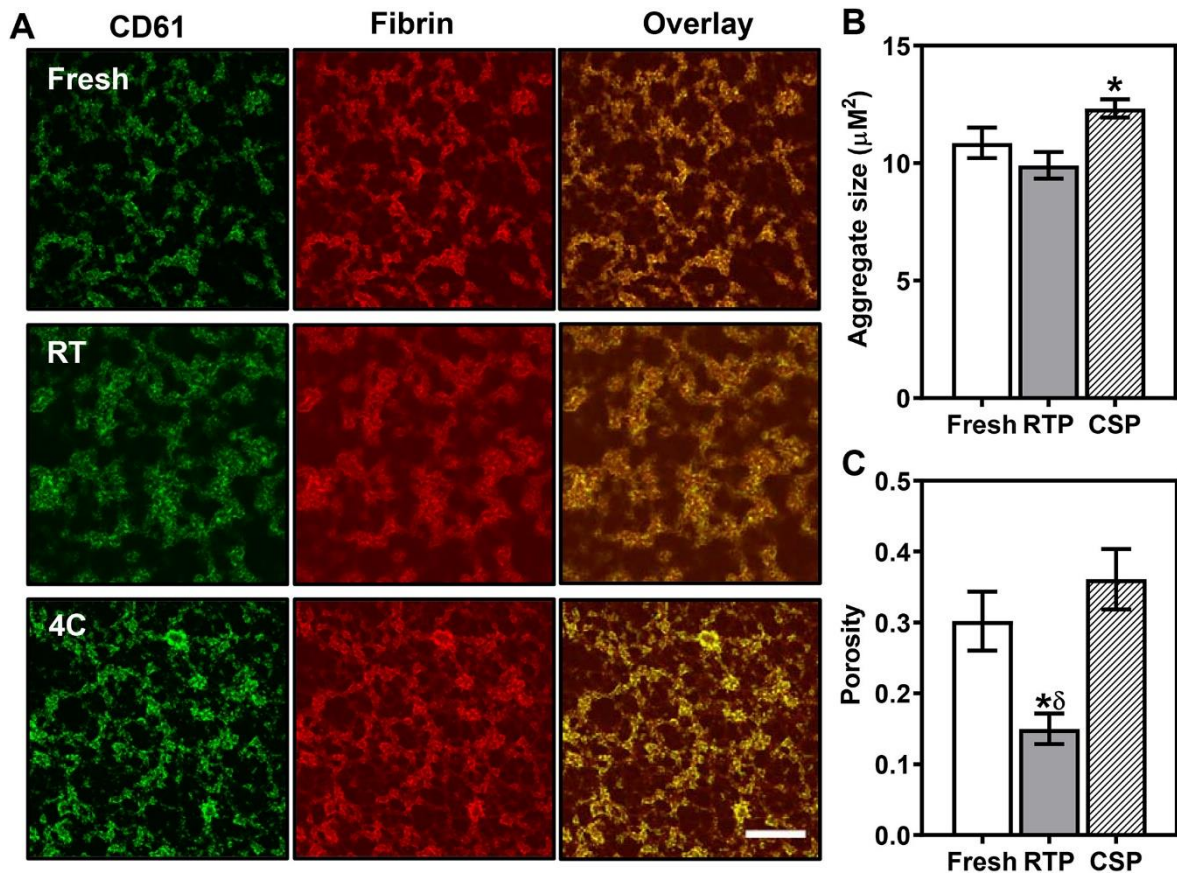


C



Εικόνα 41 Η ηλεκτρονική μικροσκοπία επιβεβαιώνει την αλλοιωμένη υπερδομή του θρόμβου στα αποθηκευμένα αιμοπετάλια κατά την συστολή του θρόμβου. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες SEM της τοπολογίας της επιφάνειας των ανασυρόμενων θρόμβων με κρουστομή έδειξαν αυξημένη πυκνότητα ινώδους σε αποσυρθέντες θρόμβους από RTP σε σύγκριση με φρέσκα αιμοπετάλια και CSP. Συσσωματώματα αιμοπεταλίων βρίσκονται στις συνδέσεις από τις οποίες ακτινοβολούν πολλές παχιές δέσμες ινών ινώδους, που αποτελούνται από πολλούς μεμονωμένους κλώνους ινώδους σε θρόμβους από RTP (μεγέθυνση $\times 500$, γραμμή κλίμακας = 50 μm). (B) Μεγέθυνση $\times 10.000$ Οι εικόνες SEM των ίδιων

θρόμβων που φαίνονται στο (Α) έδειξαν ότι οι θρόμβοι από το RTP σχηματίζουν μια συσσωρευμένη, πυκνή μάζα ινών ινώδους μετά την ανάκληση (ράβδος κλίμακας = 1 μm). (Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετάδοσης τμημάτων πάχους 90 nm. Οι θρόμβοι ενσωματωμένοι σε παραφίνη έδειξαν καλά καθορισμένα συσσωματώματα αιμοπεταλίου-ινώδους σε φρέσκα αιμοπετάλια και θρόμβους CSP που λείπουν από θρόμβους RTP. Το ινώδες (σκούρες κουκκίδες ή γραμμές) φάνηκε να κατανέμεται περισσότερο σε θρόμβους από RTP σε σύγκριση με θρόμβους από φρέσκα αιμοπετάλια ή CSP (γραμμική κλίμακας = 2 μm). CSP, ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια. PAS, διάλυμα πρόσθετου αιμοπεταλίων. RTP, αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου. SEM, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Nair, et al., 2021)



Εικόνα 42 Η αποθήκευση αιμοπεταλίων οδήγησε σε αλλοιωμένη δομή θρόμβου κατά την συστολή του θρόμβου. (Α) Αντιπροσωπευτικές $\times 400$ συνεστιακές εικόνες ιστολογικών τομών που χρωματίστηκαν για αιμοπετάλια (αντι-CD61, πράσινο) και ινώδες (αντι-ινωδογόνο, κόκκινο, γραμμική κλίμακας = 50 μm). Μια επικάλυψη και των δύο καναλιών φαίνεται στα δεξιά με εντοπισμένα αιμοπετάλια και ινώδες που φαίνονται ως κίτρινα. (Β) Μια διπλή μείωση στο πορώδες ποσοτικοποιήθηκε από ανάλυση εικόνας σε ανασυρθέντες θρόμβους από RTP ($n = 7$, $* p < 0,05$ σε σύγκριση με φρέσκα αιμοπετάλια· $\delta p < 0,05$ σε σύγκριση με CSP). (Γ) Το CSP σχημάτισε μεγαλύτερα συσσωματώματα αιμοπεταλίων μετά την απόσυρση ($n = 5$, $* p < 0,05$, $*$ σε σύγκριση με φρέσκα αιμοπετάλια). CSP, ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια. RTP, αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (Nair, et al., 2021)

Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια (CSP) διατηρούν τη συσταλτική τους λειτουργία για έως και 21 ημέρες τόσο στο αυτόλογο πλά-

σμα (AP) όσο και στο PAS και σχηματίζουν εξαιρετικά διατεταγμένα δίκτυα ινώδους παρόμοια με αυτά των φρέσκων αιμοπεταλίων. Αντίθετα, τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RTP) σε αυτόλογο πλάσμα παρουσίαζαν μειωμένη συσταλτική λειτουργία την 5^η ημέρα, ενώ τα αποθηκευμένα σε PAS (RTP) διατηρούσαν τη συσταλτική λειτουργία για έως και 21 ημέρες. (Nair, et al., 2021)

3.9 Απελευθέρωση προφλεγμονωδών μεσολαβητών.

Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, απελευθερώνουν τα περιεχόμενα των κοκκίων τους και άλλους μεταβολίτες στο πλάσμα. Οι Reddock και συν. μελέτησαν τα επίπεδα sCD40L και TxB2 που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια στο πλάσμα κατά την αποθήκευση.

Η θρομβοξάνη B2 (TxB2) είναι το σταθερό τελικό προϊόν ενός μεταβολίτη της οδού του αραχιδονικού οξέος, της θρομβοξάνης A2, ο οποίος ενισχύει ενδοκυτταρικά σήματα από άλλους αγωνιστές όπως η ADP ή η θρομβίνη. Τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια απελευθέρωσαν 4 φορές υψηλότερα επίπεδα TxB2 από τα αποθηκευμένα τους 4°C μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης, ενώ τα τελευταία δεν απελευθέρωσαν σημαντικές ποσότητες TxB2. Η TxA2 παράγεται από την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και είναι από μόνο του ένας ισχυρός ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων, επομένως μπορεί να οδηγήσει σε ακατάλληλη πήξη κατά τη μετάγγιση.

Το διαλυτό CD40L είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται σε αιμοπετάλια και είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στη φλεγμονή, τη θρόμβωση και την επαναστένωση των αγγείων. Το CD40L μετατοπίζεται από το εσωτερικό στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων που ενεργοποιούνται από αγωνιστή και αποβάλλεται από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων ως sCD40L. Τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου δείγματα απελευθέρωσαν ελαφρώς περισσότερο sCD40L στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε σύγκριση με την αρχική τιμή την Ημέρα 5. (Reddoch, et al., 2014) και αυτό μπορεί να παίζει πιθανό ρόλο σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις μετάγγισης.

Εν κατακλείδι τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια απελευθερώνουν περισσότερους προφλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως το sCD40L και η TxA₂ πιθανώς λόγω αποκοκκίωσης αιμοπεταλίων. Ουσιαστικά, μια μείωση των διαλυτών φλεγμονωδών μεσολαβητών υποδηλώνει ότι τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια μπορεί να είναι ασφαλέστερα για μετάγγιση από τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια και μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα λιγότερα ανεπιθύμητα συμβάντα όπως οξεία πνευμονική βλάβη που σχετίζεται με τη μετάγγιση (TRALI). Η χαμηλή απελευθέρωση TxB₂ από αιμοπετάλια αποθηκευμένα στους 4°C υποδεικνύει ότι το αραχιδονικό οξύ διατηρείται σχετικά, υποδηλώνοντας ότι το δυναμικό εύρος της απόκρισης των αιμοπεταλίων στους φυσιολογικούς αγωνιστές μετά τη μετάγγιση διατηρείται ομοίως και μπορεί να εξηγήσει τα αποτελέσματα της συσσωματομετρίας.

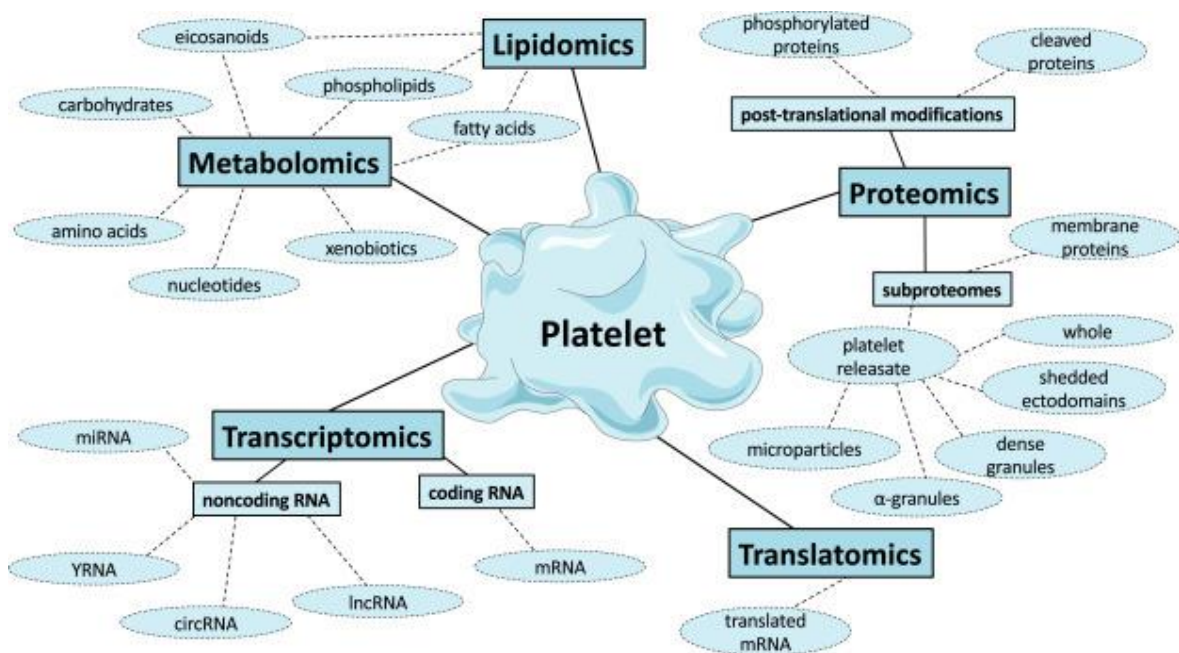
3.10 Μελέτες “-omics”

Τα τελευταία χρόνια οι εξελίξεις στη διαγνωστική τεχνολογία πραγματοποίησαν άλματα με την ανάπτυξη δυνατοτήτων μελέτης μοριακών διεργασιών και αλληλεπιδράσεων και τη συσχέτιση τους με τη σύσταση και λειτουργία κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια. Η ανάπτυξη και ευρεία διάθεση φασματοσκοπικών τεχνικών σε συνδυασμό με την τεράστια υπολογιστική δυναμικότητα των σύγχρονων υπολογιστικών συστημάτων έδωσαν τη δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης πολλών ουσιών και ενώσεων και της διαμόρφωσης μιας συνολικής εικόνας για την λειτουργία κάποιου βιολογικού συστήματος.

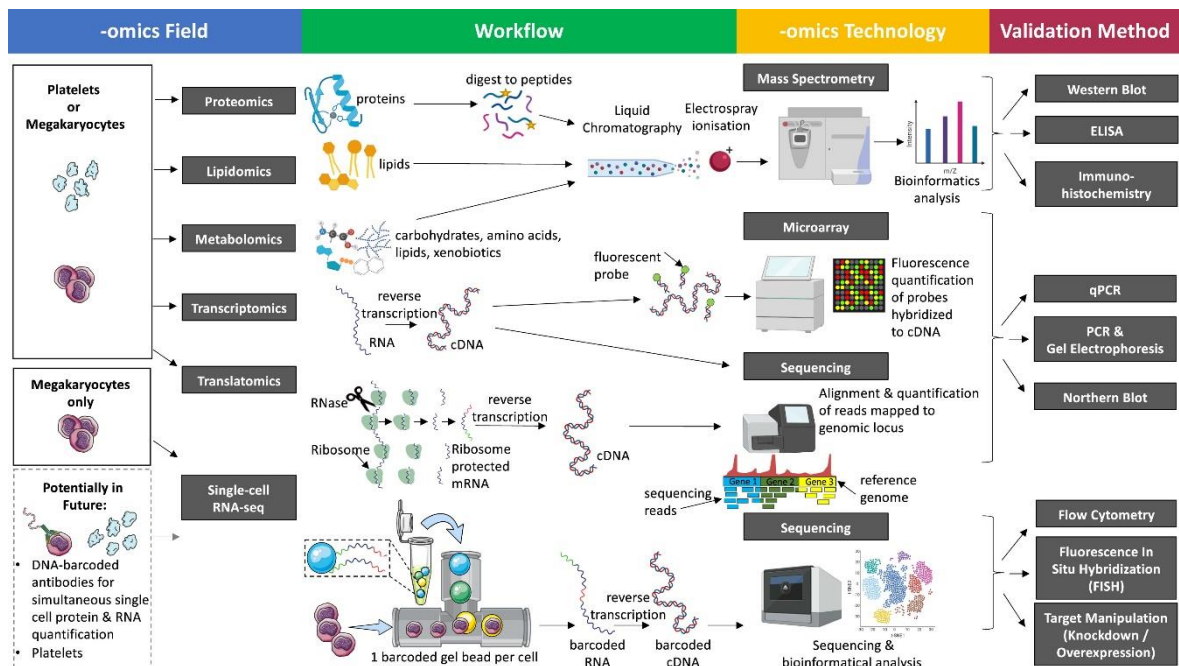
Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για αυτή την εκτίμηση είναι η φασματομετρία μάζας, η φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού, αλλά και μέθοδοι όπως η υγρή και αέρια χρωματογραφία η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση κλπ. Τα δεδομένα που λαμβάνουμε από αυτές τις μεθόδους αναλύονται από συστήματα μεγάλης υπολογιστικής δυναμικότητας με προηγμένα προγράμματα ανάλυσης και επεξεργασίας.

Οι αναλυτικές αυτές τεχνικές αναφέρονται σήμερα ως τεχνολογίες “-omics” (proteomics, metabolomics, lipidomics κλπ) και σε ελληνική απόδοση πρωτεομική, μεταβολομική, λιπιδομική κλπ ανάλυση. Οι τεχνικές αυτές τα τελευταία χρόνια έχουν επιτρέψει και την εκτίμηση του πρωτεώματος, μεταβολώματος, λιπιδώματος μεταγραφώματος

των αιμοπεταλίων που βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και αλληλεπιδράσεων στην υγεία και τη νόσο. (Gutmann, et al., 2020)



Εικόνα 43 Σχηματική επισκόπηση των μελετών -ωμικής στα αιμοπετάλια. (Gutmann, et al., 2020)



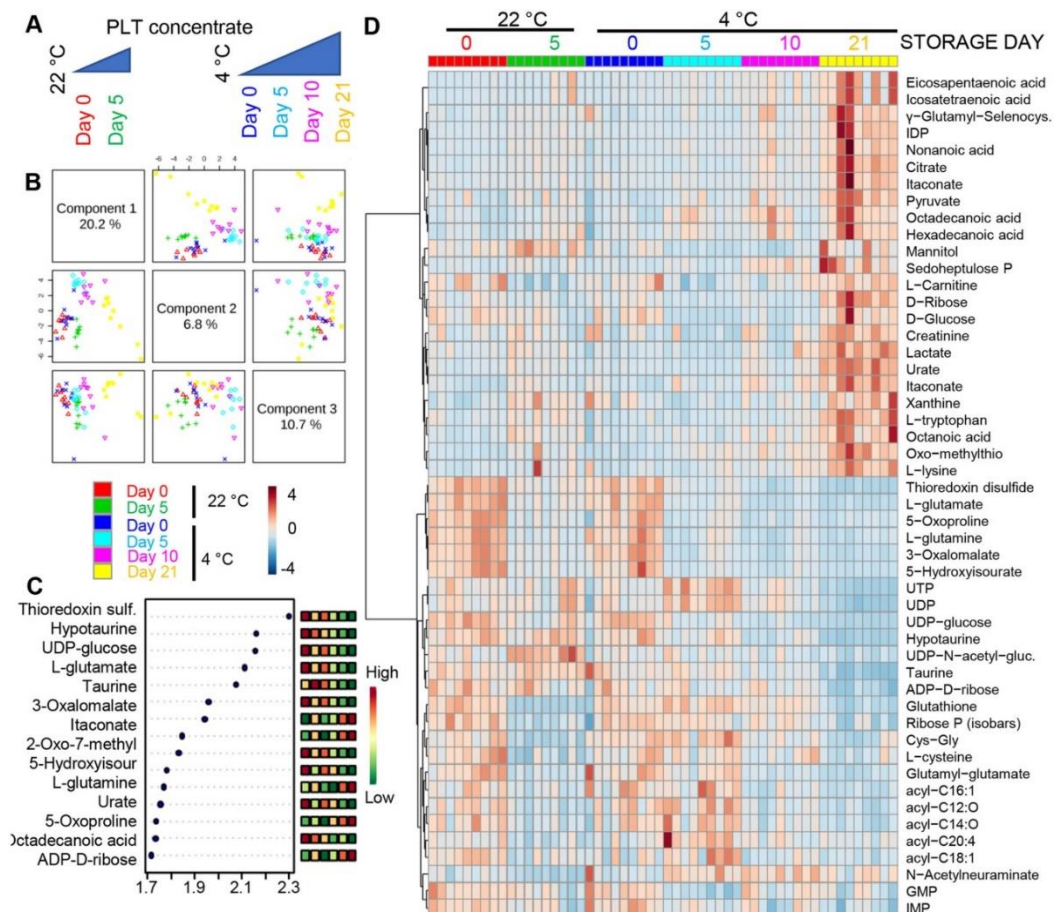
Εικόνα 44 Επισκόπηση μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε μελέτες -ωμικής αιμοπεταλίων και μεγακαρυοκυττάρων. (Gutmann, et al., 2020)

Παρά τις πολλές και σημαντικές προόδους στη μετάγγιση αιμοπεταλίων η απώλεια της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια αποθήκευσης που αναφέρεται γενικά ως αποθηκευτική βλάβη των αιμοπεταλίων (platelet storage lesion, PSL) είναι ένα υπαρκτό πρόβλημα. Οι σύγχρονες τεχνολογίες των “-omics” έχουν τα τελευταία χρόνια συνεισφέρει πολλές πληροφορίες για τον αντίκτυπο που έχουν οι μέθοδοι παρασκευής στην ποιότητα των προϊόντων αίματος. (Nemkov, et al., 2016)

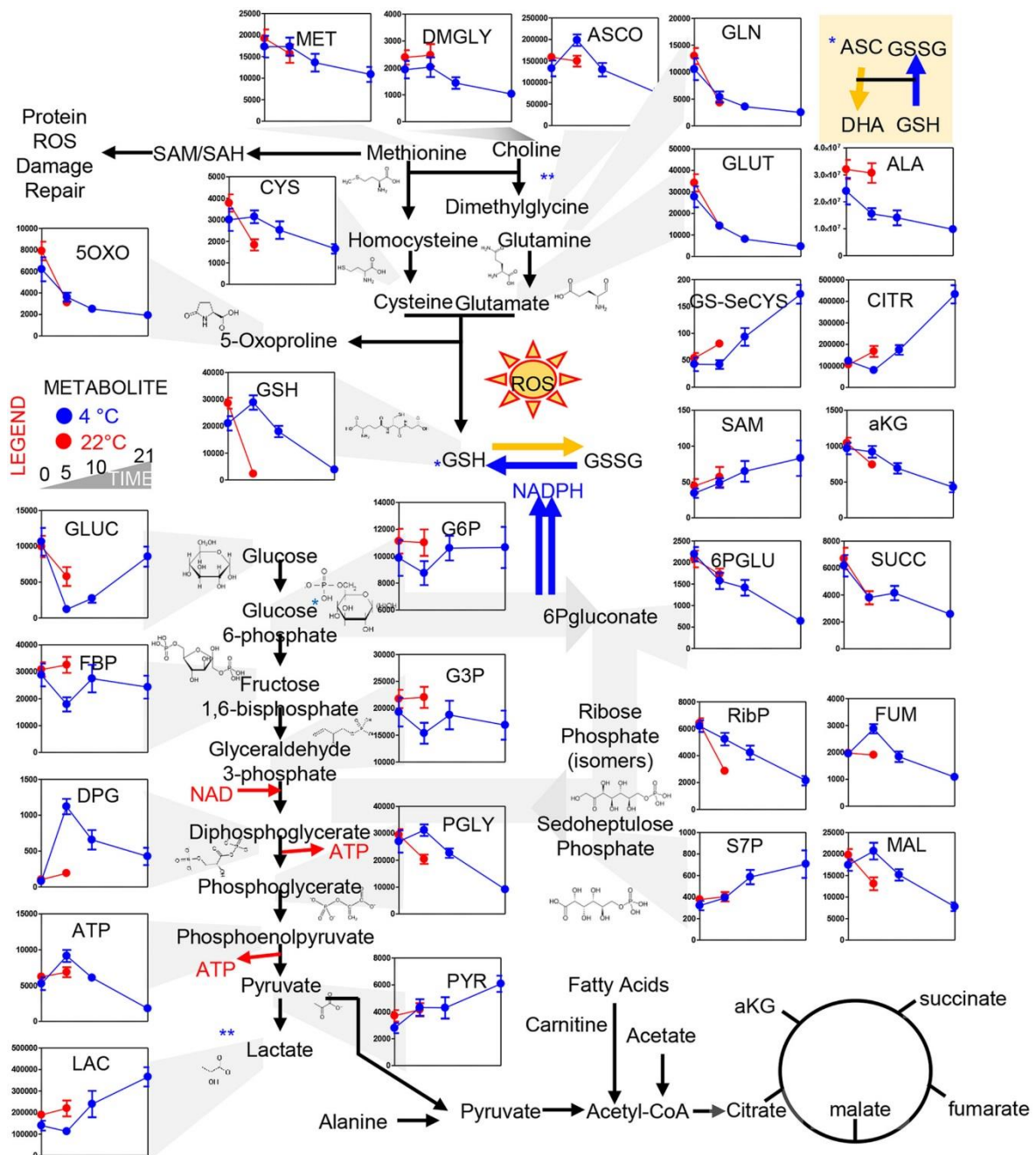
Metabolomics

Έτσι μελέτες μεταβολομικής κυρίως έχουν προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την επίδραση στην ποιότητα των αιμοπεταλίων παραγόντων όπως, το προσθετικό διάλυμα, η μέθοδος παρασκευής, η τεχνολογία μείωσης παθογόνων.

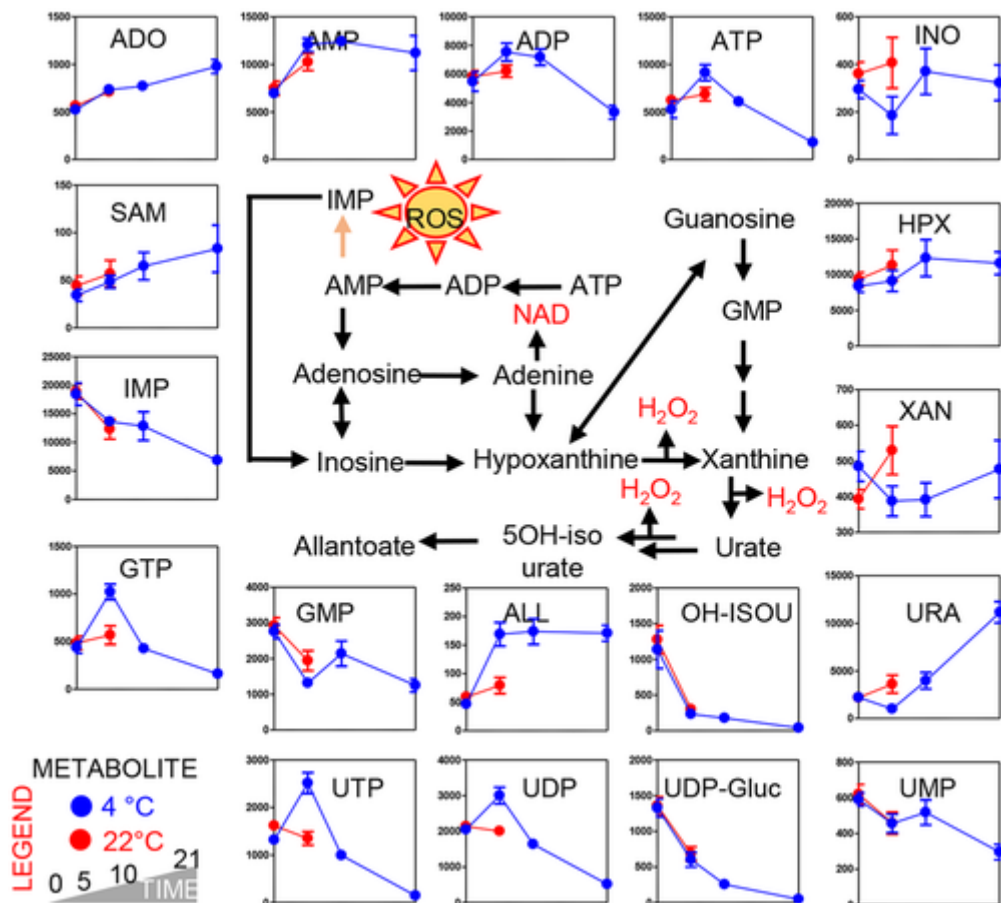
Από τέτοιες μελέτες έχει προκύψει ένα μοντέλο αντίληψης των αποθηκευτικών βλαβών σε δυο φάσεις. Τις 3 πρώτες μέρες κυριαρχεί μεταβολικά η γλυκόλυση, η οδός των φωσφορικών πεντοζών και ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης. Τις επόμενες ημέρες παρατηρείται μεταβολή προς τον κύκλο του Krebs και το μεταβολισμό των πουρινών. (Paglia, et al., 2014)



Εικόνα 45 Μεταβολικές αλλαγές σε PLT που αποθηκεύονται σε τυπική θερμοκρασία (22°C) ή σε ψύξη (4°C) στις Ημέρες αποθήκευσης 0, 5, 10 και 21. (Α) Επισκόπηση του πειραματικού σχεδιασμού και (Β) μερικό ελάχιστο τετράγωνο- διακριτική ανάλυση των μεταβολικών φαινοτύπων των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο. (Γ) Οι κορυφιαίοι 15 μεταβολίτες από τη μεταβλητή σημασία στο διάγραμμα προβολής. (Δ) Οι κορυφιαίες 50 μεταβολικές αλλαγές κατά ANOVA. (D'Alessandro, et al., 2020)



Εικόνα 46 Μεταβολικές αλλαγές στη γλυκόλυση, κύκλος του Krebs, γλουταθειόνη, και ομοϊσταση μεθειονίνης. Τα αιμοπεταλία αποθηκεύονται είτε υπό ψύξη (μπλε) ή σε θερμοκρασία δωματίου (κόκκινο) για 0, 5 (και οι δύο ομάδες), 10, και 21 ημέρες (μόνο εν ψυχρώ αποθηκευμένα). (D'Alessandro, et al., 2020)



Εικόνα 47 Αλλαγές στο μεταβολισμό των πουρινών. Τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται είτε υπό ψύξη (μπλε) ή σε θερμοκρασία δωματίου (κόκκινο) για 0, 5 (δύο ομάδες), 10, και 21 ημέρες (μόνο κρύο αποθηκεύονται). (D'Alessandro, et al., 2020)

Η εν ψυχρώ αποθήκευση λογικά θα πρέπει να σχετίζεται με επιβράδυνση μεταβολικών διεργασιών σε σύγκριση με την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου. Οι D'Alessandro και συν. διαπίστωσαν τρεις κατηγορίες επίδρασης της θερμοκρασίας στις μεταβολικές οδούς:

Οδοί που εμφανίζουν συγκρίσιμη συσχέτιση ανεξάρτητα της θερμοκρασίας αποθήκευσης, όπως ο μεταβολισμός της γλουταμίνης, οι μεταβολίτες του κύκλου του Krebs, κυρίως φουμαρικό και μηλικό, της καρνιτίτης και ορισμένων ελευθέρων λιπαρών οξέων.

Οδοί που επιβραδύνονται κατά την εν ψυχρώ αποθήκευση αλλά με καθυστέρηση ακολουθούν την ίδια πορεία με τα αιμοπετάλια θερμοκρασίας δωματίου. Σε αυτές συσσωρεύονταν ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, οκτανοϊκό, τρυπτοφάνη, πολυαμίνες. Τα εν ψυχρώ αιμοπετάλια έφταναν στα επίπεδα των αιμοπετα-

λίων των 22°C μετά από 10 ή και 21 ημέρες. Αντίστοιχη πορεία παρατηρείται και για προϊόντα διάσπασης και απαμίνωσης πουρίνης όπως η ξανθίνη, το ουρικό και η υποξανθίνη ή προϊόντα της οδού των φωσφορικών πεντοζών.

Μεταβολικές οδοί που ακολουθούν αντίθετη πορεία κατά την αποθήκευση σε διαφορετικές θερμοκρασίες, είτε σε όλη τη διάρκεια αποθήκευσης (π.χ. διμεθυλογλυκίνη), είτε παροδικά (ασκορβικό, φουμαρικό, μηλικό και οι περισσότερες ακυλοκαρνιτίνες). Έτσι για παράδειγμα γλυκολυτικοί μεταβολίτες, όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, η διφωσφορική φρουκτόζη και το γαλακτικό, αρχικά μειώνονται κατά τη φύλαξη στο ψυγείο και αργότερα, μετά από 10 ή και 21 ημέρες αποθήκευσης στο ψυγείο αυξάνονται.

Εν κατακλείδι, συμπεράναν ότι οδοί όπως της φωσφορικής πεντόζης και του μεταβολισμού των πουρινών αυξάνονται κατά την παρατεταμένη εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων. (D'Alessandro, et al., 2020)

Οι Zhao και συν διαπίστωσαν ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες όπως καταδεικνύεται από τη διατήρηση των επιπέδων γλουταθειόνης και φωσφορικών πεντοζών. Επίσης εμφανίζουν μειωμένους δείκτες β-οξείδωσης και καταβολισμού αμινοξέων που δείχνουν και τις μειωμένες ενεργειακές ανάγκες τους. Επιπλέον διαπίστωσαν ότι τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζονται θετικά και με τα αποτελέσματα των λειτουργικών δοκιμασιών των αιμοπεταλίων (ROTEM και συσσωματωμετρία μετάδοσης φωτός) (Zhao, et al., 2021)

Proteomics

Η έκθεση στο κρύο λοιπόν επιδρά στο μεταβολισμό των αιμοπεταλίων. Όμως όπως ήδη έχουμε περιγράψει πολλά πρωτεϊνικά μόρια των αιμοπεταλίων επίσης επηρεάζονται σε αυτές τις συνθήκες. Οι νέες τεχνολογίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη μελέτη όλων των πρωτεϊνικών μορίων των αιμοπεταλίων και την εκτίμηση λειτουργιών που μεταβάλλονται. Η πρωτεομική ανάλυση που στηρίζεται στη φασματομετρία μάζας δίνει τεράστιες δυνατότητες αναγνώρισης και ποσοτικοποίησης χιλιάδων πρωτεϊνικών μορίων των αιμοπεταλίων. Με τον τρόπο αυτό αποκαλύπτονται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και παρακολουθείται η δραστηριότητα των αιμοπεταλίων σε απόκριση σε διάφορες συνθήκες, θεραπείες και νόσους. Με τον τρόπο αυτό αντλούνται πληροφορίες για την κατανόηση της μοριακής βάσης γνωστών ή και άγνωστων μέχρι τώρα λειτουργιών. (Shevchuk, et al., 2021)

Οι Wang και συν. χρησιμοποίησαν φασματομετρία μάζας προκειμένου να σχηματίσουν ένα ολοκληρωμένο πρωτεομικό προφίλ αιμοπεταλίων αποθηκευμένων σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (20°C, 10°C, -80°C) Βρήκαν ότι διαφορετικές καταστάσεις προκάλεσαν διαφορετικές βλάβες αποθήκευσης αιμοπεταλίων (PSL). Ο αριθμός PLT μειώθηκε ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία που αποθηκεύτηκε. Η βιωσιμότητα των PLTs σε χαμηλή θερμοκρασία μειώθηκε κατά 21,78% και 11,21%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με 10,26% σε θερμοκρασία δωματίου. Η έκφραση του CD62P σταδιακά αυξήθηκε σε όλες τις ομάδες και ειδικότερα στους 22°C έως 40% και στους 10°C έως και 30%. Ωστόσο, η έκθεση της Φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στη μεμβράνη ήταν κάτω από 1% σε κάθε ομάδα.

Ταυτοποίησαν 575 πιθανές πρωτεΐνες με γενική ανάλυση iTRAQ και 454 πιθανές πρωτεΐνες φωσφορυλίωσης iTRAQ. Από αυτές 33 παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση ανάλογα με το χρόνο αποθήκευσης και 44 διαφοροποιούνταν ανάλογα με τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Διαπιστώθηκε ότι πρωτεΐνες που συνδέονται με τη μεμβράνη (όπως οι FERMT3, STX4, MYL9 και TAGLN2) έπαιξαν βασικό ρόλο στη βλάβη αποθήκευσης PLT. Οι οδοί «Ενδοκυττάρωση», η «φαγοκυττάρωση που προκαλείται από Fc τμήμα» και η «Ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης» επηρεάστηκαν κυρίως από τον χρόνο αποθήκευσης. Και οι οδοί «αλληλεπιδράσεις SNARE στη φυσαλιδώδη μεταφορά» και «Επαναπορρόφηση νερού ρυθμιζόμενη από αγγειοτενσίνη» επηρεάστηκαν από την αποθήκευση στο ψυγείο. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα πρωτεομικά αποτελέσματα μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση των βιοχημικών και παθοφυσιολογικών μηχανισμών της αποθηκευτικής βλάβης που προκαλεί το ψύχος και ο χρόνος και με τον τρόπο αυτό να βελτιώσουν τις στρατηγικές για πιο επιτυχημένη θεραπεία μετάγγισης. (Wang, et al., 2019)

Transcriptomics

Τα MicroRNA (miRNAs) είναι μικρά μόρια RNA που σχετίζονται με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Είναι μόρια μονόκλωνα που περιέχουν λίγα νουκλεοτίδια (20-25), ενώ είναι μη κωδικοποιά. Τα miRNA είναι άφθονα σε πολλούς τύπους κυττάρων μεταξύ αυτών και στα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια φιλοξενούν ένα ευρύ φάσμα microRNAs (miRNAs), ενώ απελευθερώνουν miRNAs κατά την ενεργοποίηση και έχουν προταθεί ως βιοδείκτες για την ενεργοποίηση, την αναστολή και άλλες λειτουργικές καταστάσεις των αιμοπεταλίων. (Krammer, et al., 2020)

Οι Mukai και συν. προσπάθησαν να προσδιορίσουν εάν οι λειτουργικές διαφοροποιήσεις που παρουσιάζουν τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται εν ψυχρώ σχετίζονται με διαφορετικό προφίλ έκφρασης miRNA. Μελέτησαν το προφίλ έκφρασης miRNA σε αιμοπετάλια που λήφθηκαν από 10 υγιείς εθελοντές, πριν από την αποθήκευση, και μετά από αποθήκευση 72 ωρών στους 22°C με ανάδευση και στους 4°C. Για την ποσοτική έκφραση των miRNA χρησιμοποιήθηκε αλληλούχιση επόμενης γενιάς (next-generation sequencing). Διαπιστώθηκε ότι η αποθήκευση στους 4°C αύξησε τα επίπεδα έκφρασης των mir-20a-5p (1,87, $p < 0,0001$), mir-10a-3p (1,88, $p < 0,0001$), mir-16-2-3p (1,54, $p < 0,01$) και mir-223-5p (1,38, $p < 0,05$), σε σύγκριση με εκείνα των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 22°C.

Η σημασία αυτών των συσχετίσεων miRNA με την ποιότητα των αιμοπεταλίων εξακολουθεί να διερευνάται, μπορούμε όμως να υποθέσουμε ότι τα miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της ποιότητας των αιμοπεταλίων. (Mukai, et al., 2019)

Κεφάλαιο 4

Μελέτες σε ανθρώπους των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων.

Μέχρι τώρα ασχοληθήκαμε με μελέτες που αφορούσαν την *in vitro* εξέταση των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε συνθήκες ψύχους. Στην ιατρική όμως επιστήμη κύριος στόχος είναι ο ίδιος ο άνθρωπος και σκοπός πάντα η προάσπιση της υγείας του. **Παραφράζοντας** τον Πρωταγόρα (πάντων χρημάτων μέτρον ἐστὶν ἄνθρωπος, τῶν μὲν ὄντων ὡς ἐστίν, τῶν δὲ οὐκ ὄντων ὡς οὐκ ἔστιν) (Πλάτων, n.d.) θα λέγαμε ότι για όλα (τα πειράματα) ο άνθρωπος είναι το μέτρο. Γνώμονας όλων των *in vitro* προσεγγίσεων είναι πως αυτές θα επιβεβαιωθούν και θα μεταφερθούν με ασφάλεια στο πεδίο την καθημερινής ιατρικής εφαρμογής. Έτσι όλες οι *in vitro* προσεγγίσεις οφείλουν να επιβεβαιωθούν με αντίστοιχες μελέτες σε ανθρώπους, συνήθως υγιείς εθελοντές αλλά και ασθενείς. (Mack, et al., 2020)

4.1 Η επίδραση της εν ψυχρώ αποθήκευσης στην ανάκτηση και την επιβίωση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων

Αρχικά, όπως ήδη έχουμε αναφέρει, τα προς μετάγγιση αιμοπετάλια φυλάσσονταν, όπως και τα άλλα προϊόντα αίματος σε συνθήκες ψύξης, συνήθως στη μορφή του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος.

Όμως το 1964 οι Levin και Freireich δημοσίευσαν τα αποτελέσματα της εργασίας τους που επρόκειτο να πυροδοτήσει την αλλαγή στον τρόπο αποθήκευσης των αιμοπεταλίων. Αυτοί μετάγγιζαν αιμοπετάλια, με τη μορφή πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP), σε θρομβοπενικούς ασθενείς, κυρίως παιδιά, με οξεία λευχαιμία. Παρελάμβαναν από υγιείς δότες, συνήθως τους γονείς των παιδιών, μια μονάδα πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια με μια διαδικασία πλασμαφαίρεσης και αυτή χορηγούνταν στον ασθενή άμεσα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνονταν σε άλλη χρονική στιγμή στην πορεία της νόσου του ασθενούς, μόνο που αυτή τη φορά το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα φυλάσσονταν σε συνθήκες ψύχους μέχρι τη μετάγγιση για 7, 24 ή 48 ώρες. Η διαδικασία αυτή

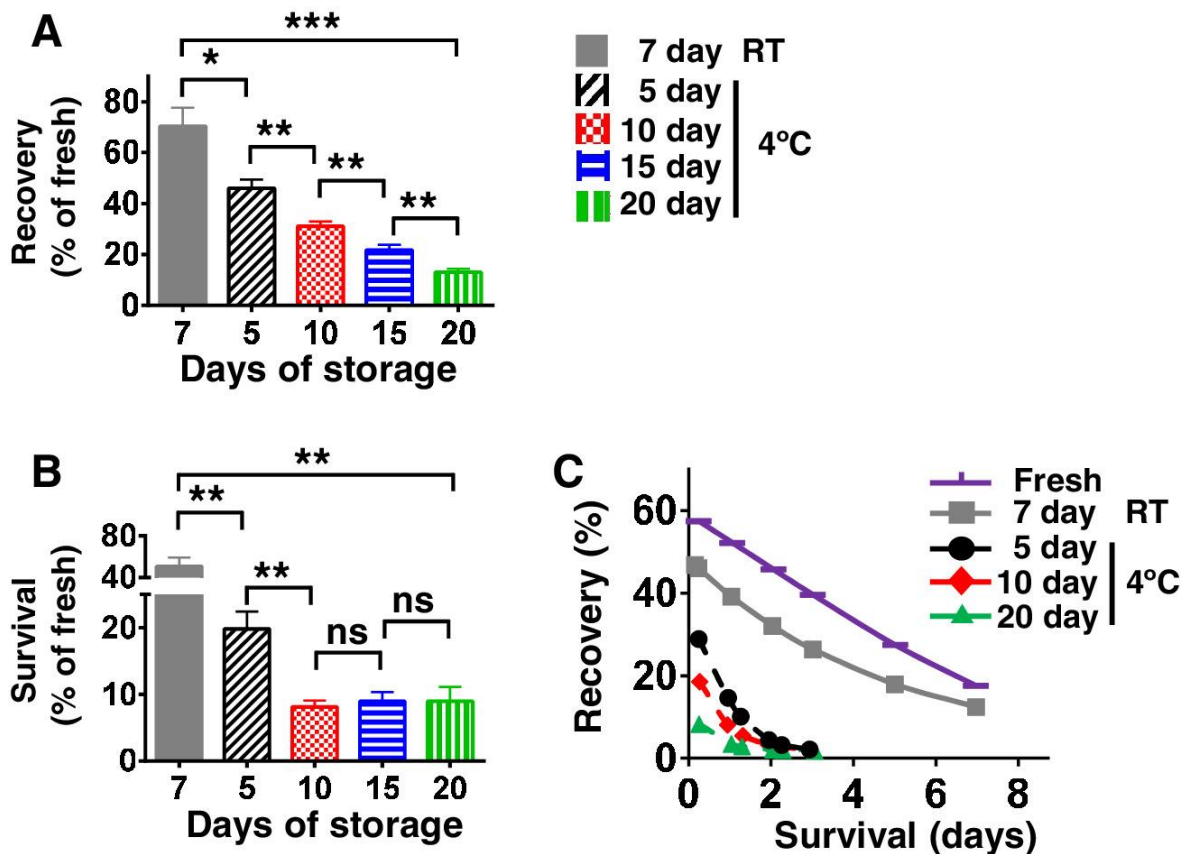
πραγματοποιούνταν και αντίστροφα, πρώτα χορήγηση του «ψυχρού» πλάσματος και κατόπιν του φρέσκου. Συγκρίνονταν τα αποτελέσματα της χορήγησης φρέσκου και ψυχθέντος πλάσματος σε ζεύγη με τον ίδιο δότη και τον ίδιο λήπτη προκειμένου να μειωθεί η πιθανή μεταβλητότητα κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της μετάγγισης γίνονταν με την μέτρηση των αιμοπεταλίων πριν τη μετάγγιση, αμέσως μετά, μια ώρα και 24 ώρες αργότερα. Μετά από αποθήκευση σε ψύχος για 6-7 ώρες δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το φρέσκο PRP. Τα αιμοπετάλια όμως που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες ψύχους για 24 ή 48 ώρες παρουσίαζαν μια ώρα μετά την μετάγγιση το 62% και 37% αντίστοιχα της αύξησης μετά τη μετάγγιση του φρέσκου προϊόντος. Μάλιστα 24 ώρες μετά τη μετάγγιση υπολογίζονταν ότι όλα τα αιμοπετάλια που είχαν αποθηκευτεί στους 4°C είχαν χαθεί. Έτσι λοιπόν η μελέτη αυτή έθεσε σε σοβαρή αμφισβήτηση την τακτική της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύχους και πυροδότησε μια σειρά από ερευνητικές μελέτες που θα οδηγούσαν σε αλλαγή αυτής της τακτικής. (Levin, et al., 1964).

Αργότερα οι Murphy και Gardner επιβεβαίωσαν τα προβλήματα βιωσιμότητας των αποθηκευμένων σε συνθήκες ψύχους αιμοπεταλίων. Χρησιμοποίησαν υγιείς εθελοντές δότες αιμοπεταλίων. Μετά τη συλλογή και αποθήκευση προχώρησαν στην ραδιοσήμανση των αιμοπεταλίων με ^{51}Cr και την επαναχορήγησή τους στους ίδιους τους δότες. Διαπίστωσαν ότι τα επαναχορηγηθέντα αιμοπετάλια είχαν σημαντικά μικρότερη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με φρέσκα αιμοπετάλια. Μετά από 8 ώρες στους 4°C τα αιμοπετάλια παρουσίαζαν ελαφρά μειωμένη επιβίωση, ενώ μετά από 18 ώρες αποθήκευσης ο χρόνος ημιζωής τους ήταν μόλις 1.3 ημέρες. Αντίθετα τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) εμφάνιζαν χρόνο ημιζωής 4 ημερών. Στην αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου η επιβίωση των αιμοπεταλίων δεν επηρεάζονταν σημαντικά από τον χρόνο αποθήκευσης (χρόνος ημιζωής 4,3 και 4,0 ημέρες μετά από αποθήκευση 8 και 18 ωρών αντίστοιχα). Έτσι πρότειναν την αποθήκευση των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 96 ώρες μετά τη συλλογή τους και η μελέτη τους αυτή εκτενώς χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα στη σχετική βιβλιογραφία. (Murphy & Gardner, 1969)

Το 1977 οι Silva και Miller σε μια αναδρομική μελέτη για τις στρατηγικές μετάγγισης αιμοπεταλίων στην περιοχή τους, θεώρησαν αποτελεσματικότερη πρακτική την αποθήκευση σε συνθήκες ψύχους, εκτιμώντας την επαρκέστερη αιμοστατική λειτουργία και

ικανότητα συγκόλλησης των αιμοπεταλίων αυτών. Παρόλα αυτά υπέθεσαν ότι αυτή η τακτική ίσως δεν ήταν η ιδανικότερη για ειδικές ομάδες ασθενών, περισσότερο αυτών που χρειάζονται προφυλακτική μετάγγιση αιμοπεταλίων. Στη μελέτη τους περιελήφθησαν 109 ασθενείς και πραγματοποιήθηκαν 360 μεταγγίσεις αιμοπεταλίων. Τα αποθηκευμένα στους 4°C αιμοπετάλια χορηγήθηκαν κυρίως σε ασθενείς με ενεργό αιμορραγία, ενώ τα αιμοπετάλια που είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου χορηγήθηκαν προφυλακτικά σε θρομβοπενικούς ασθενείς, κυρίως ασθενείς με λευχαιμία. Η μείωση μετά από 24 ώρες του αριθμού των αιμοπεταλίων των αποθηκευμένων σε ψύχος, ήταν 3400/μλ μετά από αποθήκευση 24 ωρών και 6700/μλ μετά από αποθήκευση 48 ωρών. (Silva & Miller, 1977)

Το 2020 οι Stolla και συν. εκτίμησαν την παρατεταμένη επίδραση του ψύχους στα αποθηκευμένα αιμοπετάλια. Συνέλλεξαν αιμοπετάλια από υγιείς δότες και τα αποθήκευσαν στους 4°C για 20 ημέρες. Αφού ραδιοσήμαναν τα αιμοπετάλια με ¹¹¹Ινδίο τα χορήγησαν σε εθελοντές ανά πενήντημερο, δηλαδή μετά από 5, 10, 15 και 20 ημέρες αποθήκευσης προκειμένου να εκτιμήσουν την ανάκτηση και την επιβίωσή τους. Σαν ομάδα ελέγχου χρησιμοποίησαν αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου 22°C για 5 ή 7 ημέρες. Διαπίστωσαν ότι η ανάκτηση παρουσίαζε συνεχή μείωση με το χρόνο αποθήκευσης. Από την άλλη, η επιβίωση των αιμοπεταλίων, έφτασε μια ελάχιστη τιμή στις 10 ημέρες αποθήκευσης. Συμπέραναν λοιπόν πως τα αιμοστατικά οφέλη από τη χορήγηση αποθηκευμένων σε συνθήκες ψύχους αιμοπεταλίων θα μειώνονταν δραστικά με την παράταση του χρόνου της αποθήκευσης. Ταυτόχρονα μελέτησαν και συνέκριναν στα παραπάνω δείγματα αιμοπεταλίων μεταβολικές και άλλες παραμέτρους όπως εκτενέστερα έχουμε ήδη αναφέρει. (Stolla, et al., 2020)



Εικόνα 48 Χαρακτηριστικά αιμοπεταλίων in vivo: Υγιή άτομα έλαβαν αυτόλογα ραδιοσημασμένα αιμοπετάλια είτε φρέσκα είτε μετά από αποθήκευση στους 4°C ή RT (22°C). Αποθήκευση RT επτά ημερών (γκρι ράβδοι), 5 ημέρες αποθήκευσης 4°C (λευκό με μαύρες διαγώνιες ρίγες), 10 ημέρες αποθήκευσης 4°C (κόκκινο με λευκά τετράγωνα), 15 ημέρες αποθήκευσης 4°C (μπλε με οριζόντιες λευκές ρίγες), 20 ημέρες αποθήκευσης 4°C (πράσινο με κάθετες λευκές ρίγες). (Α) Ανάκτηση αιμοπεταλίων που εμφανίζεται ως ποσοστό των φρέσκων αυτόλογων ραδιοσημασμένων αιμοπεταλίων του υποκειμένου. (Β) Η επιβίωση εμφανίζεται ως ποσοστό των φρέσκων αυτόλογων ραδιοσημασμένων αιμοπεταλίων ελέγχου του υποκειμένου. (Γ) Αντιπροσωπευτικά ίχνη που λαμβάνονται από δεδομένα ραδιοσήμανσης (μοντέλο πολλαπλών χτυπημάτων). Φρέσκο (μωβ γραμμή με οριζόντιες διασταυρώσεις), αποθήκευση σε RT 7 ημερών (γκρι γραμμή με τετράγωνα), 5 ημέρες αποθήκευσης 4°C (στιγμένη, μαύρη γραμμή με κύκλους), 10 ημέρες αποθήκευσης 4°C (στικτή, κόκκινη γραμμή με διαμάντια), 20 ημέρες αποθήκευσης 4°C (στιγμένη, πράσινη γραμμή με τρίγωνα). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; ns = μη σημαντικό, n = 5 για RT και n = 5-6 για όλες τις άλλες ομάδες. (Stolla, et al., 2020)

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για την αποθήκευση των αιμοπεταλίων και σε συνθήκες ψύξης έχει ιδιαίτερα αναθερμανθεί. Από πολλές μελέτες έχει καταδειχθεί η δυνητικώς καλύτερη αποτελεσματικότητά τους για την αντιμετώπιση αιμορραγικών συμβαμάτων. Το 2018 οι Vostal και συν. μελέτησαν αποθηκευμένα στο ψύχος αιμοπετάλια τα οποία όμως αναθέρμαιναν περιοδικά, όπως αναφέραμε και σε άλλο σημείο. Η διαδικασία αυτή της κυκλικής αναθέρμανσης των αιμοπεταλίων πραγματοποιούνταν προκειμένου να μειωθεί η αρνητική επίδραση του ψύχους στα προς μετάγγιση αιμοπετάλια. (McGill, 1978)

Μεταξύ άλλων εξέτασαν την κινητική των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές. Συγκεκριμένα από υγιείς δότες έλαβαν αιμοπετάλια τα οποία διαχώρισαν σε δύο μονάδες προκειμένου να επιτύχουν τη σύγκρισή τους ανά ζεύγη. Τα αιμοπετάλια αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση και σε ειδική συσκευή που διατηρούσε τη θερμοκρασία στους 2-4°C και αναθέρμαινε τα αιμοπετάλια για 1 ώρα δυο φορές το 24ωρο και για διάστημα 7 ημερών. Η εκτίμηση της *in vivo* ανάκτησης και επιβίωσης των αιμοπεταλίων μετά τη μετάγγιση γίνονταν με την ραδιοσήμανσή του με ¹¹¹In ή ⁵⁵Cr. Η ανάκτηση των αιμοπεταλίων που αναθερμαίνονταν (Thermocycling, TC PLT) ήταν 42,6% ελαφρώς μειωμένη σε σύγκριση με το 55,7 % των αιμοπεταλίων θερμοκρασίας δωματίου (RT PLT). Η επιβίωση όμως 48,1 ωρών για τα TC PLT ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτήν των 161,3 ωρών για τα RT PLT. Τα στοιχεία όμως αυτά ήταν καλύτερα από τα αιμοπετάλια τα αποθηκευμένα μόνο σε ψύχος, αν και η εκτίμηση της κλινικής σημασίας της διαφοράς δεν είναι εύκολη λόγω του μικρού δείγματος προς μελέτη. (Vostal, et al., 2018)

Όπως αναφέραμε ήδη, η έκθεση της β-N ακετυλογλυκοζαμίνης (βGlcNAc) στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων μετά την έκθεσή τους στο ψύχος, είναι ένας σημαντικός μηχανισμός κάθαρσης αυτών των αιμοπεταλίων. Όπως αποδείχθηκε σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, η γλυκοζυλίωση των υπολειμμάτων βGlcNAc με ουριδίνη 5' διφωσφογαλακτόζη (UDP γαλακτόζη) βελτιώνει την επιβίωση των αιμοπεταλίων, μειώνοντας την κάθαρσή τους από τα ηπατικά μακροφάγα. (Hoffmeister, et al., 2003) Με βάση τα δεδομένα αυτά οι Wandall και συν. μελέτησαν την ανάκτηση και επιβίωση των μεταγγισμένων αιμοπεταλίων μετά από ραδιοσημανσή τους με ¹¹¹In ή ⁵⁵Cr. Συνέκριναν αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου με αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε ψύχος (2-4°C) επεξεργασμένα ή όχι με UDP γαλακτόζη. Κατέληξαν όμως στο συμπέρασμα ότι η γαλακτοζυλίωση των αιμοπεταλίων δεν εμπόδισε την επιταχυνόμενη κάθαρσή τους μετά από αποθήκευση στους 4°C για 48 ώρες. (Wandall, et al., 2008)

Οι περισσότερες από τις αναφερθείσες μελέτες χρησιμοποιούσαν αιμοπετάλια διαλυμένα σε πλάσμα. Πως όμως η εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων αλληλεπιδρά με άλλους παράγοντες όπως το υγρό στο οποίο αυτά διατηρούνται;

Το ερώτημα αυτό προσπάθησαν να διερευνήσουν οι Stolla και συν. το 2018. Έτσι έλαβαν αιμοπετάλια αφαίρεσης από 20 υγιείς δότες και τα διαχώρισαν σε δυο ασκούς αποθήκευσης. Η μία μονάδα ήταν αιμοπετάλια σε πλάσμα και αποθηκεύτηκε στους 4°C

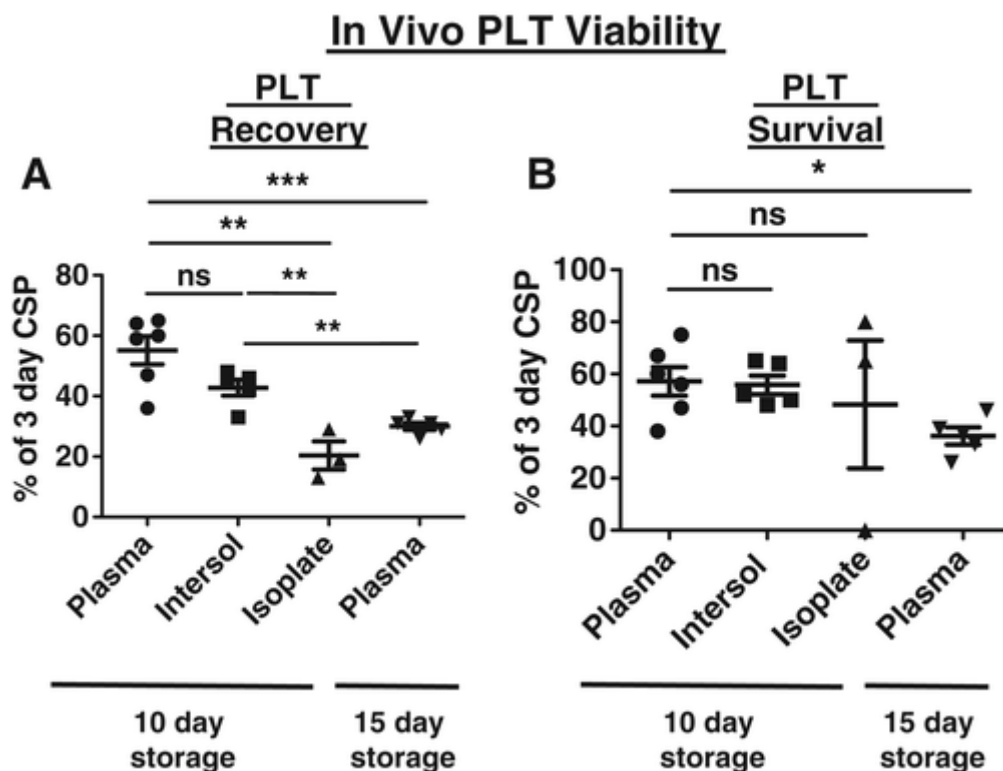
για 3 ημέρες (μονάδα ελέγχου). Η άλλη μονάδα περιείχε αιμοπετάλια σε προσθετικό διάλυμα (35% πλάσμα και 65% Intersol ή Isoplate) ή αιμοπετάλια σε 100% πλάσμα και αποθηκεύτηκε στους 4°C για 10 έως 15 ημέρες. Τα αιμοπετάλια αυτά επαναχορηγήθηκαν στους δότες αφού επισημάνθηκαν με ραδιενεργό ^{111}In . Το ^{111}In προτιμήθηκε καθώς το άλλο διαθέσιμο ραδιοϊσότοπο ^{51}Cr έδινε πολύ πτωχή πρόσληψη από τα αποθηκευμένα στο ψύχος αιμοπετάλια. Εκτός των *in vivo* παραμέτρων, μελετήθηκαν και *in vitro* χαρακτηριστικά των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων όπως η συγκέντρωση γλυκόζης, γαλακτικού, η παρουσία μικροκυστιδίων, η έκφραση Annexin V και P-selectin.

Συνοπτικά οι ερευνητές κατέληξαν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

Τα αποθηκευμένα εν ψυχρώ αιμοπετάλια είναι μεταβολικά ενεργά, καταναλώνουν γλυκόζη και παράγουν γαλακτικό, ενώ εμφανίζουν σημεία προενεργοποίησης.

Διαφορετικά προσθετικά διαλύματα εμφανίζουν σημαντική διαφοροποίηση στα δεδομένα ανάκτησης των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων, παρά το γεγονός ότι εμφανίζουν συγκρίσιμα *in vitro* αποτελέσματα.

Η ανάκτηση των αποθηκευμένων σε πλάσμα αιμοπεταλίων ήταν υψηλότερη από τα αιμοπετάλια σε προσθετικό διάλυμα. (Stolla, et al., 2018)



Εικόνα 49Μετρήσεις PLT *in vivo*: υγιή άτομα έλαβαν τα αυτόλογα ραδιοσημασμένα PLT τους μετά από αποθήκευση στους 4°C (πλάσμα—•, αποθήκευση 10 ημερών—◻, αποθήκευση 15 ημερών) ή σε μείγμα 65% PAS, 35% πλάσματος (◼, ◻).

Intersol[▲], Isoplate). (A) Ανάκτηση των μεταγγισμένων PLT στο χρονικό σημείο της 1 ώρας. (B) Επιβίωση μεταγγισμένων PLTs. Όλα τα αποτελέσματα δίνονται ως ποσοστό των 3 ημερών αυτόλογων ραδιοσημασμένων 4°C PLT ελέγχου του υποκειμένου. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p = 0,001; ns = μη σημαντικό. (Stolla, et al., 2018)

4.2 Επίδραση της εν ψυχρώ αποθήκευσης στη λειτουργικότητα των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων.

Μέχρι εδώ εστιάσαμε σε μελέτες της «κινητικής» των αιμοπεταλίων μετά από τη μετάγγισή τους. Η εκτίμηση αυτή στηρίχτηκε κυρίως στην ανάκτηση και την επιβίωση των μεταγγισμένων αιμοπεταλίων.

Ήδη όμως από το 1971 οι Handin και Valeri υπέθεσαν ότι η διάρκεια ζωής στην κυκλοφορία των αιμοπεταλίων μετά από μετάγγιση και η αιμοστατική τους ικανότητα πιθανόν δεν συμβαδίζουν. Στο πλαίσιο αυτό έγιναν προσπάθειες και για την εκτίμηση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων μετά από την μετάγγιση και τον προσδιορισμό της αιμοστατικής τους αποτελεσματικότητας. Έτσι οι Handin και Valeri διαπίστωσαν ότι τα φρέσκα αιμοπετάλια μπορούν να διορθώσουν τον παρατεταμένο χρόνο ροής σε υγιείς εθελοντές που έλαβαν ασπιρίνη. Τα αιμοπετάλια όμως που αποθηκεύονται στους 22°C για 24 ώρες δεν παρουσιάζουν, τουλάχιστον άμεσα την ίδια ικανότητα. (Handin & Valeri, 1971)

Αργότερα, το 1974 ο Valeri, συνέχισε να μελετά την αιμοστατική ικανότητα αιμοπεταλίων αποθηκευμένων σε διαφορετικές συνθήκες. Σε 42 υγιείς εθελοντές χορήγησε 650 mg ασπιρίνης. 24 ώρες μετά προσπάθησε να εκτιμήσει την επίδραση μεταγγισθέντων αιμοπεταλίων στη διόρθωση του χρόνου ροής. Ταυτόχρονα με ραδιοσήμανση των αιμοπεταλίων εκτιμούσε τη ανάκτηση και την επιβίωσή τους. Διαπίστωσε ότι καμιά διόρθωση στον χρόνο ροής δεν παρατηρούνταν μετά τη μετάγγιση φρέσκων αιμοπεταλίων (<4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου), ή αιμοπεταλίων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Διαπίστωσε όμως πως τα αιμοπετάλια αυτά είχαν φυσιολογική διάρκεια ζωής στην κυκλοφορία μετά την μετάγγιση. Αντίθετα αιμοπετάλια που μεταγγίστηκαν μετά από αποθήκευση 24 ωρών στους 4°C κατάφεραν να διορθώσουν το χρόνο ροής, παρουσίαζαν όμως μειωμένη επιβίωση. Μελέτησε μάλιστα και αιμοπετάλια αποθηκευμένα στους

-80°C για 24 ώρες και διαπίστωσε ότι αυτά παρουσίαζαν και καλή επιβίωση και αιμοστατική αποτελεσματικότητα. Συμπέρανε λοιπόν πως η λειτουργική επάρκεια των αιμοπεταλίων δεν συμπίπτει πάντα με την ικανότητα τους να παραμένουν στην κυκλοφορία. (Valeri, 1974)

Αργότερα επέκτεινε τις έρευνές του προσπαθώντας να δώσει απάντηση στο ερώτημα αν υπάρχει ή όχι απόλυτη συσχέτιση ανάμεσα στην κυκλοφορία των μεταγγισθέντων αιμοπεταλίων και τη λειτουργική τους αποτελεσματικότητα, ειδικά όταν αποθηκεύονται σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου. Διαπίστωσε ότι για τη διόρθωση του χρόνου ροής υγείων εθελοντών που έλαβαν ασπιρίνη χρειάζονταν 4 μονάδες φρέσκων αιμοπεταλίων (<4 ώρες στους 22°C). Για το ίδιο αιμοστατικό αποτέλεσμα χρειάζονταν 8 μονάδες αποθηκευμένων στους 22°C αιμοπεταλίων για 24 ώρες και 12 μονάδες αποθηκευμένων για 48 ώρες στις ίδιες συνθήκες αιμοπεταλίων. Αντίθετα όταν τα αιμοπετάλια αποθηκεύονταν στο 4°C για 24 ώρες αρκούσε 1 μόνο μονάδα. Συμπέρανε ότι διαφορετικές συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας αποθήκευσης των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων επηρεάζουν τη απαιτούμενη δόση για τη διόρθωση της αιμοστατικής διαταραχής που προκαλεί η ασπιρίνη. (Handin & Valeri, 1971) (Valeri, 1976)

Αντίστοιχους προβληματισμούς για τις ιδανικές συνθήκες φύλαξης των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων μοιράζονταν και οι Becker και συν. από το 1973. Πραγματοποίησαν *in vitro* και *in vivo* μελέτες αιμοπεταλίων προς μετάγγιση αποθηκευμένων στους 4°C και 22°C. Διαπίστωσαν με σημασμένα με ⁵¹Cr αιμοπετάλια πως η ανάκτηση μετά από αποθήκευση στους 4°C για 72 ώρες ήταν μειωμένη, γύρω στο 45%, ενώ η επιβίωσή τους υπολογίστηκε στις 1,3 ημέρες. Αντίθετα τα αποθηκευμένα στους 22°C αιμοπετάλια παρουσίαζαν ανομοιόμορφα αποτελέσματα ανάκτησης, ανάλογα με την τιμή του pH. Έτσι τα αιμοπετάλια με χαμηλότερο pH παρουσίαζαν ανάκτηση μια ώρα μετά τη μετάγγιση της τάξης του 52% και επιβίωση 0,5 ημέρες. Τα αιμοπετάλια όμως με υψηλότερο pH εμφάνιζαν σαφώς καλύτερα αποτελέσματα. Αυτοί μελέτησαν την αιμοστατική αποτελεσματικότητα μεταγγισθέντων αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές και θρομβοπενικούς ασθενείς με ενεργό αιμορραγία. Παρατήρησαν ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν για λιγότερο από 24 ώρες είτε στους 4°C, είτε στους 22°C παρουσίαζαν παρόμοια αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων μετά από τη μετάγγιση. Μετά όμως από αποθήκευση 48 ή 72 ωρών τα αιμοπετάλια των 4°C είχαν καλύτερα αποτελέσματα. Η μειωμένη αποτελεσματικότητα των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου όμως σχετιζόνταν και με *in*

in vitro χαρακτηριστικά ανεπαρκούς ποιότητας των αντίστοιχων μονάδων και κυρίως το χαμηλότερο pH. Ταυτόχρονα μελέτησαν και την αποτελεσματικότητα των μεταγγίσεων αυτών στην βελτίωση του χρόνου ροής των θρομβοπενικών ασθενών και διαπίστωσαν σαφή υπεροχή των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Διαπίστωσαν ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια ήταν σαφώς αποτελεσματικότερα στη διόρθωση του χρόνου ροής υγείων που έλαβαν ασπιρίνη. Επίσης τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια ήταν αποτελεσματικότερα αυτών που αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου στη διακοπή της αιμορραγίας θρομβοπενικών ασθενών. (Becker, et al., 1973)

Τα αποτελέσματα όμως των Filip και συν. δεν φαίνεται να συμφωνούν με τις προηγούμενες αναφορές. Αυτοί μετάγγισαν θρομβοπενικούς ασθενείς με αιμοπετάλια αποθηκευμένα στους 2-4°C και 20-24°C για 24 ή 72 ώρες. Διαπίστωσαν ότι παρουσίαζαν παρόμοια αιμοστατικά αποτελέσματα το πρώτο 24ώρο αποθήκευσης ανεξάρτητα από την θερμοκρασία αποθήκευσης. Μετά όμως από 72 ώρες αποθήκευσης η αιμοστατική αποτελεσματικότητά των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων παρουσιάζονταν υποδεέστερη. (Filip & Aster, 1978)

Οι Slichter και Harker το 1976 πραγματοποίησαν μια εκτεταμένη έρευνα πολλών παραγόντων που δυνητικώς επηρεάζουν την λειτουργικότητα και τη βιωσιμότητα των αιμοπεταλίων. Μελέτησαν πώς παράγοντες όπως το είδος των ασκών συλλογής, του αντιπηκτικού, η δύναμη φυγοκέντρωσης, οι συνθήκες αποθήκευσης όπως η θερμοκρασία, η ανακίνηση κλπ. επηρεάζουν τη βιωσιμότητα και λειτουργικότητα των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων. Εκτιμήθηκε η ανάκτηση και η επιβίωση των μεταγγισμένων αιμοπεταλίων με τη ραδιοσήμανσή τους με ⁵¹Cr. Η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων υπολογίστηκε με βάση τη διόρθωση του χρόνου ροής σε απλαστικούς ασθενείς με σοβαρή θρομβοπενία, που μάλιστα προσδιορίζονταν με πολύ συχνές μετρήσεις, και έως τέσσερις ημέρες μετά με ταυτόχρονη συνεκτίμηση και του αριθμού των αιμοπεταλίων στο αίμα των ασθενών. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια και για διάστημα έως 72 ωρών ήταν αποτελεσματικά στη διόρθωση του χρόνου ροής των θρομβοπενικών ασθενών, ενώ τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια εμφάνιζαν δυσμενώς επηρεασμένη λειτουργία και μειωμένη αποτελεσματικότητα. Μάλιστα τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσίαζαν πενιχρά αποτελέσματα βελτίωσης της αιμορραγικής διάθεσης των ασθενών, ειδικά μετά τις 2 ½ ώρες μετά τη μετάγγιση. (Slichter & Harker, 1976)

Μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι τη δεκαετία του 1970 υπήρχε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τις κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων. Έκτοτε μόλις το 2019 οι Cohn και συν επανέρχονται με μια προσπάθεια να εκτιμήσουν την λειτουργική αποτελεσματικότητα των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Θέλησαν να διερευνήσουν τη δυνατότητα διόρθωσης της αιμορραγικής διάθεσης που προκαλούν τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, όπως πιθανώς θα ήταν απαραίτητο όταν θα προέκυπτε ένας σοβαρός τραυματισμός.

Αφού έλαβαν με αιμοπεταλιαφαίρεση αιμοπετάλια από υγιείς εθελοντές τους χορήγησαν αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα (ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη) για τρεις ημέρες. Κατόπιν τους χορήγησαν τα αιμοπετάλιά τους εκ νέου. Εκτίμησαν την αιμοστατική κατάσταση τους προσδιορίζοντας το χρόνο ροής, πριν και μετά τη μετάγγιση των αιμοπεταλίων. Τα μισά αιμοπετάλια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, κατά τη συνήθη διαδικασία και τα υπόλοιπα στους 2-6°C. Ένα μήνα μετά την αρχική έρευνα οι ίδιοι εθελοντές υποβλήθηκαν εκ νέου στην ίδια διαδικασία. Αυτή τη φορά όμως έλαβαν το προϊόν με την εναλλακτική θερμοκρασία αποθήκευσης. Αυτοί δηλαδή που έλαβαν αρχικά τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια, τώρα έλαβαν αυτά που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και αντίστροφα. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι χρόνοι ροής επηρεάστηκαν αρχικά σημαντικά από τη χορήγηση των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων. Στη συνέχεια η διαταραχή αυτή δεν διορθώθηκε αποτελεσματικά από τη χορήγηση των αιμοπεταλίων. Πάντως τόσο τα εν ψυχρώ όσο και τα σε θερμοκρασία δωματίου αποθηκευμένα αιμοπετάλια εμφάνιζαν συγκρίσιμα αποτελέσματα χωρίς ουσιαστικές διαφορές. (Cohn, et al., 2019)

Οι Miles και συν. το 2019 εκτίμησαν μια σειρά από παραμέτρους συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα της μετάγγισης αιμοπεταλίων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο στους 2-6°C. Σε οκτώ υγιείς εθελοντές παρέλαβαν αιμοπετάλια με αιμοπεταλιαφαίρεση. Τα αιμοπετάλια αυτά αποθηκεύτηκαν, κατόπιν τυχαίας επιλογής, στους 4°C ή στους 22°C για 5 ημέρες. Την πέμπτη ημέρα πραγματοποιήθηκε η μετάγγιση των αιμοπεταλίων αφού προηγουμένως, 12-24 ώρες πριν, έλαβαν δόση φόρτισης ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μετά από τουλάχιστον δέκα ημέρες υπό τις αντίστροφες συνθήκες θερμοκρασίας φύλαξης. Μια ώρα μετά τη μετάγγιση η διορθωμένη αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων δεν διέφερε ουσιαστικά μεταξύ των

δου ομάδων. Όμως ώρες μετά τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσίαζαν σημαντικά μικρότερη τιμή διορθωμένης αύξησης αιμοπεταλίων.

Η εκτίμηση της αιμοστατικής ικανότητας έγινε με τη χρήση της συσκευής VerifyNOW. 1 και 4 ώρες μετά τη μετάγγιση και τα δυο προϊόντα έδειξαν επαρκή ικανότητα αντιστροφής της δράσης της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής. Όμως 24 ώρες αργότερα η αντιαιμοπεταλιακή δραστικότητα επανεμφανίστηκε στα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια. Πιθανή αιτία η επιταχυνόμενη κάθαρση των αιμοπεταλίων αυτών. Ο χρόνος ροής δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δυο ομάδων. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε απόκριση στο κολλαγόνο ήταν καλύτερη, 1 και 4 ώρες μετά τη μετάγγιση για τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Ελέγχθηκαν επίσης με κυτταρομετρία ροής η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 και η έκκριση α κοκκίων. Ακόμη η συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε απόκριση στο αραχιδονικό και το ADP. Στις παραμέτρους αυτές δεν διαπιστώθηκε διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων.

Διαπιστώθηκε εν κατακλείδι μάλλον κατωτερότητα των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων ως προς κάποιες παραμέτρους και προτείνεται η περαιτέρω εκτίμηση των αποτελεσμάτων. (Miles, et al., 2019)

4.3 Κλινικές μελέτες

Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα μιας τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης που διενεργείται στη Νορβηγία είναι επίσης ενδιαφέροντα. Συνέκριναν αιμοπετάλια αφαίρεσης σε προσθετικό διάλυμα, που αποθηκεύονταν είτε στους 4°C υπό συνεχή ανακίνηση και έως 7 ημέρες, είτε σε θερμοκρασία δωματίου 22°C πάλι υπό συνεχή ανακίνηση. Τα αιμοπετάλια αυτά χορηγήθηκαν σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μείζονες καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις. Εκτιμήθηκαν παράγοντες όπως η μετεγχειρητική αιμορραγία, η συνολική ανάγκη για μεταγγίσεις καθώς και εργαστηριακές παράμετροι πήκτικότητας και αιματολογικές εξετάσεις. Επιπλέον καταγράφονταν ανεπιθύμητες ενέργειες όπως θρομβοεμβολικά επεισόδια κατά τη διάρκεια της νοσηλείας.

Τα συμπεράσματα των ερευνητών συνοψίζονται στο ότι οι ασθενείς που έλαβαν εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσίαζαν καλύτερη έκβαση με μειωμένη ανάγκη μεταγγίσεων μετά την επέμβαση. Επίσης δεν εμφάνιζαν αυξημένη επίπτωση θρομβοεμβολικών συμβαμάτων. (Apelseth, et al., 2017/10/09)

Στην κατεύθυνση αυτή έμμεσα συντέινει και η έρευνα της Manno και συν. που μελέτησε παιδιά που υποβλήθηκαν σε μείζονες καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις με ανάγκη εξωσωματικής κυκλοφορίας. Μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα χορήγησης φρέσκου ολικού αίματος VFWB σε θερμοκρασία 2-6°C, έναντι ανασυσταθέντος, συνδιασμού δηλαδή συμπυκνωμένων ερυθρών, φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος και αιμοπεταλίων. 30 λεπτά και 3 ώρες μετά την επέμβαση εκτιμήθηκε η συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε απόκριση στη δράση του ADP και της επινεφρίνης και τα ανασυσταθέντα προϊόντα βρέθηκαν να υπολείπονται έναντι του φρέσκου ολικού αίματος.

Το τελικό συμπέρασμα ήταν ότι η χορήγηση φρέσκου ολικού αίματος 48 ωρών σχετιζόταν με μειωμένη μετεγχειρητική απώλεια αίματος και σε ένα βαθμό αυτή συσχετίστηκε με την καλύτερη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. (Manno, et al., 1991)

4.4 Μελέτες της επίδρασης του ψύχους σε μεταγγιζόμενα αιμοπετάλια σε πειραματόζωα.

Οι in vitro μελέτες που περιγράψαμε μέχρι τώρα υποδεικνύουν την αιμοστατική ανωτερότητα των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Το ερώτημα όμως που παραμένει είναι εάν είναι αυτή αρκετή κατά την αντιμετώπιση των προκλήσεων της μαζικής αιμορραγίας. Ειδικά αν συνυπολογίσουμε την ταχεία κάθαρση των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων γεννιέται το ερώτημα αν τα μεταγγιζόμενα αιμοπετάλια μπορούν με επαρκεία να συμμετάσχουν στο σχηματισμό του θρόμβου και τη διακοπή της αιμορραγίας in vivo.

Η ανάπτυξη ζωικών μοντέλων τραύματος θα μπορούσε λοιπόν να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες για την in vivo συμπεριφορά των ψυχθέντων αιμοπεταλίων και την εξαγωγή συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητά τους.

Ο Wu και οι συν μελέτησαν τη συμμετοχή των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων στο σχηματισμό θρόμβου σε πειραματικό μοντέλο αρουραίου με ηπατικό τραυματισμό και

αιμορραγικό σοκ. Διαπίστωσαν ότι τα αιμοπετάλια που μεταγγίστηκαν αφού διατηρήθηκαν σε ψύξη για 7 ημέρες ήταν αιμοστατικά συγκρίσιμα με τα φρέσκα αιμοπετάλια. (Wu, et al., 2017)

Σε άλλες μελέτες χρησιμοποιούνται διαγονιδιακά ποντίκια NOD/SCID στα οποία είναι δυνατή η μετάγγιση ανθρώπινων αιμοπεταλίων χωρίς ανοσολογική κάθαρση από την άμυνα του ποντικού.

Οι Marini και συν. μελέτησαν την επιβίωση αιμοπεταλίων μετά από μετάγγισή τους σε διαγονιδιακά ποντίκια NOD/SCID. Σύγκριναν διαφορετικές συγκεντρώσεις PAS και την επίδραση της θερμοκρασίας φύλαξης. Διαπίστωσαν ότι τα PLT που ήταν αποθηκευμένα σε PAS με μόνο 20% υπολειπόμενο πλάσμα απομακρύνθηκαν γρηγορότερα από την κυκλοφορία του ποντικίου σε σύγκριση με αυτά που ήταν αποθηκευμένα σε 100% πλάσμα, και αυτό ήταν ακόμη πιο έντονο σε ψυχρά αποθηκευμένα PLT (Marini, et al., 2019)

4.5 Βασικά συμπεράσματα και προβληματισμοί από τις in vivo μελέτες των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων προς μετάγγιση.

Από όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα διαπιστώνουμε ότι αν και οι μελέτες για τα in vitro χαρακτηριστικά των εν ψυχρώ μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων είναι άφθονες, οι αντίστοιχες μελέτες in vivo είναι σαφώς λιγότερες. Φυσικά αυτό είναι λογικό καθώς τέτοιες προσεγγίσεις παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες αφού αφορούν υγιείς ή και ασθενείς που λαμβάνουν μετάγγιση ενός «νέου» προϊόντος, οπότε και λογικά ανακύπτουν και πολλαπλά ζητήματα σχεδιασμού, διαχείρισης, ηθικής και σκοπιμότητας. Μάλιστα από αυτές τις μελέτες αρκετές εστιάζουν στην ανάκτηση και την επιβίωση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων, ενώ πολύ λιγότερες μελετούν τη λειτουργική επάρκεια αυτών.

Επιπλέον διαπιστώσαμε ότι οι περισσότερες από τις in vivo μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί αρκετά χρόνια πριν, κυρίως κατά τη δεκαετία του 1970. Από τότε έχουν αλλάξει βέβαια πολλά τόσο στην συλλογή, όσο και στη διατήρηση των αιμοπεταλίων. (Mack, et al., 2020)

Έγινε δε νομίζουμε σαφές ότι ενίοτε τα αποτελέσματα πολλών ερευνών δεν συμβαδίζουν. Έτσι πχ άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπε-

τάλια είναι αιμοστατικά αποτελεσματικότερα και άλλοι ακριβώς το αντίθετο. Τα αποτελέσματα αυτά, αν και δημιουργούν σύγχυση, ερμηνεύονται συνήθως από τις διαφορετικές διαδικασίες, μεθόδους ή το σχεδιασμό κάθε έρευνας. Για παράδειγμα ο Becker και συν. θεώρησαν αιμοστατικά ανώτερα τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια εκτιμώντας την βελτίωση του χρόνου ροής μετρώντας τη μόνο μια ώρα μετά τη μετάγγιση. Αντίθετα, οι Slichter και Harker προσδιορίζουν το χρόνο ροής για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και αποφαίνονται ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια εμφανίζουν επηρεασμένη λειτουργικότητα σε σύγκριση με αυτά που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Παρόλα όμως αυτά η ανασκόπηση των in vivo μελετών όπως παραπάνω παρουσιάστηκαν μας βοηθά να οδηγηθούμε σε χρήσιμα συμπεράσματα και πιθανές εφαρμογές. Διαπιστώνεται ότι η αποθήκευση των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύχους οδηγεί σε μειωμένη ανάκτηση και σαφώς μειωμένη επιβίωσή τους. Αντίστροφα όμως η εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων φαίνεται να σχετίζεται με καλύτερα αιμοστατικά αποτελέσματα έστω και βραχείας διάρκειας.

Από αυτά τα πορίσματα γίνεται αντιληπτό ότι η χρήση των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων ίσως είναι ιδιαίτερα επωφελής για ασθενείς με ενεργό αιμορραγία που έχουν ανάγκη μεταγγίσεων.

Κεφάλαιο 5.

Θέματα προς διευκρίνιση.

5.1 Αιμοπετάλια για αιμορραγία ή προφύλαξη

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η μετάγγιση αιμοπεταλίων πραγματοποιείται σε ασθενείς με σοβαρή θρομβοπενία με σκοπό την πρόληψη πιθανής αιμορραγίας αλλά και σε ασθενείς που έχουν ήδη εμφανίσει σοβαρή αιμορραγία σαν αποτέλεσμα μείζονος χειρουργικής επέμβασης ή τραυματισμού.

Όταν πρόκειται για την πρόληψη αιμορραγίας σε θρομβοπενικούς ασθενείς αποτελεί λογική προτεραιότητα η αυξημένη επιβίωση των αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η συχνότητα μεταγγίσεων προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις όπως η αλλοανοσοποίηση.

Όταν όμως συζητάμε για ασθενείς με ενεργό σοβαρή αιμορραγία η προσέγγιση είναι προφανώς διαφορετική. Στους ασθενείς αυτούς η αιμοστατική αποτελεσματικότητα και η αντοχή του σχηματιζόμενου θρόμβου είναι η σημαντικότερη παράμετρος. Ο χρόνος παραμονής στην κυκλοφορία είναι δευτερεύουσας σημασίας και η δράση των αιμοπεταλίων απαιτείται να είναι άμεση. Μάλιστα στους ασθενείς αυτούς η μειωμένη επιβίωση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία του ασθενούς θα μπορούσε να είναι και πλεονέκτημα καθώς μειώνει την πιθανότητα ανεπιθύμητων θρομβωτικών συμβαμάτων αφότου η αιμορραγία έχει κατασταλεί.

Όπως ήδη έχει γίνει αντιληπτό τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται εν ψυχρώ και αυτά που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου έχουν τελείως διαφορετικό προφίλ επιβίωσης και ανάκτησης μετά από μετάγγιση αλλά και αιμοστατικής αποτελεσματικότητας.

Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαμε λογικά να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως ενώ τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου είναι κατάλληλα για προληπτική μετάγγιση σε ασθενείς με σοβαρή θρομβοπενία, τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια συγκεντρώνουν σειρά πλεονεκτημάτων που τα καθιστούν καταλληλότερα για ασθενείς με ενεργό αιμορραγία.

Έτσι ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) από τις 27 Μαρτίου 2015 έχει εγκρίνει τη χρήση αιμοπεταλίων προς μετάγγιση αποθηκευμένων στο ψύχος, χωρίς ανακίνηση, μέχρι 3 ημέρες από τη συλλογή τους. Τα αιμοπετάλια αυτά ψυχρής αποθήκευσης, (CS-PLT) προορίζονται για χρήση σε ασθενείς με τραύματα και ενεργό αιμορραγία.

5.2 Αιμοπετάλια σε πλάσμα ή Προσθετικό Διάλυμα Αιμοπεταλίων (PAS).

Οι προσπάθειες για την αύξηση της διάρκειας ζωής και τη διατήρηση της λειτουργικότητας των προϊόντων αίματος οδήγησαν στην παραγωγή και διερεύνηση διαφόρων προσθετικών διαλυμάτων. Έτσι και για τη φύλαξη των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων έχουν προταθεί διαλύματα που θα υποστηρίζουν το μεταβολισμό, θα λειτουργούν ρυθμιστικά για το pH και θα μειώνουν την αποθηκευτική βλάβη. Επιπλέον η αντικατάσταση του πλάσματος από κάποιο προσθετικό διάλυμα το καθιστά διαθέσιμο για άλλες χρήσεις πχ FFP και ταυτόχρονα σχετίζεται με την πρόληψη κάποιων ανεπιθύμητων ενεργειών όπως ανοσολογικών αντιδράσεων, TRALI, αλλοανοσοποίηση, ABO ασυμβατότητα κλπ. Ακόμη κάποια προσθετικά διαλύματα μπορούν μόνα ή σε συνδυασμό με άλλους χειρισμούς να χρησιμοποιηθούν για τον περιορισμό της βακτηριακής ανάπτυξης και την καταστολή πιθανών παθογόνων παραγόντων. (Alhumaidan & Sweeney, 2012)

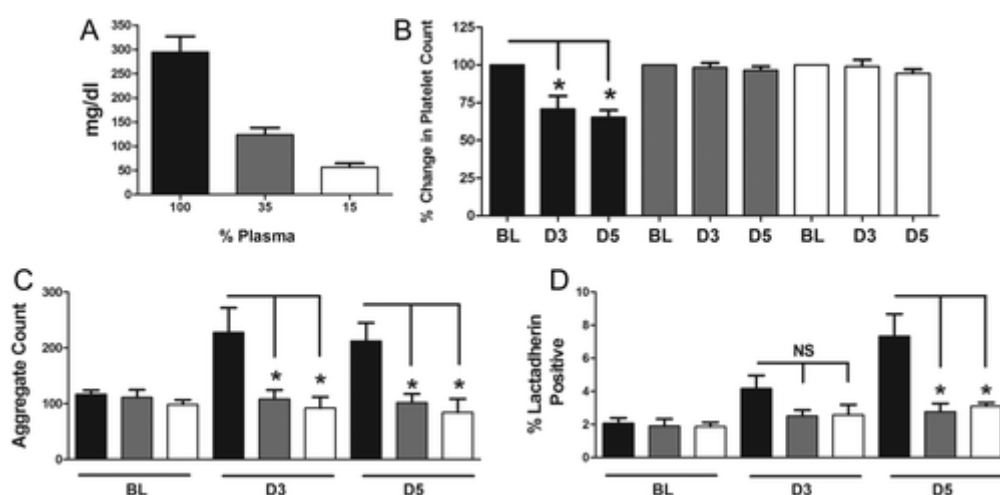
Μελέτες έχουν δείξει ότι ένα ελάχιστο ποσοστό πλάσματος της τάξης του 30% στο PAS παρείχε βέλτιστα χαρακτηριστικά αποθήκευσης και πληρούσε τα τρέχοντα κριτήρια του FDA για το pH, την ανάκτηση και την επιβίωση. (Adams, et al., 1986)

Οι Stubbs και συν μελέτησαν τη χρήση των εν ψυχρώ αιμοπεταλίων και διαπίστωσαν αυξημένα ποσοστά απόρριψης λόγω της μικρής διάρκειας χρήσης, αλλά και του σχηματισμού θρόμβων στα εν ψυχρώ αιμοπετάλια. (Stubbs, et al., 2017)

Ο Getz και οι συν. συμπέραναν ότι η αποθήκευση στους 4°C οδηγεί σε μερική ενεργοποίηση των υποδοχέων GPIIb-IIIa που σχετίζεται με τον σχηματισμό συσσωματωμάτων με την πάροδο του χρόνου φύλαξης. Διαπίστωσαν όμως ότι όταν τα αιμοπετάλια αποθηκεύονταν στο ψύχος διαλυμένα σε προσθετικό διάλυμα παρουσίαζαν μειωμένη τάση συσσωμάτωσης, ενώ διατηρείται επαρκής η λειτουργική απόκρισή τους. Απέδωσαν τη

διαφορά στην απομάκρυνση του πλάσματος και μαζί με αυτό του ινωδογόνου που λειτουργεί σαν γέφυρα σύνδεσης των αιμοπεταλίων με τη μεσολάβηση του ενεργοποιημένου GPIIb-IIIa. Διαπίστωσαν πως ο διαχωρισμός των αιμοπεταλίων από το πλάσμα και η αποθήκευσή τους σε προσθετικό διάλυμα επιλύει το πρόβλημα του σχηματισμού συσσωματωμάτων κατά την αποθήκευση στους 4°C ενώ ταυτόχρονα διατηρεί τις μεταβολικές και λειτουργικές αποκρίσεις τους σε ικανοποιητικό επίπεδο. (Getz, et al., 2016)

Μάλιστα ο Getz και οι συν. μελέτησαν και σε ποια αναλογία πλάσματος/PAS τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσιάζουν καλύτερα χαρακτηριστικά. Διαπίστωσαν ότι όταν το ποσοστό του πλάσματος ήταν κάτω από 35% ο αριθμός των αιμοπεταλίων διατηρούνταν σταθερός και δεν σχηματίζονταν συσσωματώματα. Επιπλέον και η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης παρέμενε σχετικά χαμηλή σε δείγματα με μειωμένο ποσοστό πλάσματος και ινωδογόνου. (Getz, et al., 2016)



Εικόνα 50 Επίδραση των επιπέδων ινωδογόνου στον αριθμό PLT και την έκθεση της PS. (A) Τα επίπεδα ινωδογόνου προσδιορίστηκαν για κάθε αραιώση πλάσματος (n = 3) σε PAS. (B) Ο αριθμός PLT εκτιμήθηκε στην αρχική τιμή (BL) και οι αλλαγές αναφέρθηκαν την Ημέρα 3 (D3) και την Ημέρα 5 (D5) για PAS PLT που αποθηκεύτηκαν στους 4°C παρουσία (■) 100, (▒) 35 και (□) 15% πλάσμα (n = 4). (Γ) Ο σχηματισμός συσσωματωμάτων μετρήθηκε με μια αύξηση του αριθμού διασποράς προς τα εμπρός πλευρά έξω από την ενιαία πύλη PLT και αναφέρεται ως αριθμός γεγονότων που υπάρχουν σε 20.000 συμβάντα που καταγράφηκαν. (D) Η έκθεση PS των PAS PLT που αποθηκεύτηκαν στους 4°C παρουσία πλάσματος 100, 35 και 15% αναλύθηκε μέσω λακταδερίνης καθ' όλη την περίοδο αποθήκευσης (n = 4). *p < 0,05; NS = όχι σημαντικά διαφορετικό. (Getz, et al., 2016)

Οι Nair και συν κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια (CSP) διατηρούν τη συσταλτική τους λειτουργία για έως και 21 ημέρες τόσο στο αυτόλογο πλάσμα (AP) όσο και στο PAS και σχηματίζουν εξαιρετικά διατεταγμένα δίκτυα ινώδους

παρόμοια με αυτά των φρέσκων αιμοπεταλίων. Αντίθετα, τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RTP) σε αυτόλογο πλάσμα παρουσίαζαν μειωμένη συσταλτική λειτουργία την 5^η ημέρα, ενώ τα αποθηκευμένα σε PAS (RTP) διατηρούσαν τη συσταλτική λειτουργία για έως και 21 ημέρες. (Nair, et al., 2021)

Επιπλέον αυτών οι Reddoch και συν. μελέτησαν τη μεταβολική, λειτουργική και την κατάσταση ενεργοποίησης αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται στο ψύχος και φυλάσσονται σε δυο διαφορετικά είδη προσθετικών διαλυμάτων (συλλογή με Trima στο ISO PAS και συλλογή με Amicus στο INT PAS). Διαπίστωσαν ότι τα αιμοπετάλια που συλλέχθηκαν με Trima σε ISO εμφανίζουν καλύτερη πρόσφυση στο κολλαγόνο υπό συνθήκες ροής και μεγαλύτερη αντοχή θρόμβου και εν γένει ανώτερη λειτουργία *in vitro* και μπορεί να είναι καλύτερα για τη θεραπεία ασθενών με αιμορραγία. (Reddoch-Cardenas, et al., 2018)

Οι ίδιοι ερευνητές αργότερα διαπίστωσαν ότι τα αιμοπετάλια μετά από 18 ημέρες αποθήκευσης σε T-PAS+ σε συνθήκες ψύχους, διατηρούσαν pH $6,71 \pm 0,04$, ο αριθμός PLT ήταν συγκρίσιμος με της ημέρας 3, η λειτουργία PLT (συσσωμάτωση και δύναμη θρόμβου) ήταν συγκρίσιμη με την Ημέρα 5 αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου (RTP) και η ενεργοποίηση PLT αυξήθηκε σημαντικά. (Reddoch-Cardenas, et al., 2019)

Τέλος οι Stolla και συν. σύγκριναν την ανάκτηση αυτόλογων ραδιοσημασμένων αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν στο ψύχος και φυλάσσονταν είτε σε πλάσμα είτε σε προσθετικό Intersol ή Isoplate. Διαπίστωσαν ότι μετά από αποθήκευση 10 ημερών, τόσο οι μονάδες πλάσματος όσο και οι μονάδες Intersol είχαν σημαντικά καλύτερες ανακτήσεις PLT από τις μονάδες Isoplate ($24\% \pm 8\%$ έναντι $11\% \pm 3\%$ [$55\% \pm 11\%$ έναντι $21\% \pm 8\%$ ως ποσοστό των δεδομένων ελέγχου], $p = 0,002$ και $18\% \pm 4\%$ έναντι $11\% \pm 3\%$ [$43\% \pm 6\%$ έναντι $21\% \pm 8\%$ ως ποσοστό των δεδομένων ελέγχου], $p = 0,004$, αντίστοιχα). Ενώ οι *in vitro* μεταβλητές υποδηλώνουν σε μεγάλο βαθμό συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ πλάσματος και PAS. (Stolla, et al., 2018)

5.3 Ειδικά κρυοπροστατευτικά διαλύματα

Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύχους συνεπάγεται μια σειρά μεταβολών σε φυσικές και βιολογικές παραμέτρους. Αυτές οι μεταβολές σχετίζονται με αντίστοιχη

επίδραση στη λειτουργικότητα αλλά και την επιβίωση των αιμοπεταλίων μετά από τη μετάγγιση. Η πιθανότητα κάποιες από αυτές τις μεταβολές να μπορούν να περιοριστούν και να προσδώσουν έτσι στα μεταγγιζόμενα αιμοπετάλια βελτιωμένα χαρακτηριστικά είναι προφανώς ιδιαίτερα ελκυστική.

Ήδη περιγράψαμε ότι το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την αποθηκευτική βλάβη των αιμοπεταλίων τόσο σε θερμοκρασία δωματίου όσο και στο ψυγείο. Θεωρητικά λοιπόν η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών θα μπορούσε να σχετίζεται με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Στην κατεύθυνση αυτή έχουν προταθεί διάφορα φυσικά ή χημικά συστατικά.

Η Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC) επηρεάζει τα αιμοπετάλια μέσω της αλκαλοποίησης του pH και διορθώνει την αυξημένη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου που επάγεται από το ψύχος. (Handigund, et al., 2016) Οι Hegde και συν. διαπίστωσαν ότι η μακροχρόνια αποθήκευση σε ψύξη προκαλεί μιτοχονδριακή αποσύνδεση και αυξημένη διαρροή πρωτονίων και παραγωγή ROS, η οποία συμβάλλει καθοριστικά στην αυξημένη κάθαρση των λειτουργικών αιμοπεταλίων. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού NAC σε ένα PAS που περιέχει μαγνήσιο με αποτέλεσμα τη βελτίωση του χρόνου αιμορραγίας της ουράς ποντικού. (Hegde, et al., 2021)

Οι Ekaney και συν. μελέτησαν την επίδραση της ρεσβερατρόλης και του κυτοχρώματος C όταν προστίθενται στα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια. Διαπίστωσαν ότι τα αιμοπετάλια αυτά διατηρούσαν την λειτουργικότητά τους έως και μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης συγκρίσιμη με τη λειτουργικότητα της πρώτης ημέρας. (Ekaney, et al., 2017)

Στην κατεύθυνση αυτή έχουν προταθεί και άλλοι παράγοντες που με τον ένα ή τον άλλο τρόπο θα μπορούσαν να βελτιώσουν τη λειτουργικότητα και την επιβίωση των αιμοπεταλίων. Χημικοί του ασβεστίου παράγοντες, όπως το EGTA, δεσμεύοντας τα ιόντα ασβεστίου αναστέλλουν την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης και την επακόλουθη απόπτωση. (Xiang, et al., 2021)

5.4 Εν ψυχρώ αποθήκευση και αδρανοποίηση παθογόνων.

Όπως ήδη έχουμε συζητήσει, οι τεχνολογίες αδρανοποίησης παθογόνων που χρησιμοποιούνται ήδη στα προς μετάγγιση αιμοπετάλια παρέχουν σημαντικά πλεονεκτήματα. Κατα-

στρέφουν τα νουκλεϊκά οξέα των παθογόνων μικροοργανισμών (ιών μικροβίων και παρασίτων). Με τον τρόπο αυτό βελτιώνουν την ποιότητα και την ασφάλεια των χορηγούμενων προϊόντων, ειδικά σε ασθενείς που πάσχουν από βαριά νοσήματα και για τους οποίους ο κίνδυνος μόλυνσης θα μπορούσε να έχει δραματικές συνέπειες. (Seltsam, 2017)

Η εν ψυχρώ αποθήκευση παρουσιάζει ακριβώς το πλεονέκτημα της μειωμένης βακτηριακής ανάπτυξης. (Ketter, et al., 2019) Παρόλα αυτά όμως η παρουσία και ανάπτυξη κάποιων ψυχρόφιλων μικροοργανισμών δεν μπορεί να αποκλειστεί. Μικρόβια όπως η *Yersinia enterocolitica* έχουν σχετιστεί με τη μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων που αποθηκεύονται σε συνθήκες ψύξης. (Guinet, et al., 2011) Επιπλέον η ανάδυση νέων παθογόνων όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο ιός Zika ή και ακόμη ο Sars-Cov19 δημιουργούν νέες προκλήσεις στη μείωση του κινδύνου μετάδοσης παθογόνων με τη μετάγγιση.

Έτσι ο συνδυασμός της εν ψυχρώ αποθήκευσης των αιμοπεταλίων με τις τεχνολογίες αδρανοποίησης παθογόνων παρουσιάζουν κάποιες ενδιαφέρουσες πτυχές. Οι Agey και συν διαπίστωσαν ότι αιμοπετάλια που επεξεργάστηκαν με Intercept και κατόπιν φυλάχθηκαν σε ψύξη για έως και 14 ημέρες παρουσίαζαν επηρεασμένο αιμοστατικό δυναμικό. (Agey, et al., 2021) Οι Johnson και συν. διαπίστωσαν ότι ο συνδυασμός ψύξης και Theraflex οδηγεί σε πρόσθετες φαινοτυπικές μεταβολές τα αιμοπετάλια. (Johnson, et al., 2019)

Συνεπώς ο τρόπος που αλληλεπιδρούν οι τεχνολογίες αδρανοποίησης παθογόνων και ψύξης των αιμοπεταλίων είναι ένα πεδίο που πολλά πρέπει να ερευνηθούν και να διευκρινιστούν προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα.

5.5 Εν ψυχρώ αποθήκευση με ανακίνηση ή όχι.

Η χρήση αιμοπεταλίων προς μετάγγιση αποθηκευμένων σε συνθήκες ψύχους θα μπορούσε να είναι μια χρήσιμη και αποδοτική τακτική. Τα τμήματα αιμοδοσίας παγκοσμίως διαθέτουν την ειδική υποδομή και τεχνογνωσία ψύξης καθώς αυτή εφαρμόζεται ευρύτατα για άλλα προϊόντα όπως τα συμπυκνωμένα ερυθρά.

Ένα ερώτημα που θα προέκυπτε αφορά την επίδραση της ανακίνησης στα αιμοπετάλια ψύξης. Γνωρίζουμε ότι στην αποθήκευση στη θερμοκρασία δωματίου οι ασκοί των

αιμοπεταλίων βρίσκονται υπό διαρκή οριζόντια ήπια ανακίνηση. Η διαδικασία αυτή κρίθηκε απαραίτητη καθώς έτσι αποφεύγεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ενώ διευκολύνεται η ανταλλαγή αερίων δια της επιφάνειας του ασκού.

Οι Reddoch και συν. μελέτησαν *in vitro* την αιμοστατική λειτουργικότητα αιμοπεταλίων αφαίρεσης που αποθηκεύτηκαν και στους 4°C με ή χωρίς ανακίνηση. Διαπίστωσαν ότι η ανάδευση δεν επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε συνθήκες ψύχους. (Reddoch, et al., 2014)

Επίσης και η μεταβολομική ανάλυση που έγινε από τους Zhao και συν. δεν έδειξε ουσιαστική διαφοροποίηση υποδηλώνοντας τελικά ότι μάλλον στα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια η ανάδευση δεν είναι απαραίτητη. (Zhao, et al., 2021)

5.6 Κυκλική αναθέρμανση

Ήδη από το 1978 ο McGill είχε διαπιστώσει ότι οι μορφολογικές αλλαγές που υφίστανται τα αιμοπετάλια μετά από ψύξη, ήταν δυνατό να αναστραφούν μετά από επαναθέρμανσή τους. Διαπίστωσε ότι η διακοπή της ψύξης και η επαναθέρμανση των αιμοπεταλίων για σύντομα χρονικά διαστήματα είχαν σαν αποτέλεσμα την επανασυναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων και τη μερική αποκατάσταση του σχήματος των αιμοπεταλίων. Επιπλέον τα αιμοπετάλια αυτά εμφάνιζαν βελτιωμένη απόκριση συσσωμάτωσης και αντοχή στο υποτονικό σοκ. (McGill, 1978)

Αργότερα οι Xu και συν. διαπίστωσαν σε μοντέλο ποντικού ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονταν στο ψύχος και αναθερμαίνονταν εμφάνιζαν καλύτερη *in vivo* ανάκτηση (Xu, et al., 2013)

Αργότερα οι Skripchenko και συν. πρότειναν τη χρήση μιας εμπορικά διαθέσιμης συσκευής που θα διατηρούσε τα αιμοπετάλια σε ψύξη (5°C) για 11 ώρες και κατόπιν θα τα αναθέρμαινε στους 37°C για 1 ώρα. Διαπίστωσαν ότι τα επαναθερμαινόμενα αιμοπετάλια εμφάνισαν μερική βελτίωση στην πλειονότητα των μεταβλητών αποθήκευσης *in vitro* και δεν διέφεραν στην *in vivo* επιβίωσή τους σε ένα μοντέλο ποντικού SCID σε σύγκριση με εκείνα των πανομοιότυπων αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. (Skripchenko, et al., 2016)

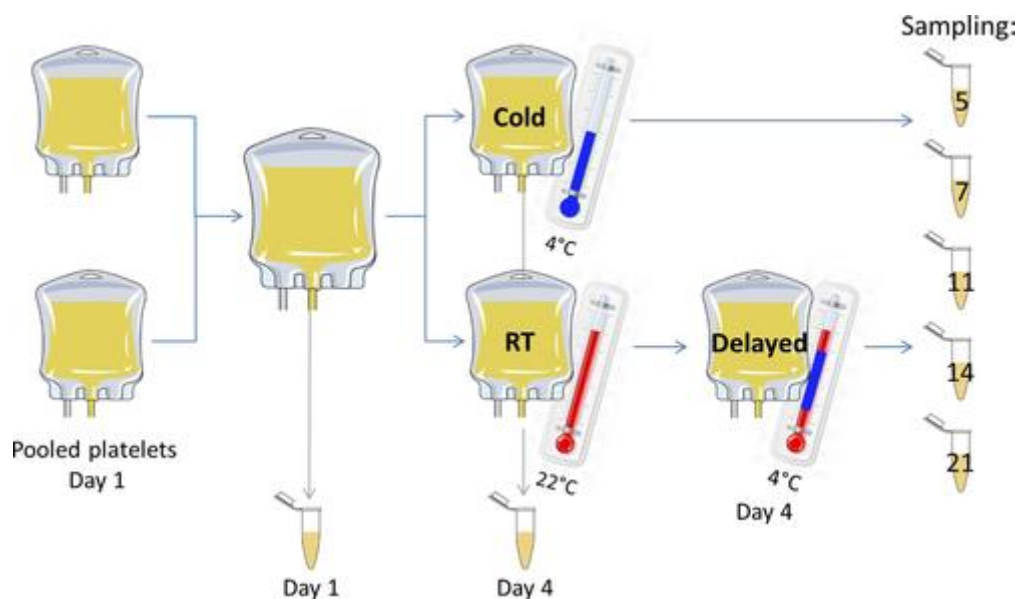
Οι κλινικές δοκιμές με υγιείς εθελοντές και χορήγηση αυτόλογων αιμοπεταλίων έδειξαν παρόμοιο μεταβολικό προφίλ για τα επαναθερμαινόμενα και τα αιμοπετάλια θερμοκρασίας δωματίου (κατανάλωση γλυκόζης, μεταβολή pH, παραγωγή γαλακτικού). Η ανάκτηση όμως και επιβίωση των αιμοπεταλίων αυτών υπολείπεται σαφώς των αιμοπεταλίων θερμοκρασίας δωματίου. Από την άλλη πλευρά παρουσιάζουν καλύτερη εικόνα ενεργοποίησης (υψηλότερη έκφραση P-σελεκτίνης) και ίσως καλύτερη αιμοστατική δραστηριότητα. (Vostal, et al., 2018)

5.7 Καθυστερημένη ψύξη

Μια εναλλακτική προσέγγιση στη φύλαξη των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων αφορά την καθυστερημένη ψύξη τους (delayed cold storage). Κάποιοι ερευνητές προτείνουν τη διατήρηση των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων για 4 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου όπως συνηθίζεται και προτείνεται μέχρι σήμερα. Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια μεταφέρονται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2-6°C προκειμένου να διατηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

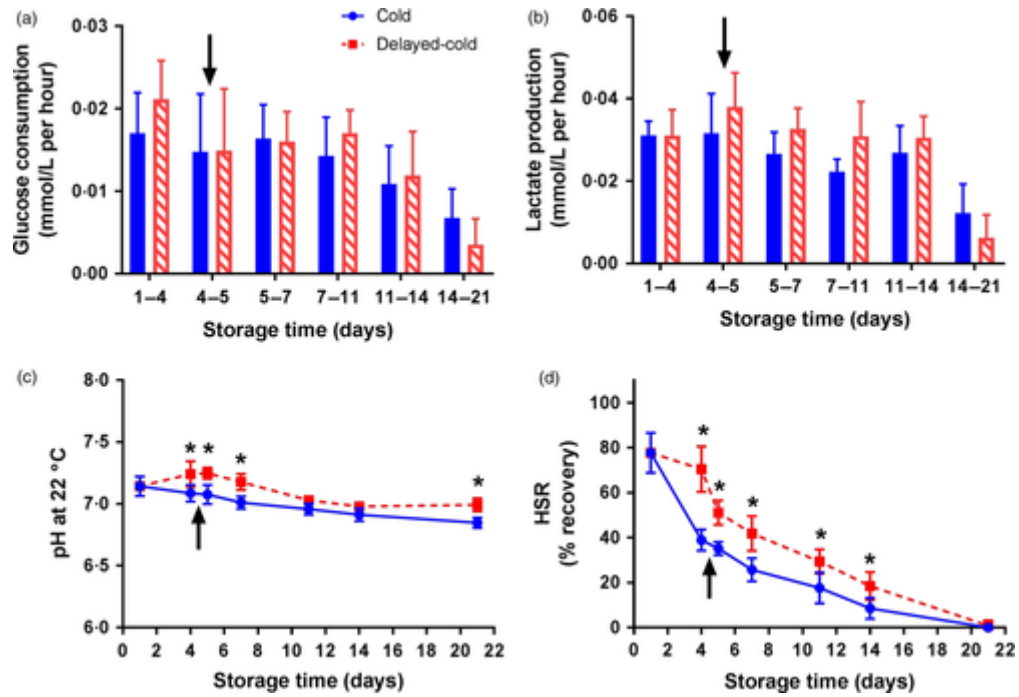
Κάποιοι ερευνητές εκτίμησαν λειτουργικές παραμέτρους και ποιοτικά χαρακτηριστικά αυτών των αιμοπεταλίων και γενικά διαπίστωσαν πως πρόκειται για μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική που αντιμετωπίζει προβλήματα διαθεσιμότητας, ποιότητας και οικονομίας.

Συνδυάζονται με τη μέθοδο αυτή δυο μεγάλα πλεονεκτήματα. Αφενός η βελτιωμένη επιβίωση και ανάκτηση των αιμοπεταλίων που φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου και χορηγούνται προφυλακτικά σε θρομβοπενικούς ασθενείς. Αφετέρου το βελτιωμένο αιμοστατικό δυναμικό και η μεγαλύτερη διάρκεια φύλαξης όταν τα αιμοπετάλια χορηγούνται σε ασθενείς με σοβαρή αιμορραγία μετά από τραυματισμό ή μείζονα χειρουργική επέμβαση.

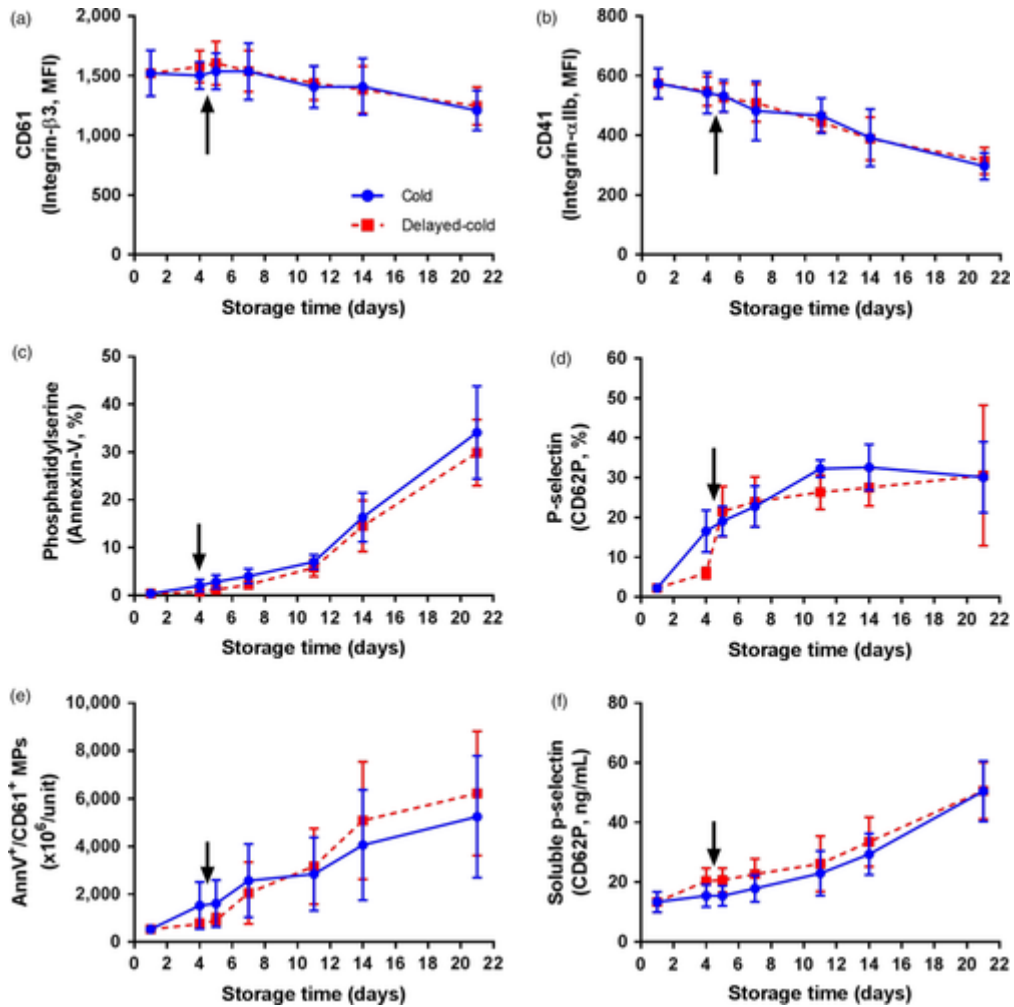


Εικόνα 51 Μεθοδολογία αποθήκευσης και δειγματοληψίας για σύγκριση ψυχρών και καθυστερημένων αιμοπεταλίων. Τα ψυχρά αιμοπετάλια τοποθετήθηκαν αμέσως στο ψυγείο (2-4°C), ενώ οι καθυστερημένες μονάδες αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-24°C) μέχρι την ημέρα 4. Μετά τη δειγματοληψία την ημέρα 4, οι μονάδες θερμοκρασίας δωματίου (RT) μεταφέρθηκαν σε συνθήκες ψύξης για το υπόλοιπο της αποθήκευσης. Τα αιμοπετάλια εξετάστηκαν τις ημέρες 1, 4, 5, 7, 11, 14 και 21. (Wood, et al., 2018)

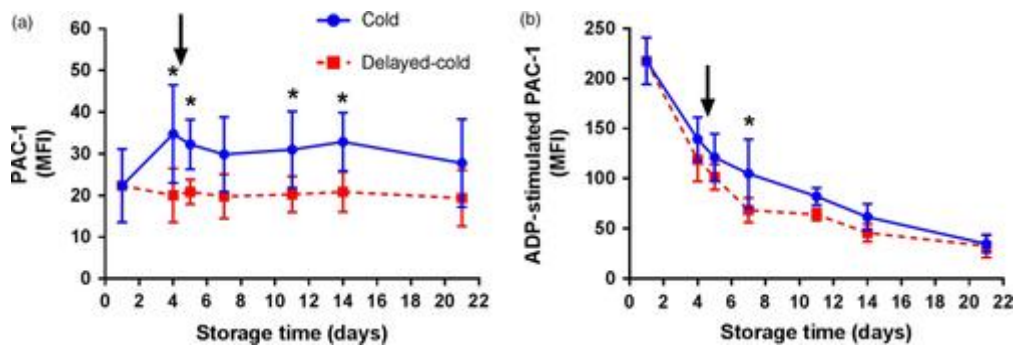
Οι Wood και συν. εκτίμησαν χαρακτηριστικά τέτοιων αιμοπεταλίων καθυστερημένης ψύξης συγκρίνοντάς τα με αιμοπετάλια αποθηκευμένα εν ψυχρώ. Διαπίστωσαν ότι ο αριθμός των αιμοπεταλίων και στις δυο ομάδες ήταν συγκρίσιμος. Το pH και η ωσμωτική απόκριση ήταν υψηλότερα στα αιμοπετάλια καθυστερημένης ψύξης, ενώ μεταβολικοί δείκτες όπως η κατανάλωση της γλυκόζης ή η συγκέντρωση γαλακτικού δεν διέφεραν σημαντικά. Σε ότι αφορά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, δείκτες όπως η έκθεση φωσφατίδυλοσερίνης, CD62-P, το διαλυτό CD62, η παραγωγή μικροσωματιδίων κλπ. δεν παρουσίαζαν αποκλίσεις. Η συσσώρευση τέλος παρουσίαζε παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζοντας σταδιακή εξασθένηση με την πάροδο του χρόνου φύλαξης. (Wood, et al., 2018)



Εικόνα 52 Η καθυστερημένη αποθήκευση σε ψυχρό έχει ως αποτέλεσμα μικρές αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ και στο HSR. Τα αιμοπετάλια τοποθετήθηκαν αμέσως στο ψυγείο (κρύα) ή στο ψυγείο μετά από 4 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου (καθυστερημένη ψύξη). Παρουσιάζονται μεταβολικοί δείκτες (α) κατανάλωσης γλυκόζης, (β) παραγωγής γαλακτικού, (γ) pH και (δ) απόκρισης υποτονικού σοκ (HSR). Οι ρυθμοί κατανάλωσης γλυκόζης και παραγωγής γαλακτικού υπολογίστηκαν μεταξύ των υποδεικνυόμενων ημερών αποθήκευσης ως $\Delta C/\Delta t$. Το βέλος (\uparrow) υποδεικνύει την ώρα κατά την οποία οι καθυστερημένες μονάδες μεταφέρθηκαν σε ψυχρή αποθήκευση. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσο όρο \pm SD (n = 8). * P < 0,05 στο ίδιο χρονικό σημείο. (Wood, et al., 2018)

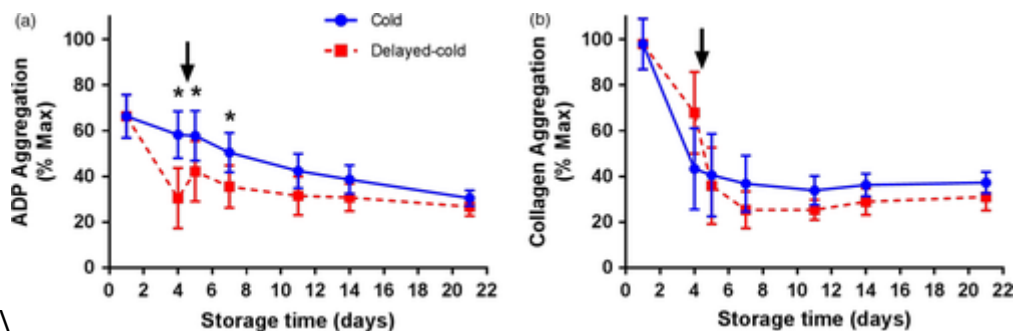


Εικόνα 53 Η καθυστερημένη αποθήκευση σε ψυχρό δεν επηρεάζει σημαντικά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια τοποθετήθηκαν αμέσως στο ψυγείο (κρύα) ή στο ψυγείο μετά από 4 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου (καθυστερημένη-κρύα). Τα αιμοπετάλια χρωματίστηκαν με (α) CD61, (β) CD41, (γ) αννεξίνη-V και (δ) CD62P και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (ε) Τα μικροσωματίδια χρωματίστηκαν με αννεξίνη-V και CD61 και απαριθμήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. (στ) Το διαλυτό CD62P μετρήθηκε στο υπερκείμενο με ELISA. Το βέλος (↑) υποδεικνύει την ώρα κατά την οποία οι καθυστερημένες μονάδες μεταφέρθηκαν σε ψυχρή αποθήκευση. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσο όρο \pm SD (n = 8). Δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. (Wood, et al., 2018)



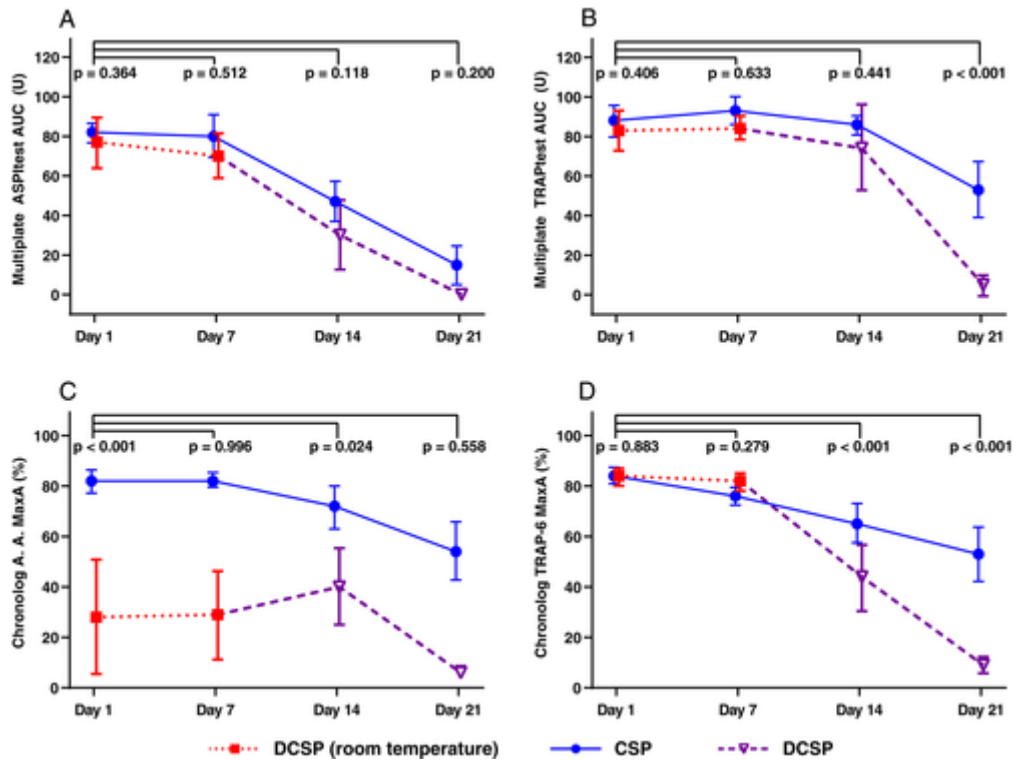
Εικόνα 54 Η καθυστερημένη αποθήκευση σε κρύο αποτρέπει την επαγόμενη από το κρύο ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης α IIb β 3. Τα αιμοπετάλια τοποθετήθηκαν αμέσως στο ψυγείο (κρύα) ή στο ψυγείο μετά από 4 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου (καθυστερημένη-κρύα). Τα αιμοπετάλια χρωματίστηκαν με PAC-1 (α) υπό βασικές συνθήκες

και (β) μετά από διέγερση με 20 μmol ADP. Παρουσιάζεται η διάμεση ένταση φθορισμού (MFI). Το βέλος (↑) υποδεικνύει την ώρα κατά την οποία οι καθυστερημένες μονάδες μεταφέρθηκαν σε ψυχρή αποθήκευση. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσο όρο ± SD (n = 8). * P < 0,05 στο ίδιο χρονικό σημείο. (Wood, et al., 2018)



Εικόνα 55 Η καθυστερημένη αποθήκευση στο ψυχρό επηρεάζει ελάχιστα τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια καταψύχθηκαν αμέσως (κρύα) ή ψύχθηκε μετά από 4 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου (καθυστερημένη-κρύα). Τα αιμοπετάλια αραιώθηκαν στο πλάσμα και διεγέρθηκαν είτε με (α) 20 μmol ADP ή (β) με 10 μg/ml κολλαγόνο. Το βέλος (↑) υποδεικνύει την ώρα κατά την οποία οι καθυστερημένες μονάδες μεταφέρθηκαν σε ψυχρή αποθήκευση. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσο όρο ± SD (n = 8). * P < 0,05 στο ίδιο χρονικό σημείο (Wood, et al., 2018).

Οι Braathen και συν. μελέτησαν τα *in vitro* χαρακτηριστικά αποθηκευμένων εν ψυχρώ αιμοπεταλίων και αιμοπεταλίων καθυστερημένης ψύξης μετά από αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου για 7 ημέρες. Τα αιμοπετάλια αυτά ήταν διαλυμένα σε προσθετικό διάλυμα (PAS). Τα αιμοπετάλια αυτά καθυστερημένης ψύξης παρουσίαζαν χειρότερα *in vitro* χαρακτηριστικά, εύρημα μάλλον λογικό αν αναλογιστούμε την επίδραση της μακράς διάρκειας αποθήκευσης στους 22°C (Μείωση γλυκόζης, μείωση pH, αύξηση γαλακτικού). Επιπλέον η δυναμική θρόμβου και απόκριση με συσσωμάτωση στη δράση αγωνιστών, όπως προκύπτει από μετρήσεις TEG και συσσωματομετρίας έδειξαν ότι αν και τα αιμοπετάλια καθυστερημένης ψύξης διατηρούν κάποια δραστικότητα είναι σαφώς κατώτερα από τα αιμοπετάλια που εξ αρχής διατηρήθηκαν σε ψύξη. Αυτά ακόμη και 14 μέρες μετά παρουσίαζαν επαρκή ικανότητα σχηματισμού θρόμβου. (Braathen, et al., 2019)



Εικόνα 56 Η συσσώρευση αιμοπεταλίων που μετράται με Multiplate (συσσωματομετρία πολλαπλών ηλεκτροδίων) και Chronolog (ελαφριά συσσωματομετρία) παρουσιάζεται για αποθήκευση χωρίς αναταράξεις στους 2 έως 6°C (CSP —), αποθήκευση σε ανάδευση στους 20 έως 24°C (θερμοκρασία δωματίου DCSP ...) και καθυστερημένη αποθήκευση σε μη αναταράξεις στους 2 έως 6°C από την Ημέρα 7 (DCSP---). Το σχήμα δείχνει (A) Πολλαπλή περιοχή δοκιμής ASPI κάτω από την καμπύλη (AUC) σε αυθαίρετες μονάδες (U), (B) AUC δοκιμής πολλαπλών πλακών σε αυθαίρετες μονάδες (U), (C) Chronolog AA μέγιστη συγκέντρωση μετρημένη σε ποσοστό (%) και (D) Μέγιστη συσσώρευση Chronolog TRAP-6 μετρημένη σε ποσοστό (%). Οι τιμές p αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στη διαφορά μεταξύ των ομάδων σε σχέση με τις βασικές μετρήσεις την Ημέρα 1 (γραμμικό μοντέλο μικτού αποτελέσματος, έκδοση R 3.5.0 με την έκδοση 3.1-137 του πακέτου NLME). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος (95% διάστημα εμπιστοσύνης). (Braathen, et al., 2019)

Κεφάλαιο 6

Συζήτηση συμπεράσματα

Η μετάγγιση αιμοπεταλίων είναι μια σημαντική και συχνά σωτήρια ιατρική πράξη. Εφαρμόστηκε ήδη από τη δεκαετία του 1950 σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία που εμφάνιζαν σοβαρή θρομβοπενία ή και αιμορραγία. (Freireich, 2000)

Έκτοτε η χρήση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων έχει αυξηθεί σημαντικά και οι μονάδες αιμοπεταλίων που συλλέχθηκαν ενδεικτικά έφταναν τα 2,5 εκατομμύρια στις Η.Π.Α. το 2015, ενώ μεταγγίστηκαν σχεδόν 2 εκατομμύρια από αυτές. (Ellingson, et al., 2017), ενώ στην Ευρώπη ο αριθμός είναι πολύ μεγαλύτερος.

Σήμερα η μετάγγιση αιμοπεταλίων έχει γίνει βασικό τμήμα της θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου, των αιματολογικών κακοηθειών, της μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και της ανεπάρκειας του μυελού των οστών.

Επιπλέον όμως αυτών τα τελευταία χρόνια η μετάγγιση αιμοπεταλίων βρήκε το ρόλο της και στην αντιμετώπιση της μαζικής αιμορραγίας είτε στο πλαίσιο σοβαρών τραυματισμών είτε μειζόνων χειρουργικών επεμβάσεων όπως οι καρδιοχειρουργικές με εξωσωματική κυκλοφορία ή οι μεταμοσχεύσεις. (Hallet, et al., 2013)

Διαπιστώνουμε εύκολα την μεγάλη διαφοροποίηση τόσο μεταξύ των ασθενών αυτών, που θα λάβουν προληπτική ή θεραπευτική μετάγγιση αιμοπεταλίων, όσο και των θεραπευτικών στόχων για την κάθε κατηγορία. Ενδεικτικά μπορούμε να φανταστούμε δύο διαφορετικούς ασθενείς. Ο ένας παρουσιάζει σοβαρή αιμορραγία από τραυματική εγκεφαλική κάκωση, ενώ ο άλλος σοβαρότατη θρομβοπενία μετά από μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Και οι δυο ασθενείς έχουν ανάγκη μετάγγισης αιμοπεταλίων. Όμως τα λειτουργικά χαρακτηριστικά που είναι επιθυμητά και αναγκαία σε κάθε περίπτωση είναι διαφορετικά. Παράγοντες όπως η επιβίωσή τους στην κυκλοφορία μετά τη μετάγγιση, η αιμοστατική αποτελεσματικότητα, η ανοσολογική συμπεριφορά κλπ. μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα της μετάγγισης και την τελική έκβαση του ασθενούς. (Shea, et al., 2019)

Σήμερα σχεδόν τα 2/3 των μεταγγίσεων των αιμοπεταλίων χρησιμοποιούνται προληπτικά για την αποφυγή αιμορραγίας σε θρομβοπενικούς ασθενείς ενώ το 1/3 θεραπευτικά για την αντιμετώπιση της ενεργού, σοβαρής αιμορραγίας. (Greeno, et al., 2007) (Cameron, et al., 2007)

Μια σειρά από παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τα χαρακτηριστικά των προς μετάγγιση αιμοπεταλίων και να παίξουν ρόλο στην αποτελεσματικότητα της μετάγγισης. Ο τρόπος συλλογής (αιμοπεταλιοφαίρεση, PRP, Buffy Coat), ο τύπος του διαλύματος αποθήκευσης (PAS, πλάσμα), οι μέθοδοι επεξεργασίας (λευκαφαίρεση, μείωση παθογόνων, ακτινοβόληση, θερμοκρασία αποθήκευσης), καθορίζουν ένα ιδιαίτερο προφίλ και σύνολο χαρακτηριστικών των αιμοπεταλίων αυτών. Επιπλέον με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης τα αιμοπετάλια αυτά υφίστανται διαφορετικές μεταβολές στα φυσικά βιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που γενικά αναφέρονται ως αποθηκευτική βλάβη. (Ng, et al., 2018)

Αυτές οι βιολογικές και λειτουργικές μεταβολές επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά τους ειδικά όταν η διακοπή της αιμορραγίας είναι το κύριο ζητούμενο. Ήδη από τη δεκαετία του 1970 είχε διαπιστωθεί ότι τα αιμοπετάλια θερμοκρασίας δωματίου είχαν μειωμένη αιμοστατική αποτελεσματικότητα. (Valeri, 1974) (Murphy & Gardner, 1976)

Ακόμη οι σημερινές συνθήκες φύλαξης των αιμοπεταλίων απαιτούν ειδικό εξοπλισμό καθώς απαιτείται η διαρκής, ήπια οριζόντια ανακίνησή τους. Αυτό γίνεται προκειμένου να διευκολυνθεί η ανταλλαγή αερίων και ο αερόβιος μεταβολισμός. Έτσι όμως αυξάνει το κόστος της αποθήκευσης ενώ οι συνθήκες αυτές δεν είναι πάντα διαθέσιμες, ειδικά σε μικρότερες νοσοκομειακές μονάδες ή απομακρυσμένες και εμπόλεμες περιοχές.

Οι λόγοι αυτοί έχουν ειδικά τα τελευταία χρόνια οδηγήσει στην επανεξέταση της εν ψυχρώ αποθήκευσης των αιμοπεταλίων, όπως και άλλων εναλλακτικών μεθόδων αποθήκευσης (καταψυγμένα, λυοφιλοποιημένα κλπ.).

Πριν την έναρξη κλινικών δοκιμών, οι νέες μέθοδοι για την αποθήκευση των αιμοπεταλίων υποβάλλονται σε μια σειρά δοκιμασιών και αξιολογήσεων συνδυάζοντας *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* μελέτες που περιλαμβάνουν και την χρήση ζωικών πειραματικών μοντέλων ή υγείων εθελοντών. Ο τρόπος όμως που αυτά τα ευρήματα μπορούν να συσχετιστούν μεταξύ τους δεν είναι πάντα προφανής. Συχνά τα αποτελέσματα είναι αλληλοσυγκρουόμενα και η εξαγωγή συμπερασμάτων καθίσταται δυσχερής.

Παρακάτω θα προσπαθήσουμε να ανασκοπήσουμε τις βασικές παραμέτρους που θα μπορούσαν να μας βοηθήσουν να αξιολογήσουμε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της εν ψυχρώ αποθήκευσης και να εκτιμήσουμε τον δυνητικό ρόλο της στην τράπεζα αίματος του μέλλοντος.

6.1 Η βακτηριακή ανάπτυξη και οι επιπτώσεις της.

Αρχικά τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται στη μορφή του Πλούσιου σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PRP) σε συνθήκες ψύξης. Η διαπίστωση όμως της μειωμένης ανάκτησης και επιβίωσης μετά από μετάγγιση οδήγησε σε αλλαγή αυτής της τακτικής. Έτσι έκτοτε τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (20°C -24°C) υπό συνεχή, ήπια, οριζόντια ανακίνηση. Μεταγγιζόμενα έτσι σε αιματολογικούς και ογκολογικούς ασθενείς εμφάνιζαν καλύτερη επιβίωση που επέτρεπε την μειωμένη ανάγκη για επανάληψη των μεταγγίσεων.

Στις συνθήκες όμως αυτές ευνοείται η πιθανή βακτηριακή ανάπτυξη και ο κίνδυνος σηπτικών επιπλοκών αυξάνει. Έτσι αναγκαστικά ο χρόνος αποθήκευσης πρέπει να περιοριστεί στο μικρότερο δυνατό και σήμερα δεν υπερβαίνει τις 5-7 ημέρες. (Brecher, et al., 2013)

Προϊόντα όμως με τόσο μικρό χρόνο διατήρησης δημιουργούν αυτονόητα προβλήματα διαθεσιμότητας και ενίοτε σπατάλης ληγμένων προϊόντων. Είναι εύκολα αντιληπτό ότι οι τράπεζες αίματος είναι αναγκασμένες να διαθέτουν επαρκές απόθεμα αιμοπεταλίων προς μετάγγιση για την κάλυψη των έκτακτων αναγκών. Έτσι όμως κάποια προϊόντα φθάνουν το όριο χρήσης τους χωρίς να έχουν χορηγηθεί. (Fuller, et al., 2011) Ενδεικτικά το 2013 υπολογίστηκε ότι οι μονάδες αιμοπεταλίων που έφτασαν το όριο χρήσης τους έφτασαν το 11%. Το κόστος μιας τέτοιας σπατάλης υπολογίζεται για ένα μεγάλο τριτοβάθμιο νοσοκομείο των Η.Π.Α. σε 1 εκατομμύριο δολάρια. (Leying , et al., 2017) Ταυτόχρονα οι ειδικές συνθήκες φύλαξης των αιμοπεταλίων δεν τα καθιστούν εύκολα διαθέσιμα σε απομακρυσμένες ή και εμπόλεμες περιοχές.

Τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα όμως αιμοπετάλια έχουν σαφές πλεονέκτημα σε ότι αφορά την βακτηριακή ανάπτυξη. Είναι γνωστό και από τα άλλα προϊόντα αίματος που φυλάσσονται στο ψυγείο ότι οι συνθήκες αυτές δεν ευνοούν τη βακτηριακή ανάπτυξη.

Έτσι μειώνεται σαφώς ο κίνδυνος σηπτικών επιπλοκών και αυξάνει η ασφάλεια της μετάγγισης. Ταυτόχρονα δεν είναι αναγκαία η εφαρμογή ειδικών μεθόδων ελέγχου παθογόνων, που στις ΗΠΑ είναι μάλιστα υποχρεωτική, και έτσι μετριάζεται και το κόστος ανά μονάδα μετάγγισης. (Ketter, et al., 2019)

6.2 Οικονομοτεχνικές παράμετροι της εν ψυχρώ αποθήκευσης.

Ο περιορισμός της πιθανότητας βακτηριακής ανάπτυξης μπορεί να επεκτείνει και το χρόνο διατήρησης από τις 5-7 ημέρες που είναι σήμερα σε 10, 15 ή και περισσότερες. (Reddoch-Cardenas, et al., 2018) Με τον τρόπο όμως αυτό αυξάνει κατακόρυφα η διαθεσιμότητα αιμοπεταλίων για μετάγγιση και μετριάζεται η έλλειψή τους. Ταυτόχρονα το κόστος διατήρησης μειώνεται ενώ τα αιμοπετάλια προς μετάγγιση μπορούν να είναι πλέον διαθέσιμα και σε μικρότερες περιφερειακές μονάδες.

Η εν ψυχρώ μάλιστα αποθήκευση των αιμοπεταλίων μπορεί να γίνεται και χωρίς ανακίνηση. Αυτό σημαίνει ότι δεν θα είναι πλέον απαραίτητος ο σχετικός εξοπλισμός και η διατήρηση των αιμοπεταλίων θα γίνεται σε υποδομές με τις οποίες οι τράπεζες αίματος είναι ήδη εξοικειωμένες και διαθέτουν ήδη για τη φύλαξη των συμπυκνωμένων ερυθρών.

Ακόμη γίνεται εφικτή η μεταφορά των προϊόντων αυτών ακόμη και σε μεγάλη κλίμακα σε απομακρυσμένες περιοχές. Έτσι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια μπορούν να είναι διαθέσιμα ακόμη και έξω από τις νοσοκομειακές υποδομές σε εμπόλεμες περιοχές ή σε καταστάσεις κρίσεων και καταστροφών. Έτσι βαριά τραυματισμένοι ασθενείς θα μπορούν να λάβουν έγκαιρα τις αναγκαίες μεταγγίσεις όλων των προϊόντων αίματος (ερυθρά, αιμοπετάλια, πλάσμα) ήδη από τις πρώτες ώρες του τραυματισμού με πιθανώς σωτήρια αποτελέσματα.

Η δυνατότητα αυτή της μεταφοράς των αιμοπεταλίων σε μεγάλες αποστάσεις θα μπορούσε να αποτελέσει και λύση για πιθανά προβλήματα διάθεσης προϊόντων σε περιοχές με αδυναμία συλλογής αίματος πχ εξαιτίας κάποιου νέου μεταδιδόμενου νοσήματος, όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου κλπ.

6.3 Η ανάκτηση και επιβίωση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει στην πρώιμη εποχή των μεταγγίσεων αιμοπεταλίων, αυτά φυλάσσονταν στη μορφή του Πλούσιου σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PRP) που διατηρούσαν στο ψυγείο για λίγες ώρες. Μελετώντας όμως τη συμπεριφορά των αιμοπεταλίων αυτών μετά τη μετάγγιση η τακτική αυτή άλλαξε. Διαπιστώθηκε ήδη από τότε με σειρά μελετών με ραδιοσημασμένα αιμοπετάλια ότι όταν αυτά αποθηκεύονταν σε συνθήκες ψύχους παρουσίαζαν μειωμένη ανάκτηση και επιβίωση. (Murphy & Gardner, 1969) (Valeri, 1974) (Becker, et al., 1973)

Η ανάκτηση και η επιβίωση των αιμοπεταλίων μετά από μετάγγιση είναι καθοριστικές παράμετροι για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της μετάγγισης. Η ανάκτηση μάς δίνει ένα μέτρο του αριθμού των αιμοπεταλίων που παραμένουν στην κυκλοφορία του ασθενούς μετά από τη μετάγγιση, ενώ η επιβίωση μας πληροφορεί για τον χρόνο που αυτά παραμένουν διαθέσιμα. Οι φαρμακοκινητικές αυτές παράμετροι φυσικά δεν εξασφαλίζουν και την αποτελεσματικότητα αυτών των αιμοπεταλίων, γεγονός που ήδη από τα πρώτα εκείνα χρόνια αμφισβητήθηκε. Η τυχαίοποιημένη μελέτη του Becker είχε δείξει ότι τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσίαζαν βελτιωμένη απόκριση συσσώρευσης και μειωμένους χρόνους αιμορραγίας τόσο σε ασθενείς με θρομβοπενία όσο και σε ασθενείς που λάμβαναν ασπιρίνη. (Becker, et al., 1973) Την περίοδο αυτή και για αρκετά χρόνια μετά οι μεταγγίσεις αιμοπεταλίων ήταν προφυλακτικές και αφορούσαν θρομβοπενικούς ασθενείς με οξεία λευχαιμία ή υπό μυελοτοξική χημειοθεραπεία και μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών οργάνων. Σε αυτούς προτεραιότητα ήταν η μειωμένη έκθεση σε πρόσθετες μεταγγίσεις προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης, αντιδράσεων μετάγγισης ή αλλοανοσοποίησης.

Η εκτίμηση των φαρμακοκινητικών αυτών παραμέτρων γίνεται κυρίως με τη χορήγηση ραδιοσημασμένων αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές. Φυσικά τέτοια πειράματα παρουσιάζουν εγγενείς δυσκολίες και περιορισμούς. Από την άλλη πλευρά η μελέτη *in vitro* χαρακτηριστικών των αιμοπεταλίων θα μπορούσε να δώσει μια έμμεση εκτίμηση για την ανάκτησή τους. Για παράδειγμα, μια κακή απόκριση υποτονικού σοκ (HSR) σχετίζεται με κακή ανάκτηση των μεταγγισμένων αιμοπεταλίων. (Valeri, et al., 1974) (Kim & Baldini, 1974) Ακόμη το χαμηλό pH ή η αύξηση του γαλακτικού οξέος σχετίζονται με μειωμένη ανάκτηση αιμοπεταλίων. (Cardigan, et al., 2005) (Picker, 2011) Επιπλέον η αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων από δισκοειδές σε σφαιρικό με ψευδοπόδια μπορεί να εκτιμηθεί

με μικροσκοπικές τεχνικές ή έμμεσα με το Swirling. Η αλλαγή αυτή σχετίζεται και με μειωμένο χρόνο κυκλοφορίας. (Holme, 1998)

Μιλήσαμε στα προηγούμενα κεφάλαια για την ανακάλυψη κάποιων μηχανισμών απομάκρυνσης αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία και την συσχέτισή τους με μεταβολές σε επιφανειακούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων. Κατά τη βραχυπρόθεσμη (<48 ώρες) εν ψυχρώ αποθήκευση οι GPIIb υποδοχείς συσσωρεύονται στην επιφάνεια και αναγνωριζόμενοι από τα μακροφάγα οδηγούν στην απομάκρυνση από την κυκλοφορία. Από την άλλη κατά τη μακροχρόνια (>48 ώρες) εν ψυχρώ αποθήκευση εκτίθενται τμήματα β-GlcNAc και οδηγούν στην απομάκρυνση των αιμοπεταλίων μέσω του υποδοχέα Ashwell-Morell. Μέσω αυτών και άλλων μηχανισμών τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια εμφανίζουν μειωμένη επιβίωση. (Picker, 2011)

Σε γενικές γραμμές οι έρευνες κατατείνουν σαφώς στο συμπέρασμα ότι η εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων σχετίζεται με μειωμένη ανάκτηση και επιβίωσή τους. Τελικό αποτέλεσμα είναι ο χρόνος ημιζωής των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων να είναι περίπου 1,3 ημέρες σε σύγκριση με τις 3,9 ημέρες των αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου (RT). (Murphy & Gardner, 1969) (Hoffmeister, et al., 2003) Μάλιστα η ανάκτηση συνεχίζει να μειώνεται και μετά τις πέντε ημέρες αποθήκευσης. Αποθηκευμένα αιμοπετάλια 20 ημερών στους 4°C είχαν το ήμισυ της ανάκτησης των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων 5 ημερών στους 4°C. (Stolla, et al., 2020) Τα ευρήματα αυτά δηλώνουν ότι ακόμη και για την αντιμετώπιση αιμορραγίας ο χρόνος αποθήκευσης των αιμοπεταλίων, επιδρώντας δραματικά στην ανάκτηση, είναι σημαντική παράμετρος και μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητά της. Παρόλα αυτά πρέπει να λάβουμε υπόψιν και τις ιδιαίτερες απαιτήσεις των μεταγγίσεων κατά την αντιμετώπιση της αιμορραγίας. Αιμοπετάλια με μικρό χρόνο επιβίωσης στην κυκλοφορία μπορεί και να είναι ευεργετικά καθώς αφενός μπορούν άμεσα να συμβάλλουν στη διακοπή της, ενώ ταυτόχρονα δεν θα παραμείνουν για πολύ χρόνο στην κυκλοφορία, με κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων θρομβωτικών επιπλοκών.

6.4 Η επίδραση του ψύχους στα χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων.

Προσεγγίσαμε προηγουμένως την επίδραση του ψύχους στις βασικές παραμέτρους της επιβίωσης και ανάκτησης των αιμοπεταλίων. Η μετάγγιση αιμοπεταλίων πραγματοποιείται σε θρομβοπενικούς ασθενείς προκειμένου να προληφθούν ή να αντιμετωπιστούν αιμορραγικά συμβάντα. Η αιμοστατική λειτουργία και αποτελεσματικότητα των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων λοιπόν είναι παράγοντας καθοριστικής σημασίας. Διαπιστώνεται όμως ότι η ανάκτηση και η αιμοστατική αποτελεσματικότητα δεν συμβαδίζουν μετά από μετάγγιση αιμοπεταλίων. (Becker, et al., 1973)

Η ίδια η αιμοστατική διαδικασία εμπλέκει πολλαπλούς μηχανισμούς και ο τρόπος που αυτή επηρεάζεται δεν είναι πάντοτε αυτονόητος ή προβλέψιμος. Η προσέγγιση αυτών των παραμέτρων γίνεται με μια σειρά από *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* μελέτες. Ο τρόπος όμως που συσχετίζονται οι *in vitro* μελέτες με τα *in vivo* αποτελέσματα ήταν πάντα σημείο συζήτησης στη μελέτη της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων. (Goodrich, et al., 2006) (Rinder & Smith, 2003)

Τα αιμοπετάλια που προορίζονται για μετάγγιση σήμερα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (20°C -24°C) υπό συνεχή ήπια ανακίνηση σε ασκούς που επιτρέπουν τη διάχυση αερίων και για διάστημα έως 5 ημέρες. Υπό τις συνθήκες αυτές τα αιμοπετάλια υφίστανται μια σειρά από δομικές, βιολογικές και λειτουργικές μεταβολές που γενικά αναφέρονται ως αποθηκευτική βλάβη. Σε αυτές κυρίαρχο ρόλο θεωρείται ότι παίζουν:

- Η ενισχυμένη γλυκόλυση και η μειωμένη λειτουργία των μιτοχονδρίων που οδηγούν σε μείωση της γλυκόζης, συσσώρευση γαλακτικού και αύξηση του pH.
- Η μειωμένη παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που μειώνει την ικανότητα των αιμοπεταλίων να εκτελούν ενεργειακά απαιτητικές διεργασίες, όπως η απόκριση στο υποτονικό στρες και η ενεργοποίηση/συσσωμάτωση.
- Οι μεταβολές που προκαλούνται στους υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων και η έκφραση δεικτών ενεργοποίησης.
- Η αποκοκκίωση.
- Τη συσσώρευση ανοσοδραστικών πρωτεϊνών όπως κυτοκίνες που προέρχονται από λευκοκύτταρα (παράγοντας νέκρωσης όγκου, ιντερλευκίνη (IL) 1α, IL-6, IL-8) και διαλυτό CD40 που μπορεί να συμμετάσχει σε οξεία πνευμονική βλάβη που σχετίζεται με τη μετάγγιση και μη αιμολυτικές αντιδράσεις μετάγγισης. Επιπλέον τα

μικροσωματίδια που παράγονται σχετίζονται με ενισχυμένη συσσώρευση αιμοπεταλίων και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. (Ng, et al., 2018)

Αντίστοιχα και τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μια σειρά από λειτουργικές, μορφολογικές και βιολογικές μεταβολές κατά την αποθήκευσή τους. Οι μεταβολές αυτές είναι σαφώς διακριτές από τις αντίστοιχες των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Με τον τρόπο αυτό τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια αποκτούν ένα ιδιαίτερο προφίλ χαρακτηριστικών που τα καθιστούν ελκυστικά για χρήση σε ασθενείς με αιμορραγία. Γενικά εμφανίζουν ένα προφίλ προενεργοποίησης που τα καθιστά αιμοστατικά αποτελεσματικότερα και κλινικά χρησιμότερα για την αντιμετώπιση ασθενών με σοβαρά τραύματα και μαζική αιμορραγία ή στο πλαίσιο σοβαρών χειρουργικών επεμβάσεων που απαιτούν μετάγγιση αίματος και αιμοπεταλίων.

Πιο συγκεκριμένα στα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια ο μεταβολισμός της γλυκόζης γενικά επιβραδύνεται. Στα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου, εντός των πρώτων 7 ημερών η γλυκόζη έχει σχεδόν εξολοκλήρου καταναλωθεί. Αντίθετα στους 4°C χρειάζονται περισσότερες από 20 ημέρες για το ίδιο αποτέλεσμα. (Stolla, et al., 2020) Άμεση συσχέτιση με αυτό παρουσιάζει και η παραγωγή και συσσώρευση γαλακτικού οξέος και η συνακόλουθη πτώση του pH που στα αιμοπετάλια θερμοκρασίας δωματίου είναι πολύ έντονη. (Braathen, et al., 2019) Οι παράμετροι όμως αυτοί επιδρούν και στη βιωσιμότητα και λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων που παραβλάπεται έντονα στα αιμοπετάλια θερμοκρασίας δωματίου μετά τις 7 ημέρες αποθήκευσης.

Επιπλέον η μιτοχονδριακή βλάβη στα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια δείχνει να είναι περιορισμένη. Παράγονται λιγότερες ενεργές ρίζες οξυγόνου, ενώ τα μιτοχόνδρια διατηρούν το δυναμικό και τη λειτουργικότητά τους. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η συνακόλουθη αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου σχετίζεται με την απώλεια λειτουργικότητας και τη μείωση της επιβίωσης των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αντίθετα τα εν ψυχρώ αιμοπετάλια διατηρούν τη μιτοχονδριακή λειτουργικότητά τους διαθέσιμη για την ενεργειακά απαιτητική απόκριση στην ενεργοποίηση και τη συμμετοχή στο σχηματισμό του θρόμβου (Bynum, et al., 2016) και έτσι διατηρούν βελτιωμένη απόκριση συσσωμάτωσης υπό διατμητική τάση και συστολή θρόμβου. (Reddoch, et al., 2014)

Επιπλέον η εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων δείχνει να προκαλεί μια έστω μερική ενεργοποίησή τους. Αυτή επιβεβαιώνεται με την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων τους και την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνειά τους. (Reddoch, et al., 2014) Επιπλέον καθοριστικό ρόλο στις διαδικασίες αυτές δείχνει να παίζει η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου κατά την εν ψυχρώ αποθήκευση. (Oliver, et al., 1999)

Τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια απελευθερώνουν περισσότερους προφλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως το sCD40L και το TxA₂ πιθανώς λόγω αποκοκκίωσης αιμοπεταλίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια μπορεί να είναι ασφαλέστερα για μετάγγιση. (Stubbs, et al., 2017)

6.5 In vitro αιμοστατική αποτελεσματικότητα.

Παρά τα σημαντικά βήματα που έχουν πραγματοποιηθεί στον τομέα της κατανόησης των μηχανισμών της αιμόστασης στους οποίους εμπλέκονται και τα αιμοπετάλια, πολλοί παράγοντες παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Πρόκειται για περίπλοκους συσχετισμούς και αλληλεπιδράσεις που οδηγούν τελικά στην διακοπή της αιμορραγίας και τη διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού δικτύου. Στο πλαίσιο αυτό τα αιμοπετάλια παίζουν καθοριστικό ρόλο μαζί με τους παράγοντες της πήξης. Λειτουργίες των αιμοπεταλίων όπως η προσκόλληση, η συσσώρευση, η διέγερση, η αποκοκκίωση, η ενεργοποίηση της πήξης, η συστολή, καθορίζουν τις μηχανικές και βιοφυσικές ιδιότητες των σχηματιζόμενων θρόμβων. Γίνεται όμως, εύκολα κατανοητό ότι η ικανότητά μας να αντιληφθούμε και να προσδιορίσουμε με μεθόδους in vitro αυτές τις περίπλοκες διαδικασίες παρουσιάζει περιορισμούς. Υπάρχουν όμως μέθοδοι που μπορούν να εκτιμήσουν, έστω αποσπασματικά, τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων, ειδικά σε ότι αφορά την αιμοστατική αποτελεσματικότητά τους.

Στην κατεύθυνση αυτή τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια επιδεικνύουν γενικά καλύτερες παραμέτρους σε ότι αφορά την ικανότητα προσκόλλησης και συσσώρευσης όπως αυτές μπορούν να εκτιμηθούν με μελέτες συσσωματομετρίας, αλλά και ικανότητα πρόσφυσης και συσσώρευσης υπό διατμητική τάση.

Οι ιξωδοελαστικές δοκιμές, όπως η περιστροφική θρομβοελαστομετρία (ROTEM) ή η θρομβοελαστογραφία (TEG), έχουν σε πολλαπλές μελέτες αποδείξει την αιμοστατική

ανωτερότητα των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Βέβαια τα αποτελέσματά τους πρέπει να αντιμετωπίζονται με σύνεση καθώς μπορεί να επηρεάζονται και από τις μεταβολές των επιφανειακών υποδοχέων όπως πχ η γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa. (Scorer, et al., 2020)

Επιπλέον τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν στο ψύχος δείχνουν να σχηματίζουν καλύτερης ποιότητας θρόμβους. Τα αποτελέσματα μελετών με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δείχνουν ότι οι θρόμβοι αυτοί εμφανίζουν μεγαλύτερη διασύνδεση και πυκνότητα ινών, αλλά και σταθερότητα. (Nair, et al., 2017)

6.6 In vivo αιμοστατική αποτελεσματικότητα.

Η αιμοστατική λειτουργία είναι μια περίπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολλοί παράγοντες με κυριότερους τα αιμοπετάλια και το μηχανισμό της πήξης. Η εκτίμηση της αιμοστατικής αποτελεσματικότητας με εργαστηριακές μεθόδους δεν είναι πάντα επαρκής.

Σε διάφορες μελέτες, ιδίως τη δεκαετία του 1970, έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της αιμοστατικής αποτελεσματικότητας των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος ροής και η δυνατότητα διόρθωσής του είτε σε θρομβοπενικούς ασθενείς είτε σε ασθενείς που έλαβαν αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία. Σε κάποιες από αυτές ο χρόνος ροής διορθώθηκε αποτελεσματικότερα από τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο. (Valeri, 1974) (Becker, et al., 1973) Ωστόσο σε άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές. (Filip & Aster, 1978) (Slichter & Harker, 1976)

6.7 Κλινικά ευρήματα αποτελεσματικότητας.

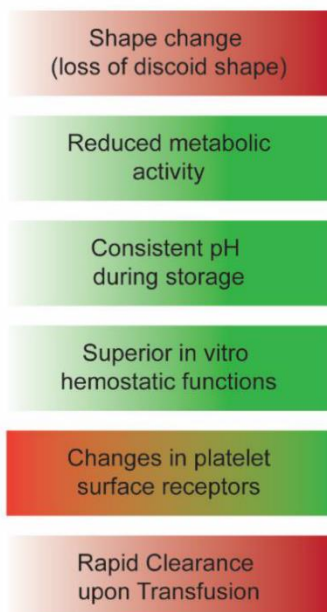
Τα κλινικά ευρήματα αποτελεσματικότητας της μετάγγισης εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων είναι σχετικά περιορισμένα. Μετά τη απόφαση του FDA που επιτρέπει τη χρήση εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων για την αντιμετώπιση της ενεργού αιμορραγίας αναμένεται τα σχετικά αποτελέσματα να είναι περισσότερα στο μέλλον. Παρόλα αυτά υπάρχουν έρευνες που ήδη αποδεικνύουν ότι τα αιμοπετάλια αυτά είναι εξαιρετικά

αποτελεσματικά για την αντιμετώπιση της αιμορραγίας σε ασθενείς που υφίστανται σύνθετες καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις με χρήση καρδιοπνευμονικής παράκαμψης. (Apelseth, et al., 2017/10/09) (Strandenes, et al., 2020)

6.8 Συμπεράσματα Προτάσεις.

Διαπιστώσαμε ότι η έρευνα για την αξία και τη χρήση των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων είναι συναρπαστική και πολύπλοκη. Θα μπορούσαμε να συνοψίσουμε ότι η εν ψυχρώ αποθήκευση των αιμοπεταλίων επάγει μια σειρά μεταβολών όπως οι μορφολογικές αλλοιώσεις, οι μεταβολικές τροποποιήσεις, η ενεργοποίηση διεργασιών που οδηγούν σε έκφραση επιφανειακών μορίων (πχ P-σελεκτίνη, GPIIb) κλπ. Εξαιτίας αυτής της προενεργοποίησης τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικά στην επίτευξη της αιμόστασης από τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αν και το κόστος είναι η μειωμένη επιβίωσή τους στην κυκλοφορία, τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια έδειξαν βελτιωμένη ικανότητα προσκόλλησης και συσσώρευσης σε πειράματα in vitro και καλύτερη αιμοστατική αποτελεσματικότητα σε in vivo μελέτες, μειώνοντας τον χρόνο ροής σε διάφορες καταστάσεις. (Zhao & Devine, 2022)

Effects of Cold Storage on Platelets



Currently Under Investigation



Εικόνα 57 Σύνοψη των γνωστών επιδράσεων της αποθήκευσης σε ψύξη στα αιμοπετάλια και πτυχές των αιμοπεταλίων που έχουν αποθηκευτεί σε ψυχρή κατάσταση που βρίσκεται επί του παρόντος υπό διερεύνηση. Οι επιβλαβείς επιδράσεις της ψυχρής αποθήκευσης σκιάζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ οι ευεργετικές επιδράσεις σκιάζονται με πράσινο. Το κουτί που σκιάζεται με κόκκινα και πράσινα χρώματα αντιπροσωπεύει αντικρουόμενες επιπτώσεις της αποθήκευσης σε ψύξη στους υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων. (Zhao & Devine, 2022)

Πολλά και σημαντικά στοιχεία συνηγορούν υπέρ της χρήσης τους ειδικά σε ασθενείς που αιμορραγούν. Ταυτόχρονα αποκαλύπτονται παράμετροι που θα μπορούσαν να ωθήσουν στην κατεύθυνση μιας πιο εξατομικευμένης προσέγγισης και στον τομέα της μετάγγισης αιμοπεταλίων. Επιπλέον θα μπορούσαν να διερευνηθούν παράγοντες, όπως οι συνθήκες φύλαξης ή τα κατάλληλα προσθετικά διαλύματα, που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στο βέλτιστο συνδυασμό επιβίωσης και αποτελεσματικότητας των αιμοπεταλίων αυτών.

Με τα δεδομένα που μέχρι σήμερα έχουν συγκεντρωθεί η επιστημονική κοινότητα θα μπορούσε να καταλήξει σε μια συναίνεση σε ότι αφορά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και δοκιμασίες που είναι χρήσιμα και καθοριστικά κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων κάθε ερευνητικής προσπάθειας. Έτσι θα αποφευχθεί η σύγχυση που συχνά μέχρι σήμερα επικρατεί κατά την προσπάθεια συγκριτικής μελέτης των ερευνητικών αποτελεσμάτων.

Εκτός όμως αυτών καθοριστικής σημασίας είναι και η πραγματοποίηση καλά οργανωμένων κλινικών δοκιμών για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της χρήσης αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε ψύχος ειδικά για την αντιμετώπιση της ενεργού αιμορραγίας. Οι μελέτες αυτές πιθανόν θα μπορούσαν να είναι και πολυκεντρικές, να έχουν χαρακτηριστικά διπλά τυφλών δοκιμών, και να συγκρίνουν τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια με αιμοπετάλια αποθηκευμένα με τις μέχρι σήμερα αποδεκτές συνθήκες. Ταυτόχρονα με αυτές θα πρέπει να εκτιμηθεί και ο χρόνος χρήσης μέχρι τον οποίο το νέο προϊόν θα είναι ασφαλές και αποτελεσματικό. (Krachey, et al., 2018) Με τον τρόπο αυτό η χρήση των εν ψυχρών αποθηκευμένων αιμοπεταλίων θα μπορούσε να αποκτήσει την απαραίτητη κανονιστική έγκριση από τους αρμόδιους οργανισμούς (πχ FDA).

Έτσι όταν επιτευχθεί ο βέλτιστος συμβιβασμός μεταξύ ανάκτησης, αιμοστατικής αποτελεσματικότητας και παράτασης του χρόνου αποθήκευσης, τα εν ψυχρών αποθηκευμένα αιμοπετάλια θα μπορούσαν να βρουν το δρόμο τους για τα ψυγεία των τραπεζών

αίματος, και την καθημερινή ασφαλή χρήση τους για την προάσπιση της ζωής και της υγείας των ασθενών.

Αναφορές

- Adams, G., Swenson, S., & Rock, G. (1986). Survival and Recovery of Human Platelets Stored for Five Days in a Non-Plasma Medium. *Blood*, 67(3), σσ. 672-675. doi:10.1182/blood.V67.3.672.672
- Agey, A., Reddoch-Cardenas, K., McIntosh, C., Sharma, U., Cantu, C., Cap, A., & Bynum, J. (2021). Effects of Intercept pathogen reduction treatment on extended cold storage of apheresis platelets. *Transfusion*, 61(1), σσ. 167-177. doi:10.1111/trf.16096
- Alhumaidan, H., & Sweeney, J. (2012). Current status of additive solutions for platelets. *Journal of Clinical Apheresis*, 27(2), σσ. 93-98. doi:10.1002/jca.21207
- Apelseth, T., Cap, A., Spinella, P., Hervig, T., & Strandenes, G. (2017). Cold stored platelets in treatment of bleeding. *ISBT Science Series*, 12(4), σσ. 488-495. doi:10.1111/voxs.12380
- Apelseth, T., Kristoffersen, E., Kvalheim, V., Bjerkvig, C., Fosse, T., Hervig, T., . . . Strandenes, G. (2017/10/09). Transfusion with Cold Stored Platelets in Patients Undergoing Complex Cardiothoracic Surgery with Cardiopulmonary Bypass Circulation: Effect on Bleeding and Thromboembolic Risk. Στο AABB (Επιμ.), 2017 *AABB Annual Meeting*. San Diego: AABB. Ανάκτηση από <https://aabb.confex.com/aabb/2017/meetingapp.cgi/Paper/2121>
- Aslan, J. (2017). Platelet Shape Change. Στο J. Aslan, *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update* (σσ. 321-336). Cham: Springer International Publishing. doi:DOI: 10.1007/978-3-319-47462-5_24
- Aslan, J., Itakura, A., Gertz, J., & McCarty, O. (2012). Platelet Shape Change and Spreading. Στο J. Gibbins, & M. Mahaut-Smith, *Platelets and Megakaryocytes: Volume 3, Additional Protocols and Perspectives*. New York, NY: Springer. doi:DOI: 10.1007/978-1-61779-307-3_7
- Becker, G., Tuccelli, M., Kunicki, T., Chalos, M., & Aster, R. (1973). Studies of Platelet Concentrates Stored at 22 C and 4 C. *Transfusion*, 13(2), σσ. 61-68. doi:10.1111/j.1537-2995.1973.tb05442.x
- Behnke, O. (1970). Effects of Some Chemicals on Blood Platelet Microtubules, Platelet Shape and Some Platelet Functions in vitro. *Scandinavian Journal of Haematology*, 7(2), σσ. 123-140. doi:10.1111/j.1600-0609.1970.tb01878.x
- Bertolini, F., & Murphy, S. (1994). A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. *Transfusion*, 34(9), σσ. 796-801. doi:10.1046/j.1537-2995.1994.34994378282.x

- Bertolini, F., Murphy, S., Rebullà, P., & Sirchia, G. (1992). Role of acetate during platelet storage in a synthetic medium. *Transfusion*, 32(2), σσ. 152-156. doi:10.1046/j.1537-2995.1992.32292180145.x
- Bertolini, F., Porretti, L., Lauri, E., Rebullà, P., & Sirchia, G. (1993). Role of Lactate in Platelet Storage Lesion. *Vox Sanguinis*, 65(3), σσ. 194-198. doi:10.1111/j.1423-0410.1993.tb02147.x
- Berzuini, A., Spreafico, M., & Prati, D. (n.d.). One size doesn't fit all: Should we reconsider the introduction of cold-stored platelets in blood bank inventories? *F1000Research*, 6. doi:10.12688/f1000research.10363.1
- Bochsen, L., Johansson, P., Kristensen, A., Dagaard, G., & Ostrowski, S. (2011). The influence of platelets, plasma and red blood cells on functional haemostatic assays. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 22(3), σσ. 167–175. doi:10.1097/MBC.0b013e3283424911
- Braathen, H., Sivertsen, J., Lunde, T., Kristoffersen, E., Assmus, J., Hervig, T., . . . Apseth, T. (2019). In vitro quality and platelet function of cold and delayed cold storage of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution for 21 days. *Transfusion*, 59(8), σσ. 2652-2661. doi:10.1111/trf.15356
- Brecher, M., Blajchman, M., Yomtovian, R., Ness, P., & AuBuchon, J. (2013). Addressing the risk of bacterial contamination of platelets within the United States: a history to help illuminate the future. *Transfusion*, 53(1), σσ. 221-231. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03708.x
- Brewer, D. (2006). Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *British Journal of Haematology*, 133(3), σσ. 251-258. Ανάκτηση από <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x>
- Burnier, L., Fontana, P., Kwak, B., & Angelillo-Scherrer, A. (2009). Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(3), σσ. 439-451. doi:10.1160/TH08-08-0521
- Bynum, J., Adam Meledeo, M., Getz, T., Rodriguez, A., Aden, J., Cap, A., & Pidcoke, H. (2016). Bioenergetic profiling of platelet mitochondria during storage: 4°C storage extends platelet mitochondrial function and viability. *Transfusion*, 56(s1), σσ. S76-S84. doi:10.1111/trf.13337
- Cameron, B., Rock, G., Olberg, B., & Neurath, D. (2007). Evaluation of platelet transfusion triggers in a tertiary-care hospital. *Transfusion*, 47(2), σσ. 206-211. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01090.x
- Cannon, J. (2018, 1). Hemorrhagic Shock. *New England Journal of Medicine*, 378(4), σσ. 370-379. doi:10.1056/NEJMra1705649

- Cap, A. (2017). Targeting Hemorrhage: Alternative Storage of Platelets for Hemostatic Transfusion. *Blood*, 130(Supplement 1), σσ. SCI-32.
doi:10.1182/blood.V130.Suppl_1.SCI-32.SCI-32
- Capocelli, K., & Dumont, L. (2014, November). Novel platelet storage conditions: additive solutions, gas, and cold. *Current Opinion in Hematology*, 21(6), σσ. 491–496.
doi:10.1097/MOH.0000000000000081
- Cardigan, R., Turner, C., & Harrison, P. (2005). Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sanguinis*, 88(3), σσ. 153-163.
doi:10.1111/j.1423-0410.2005.00618.x
- Cathy, O. (2017). *Weapons of Math Destruction: How Big Data Increases Inequality and Threatens Democracy*. Chicago: Crown Random House.
- Chen, Z., Mondal, N., Ding, J., Koenig, S., Slaughter, M., Griffith, B., & Wu, Z. (2015). Activation and shedding of platelet glycoprotein IIb/IIIa under non-physiological shear stress. *Molecular and cellular biochemistry*, 409(0), σσ. 93-101.
doi:10.1007/s11010-015-2515-y
- Cohn, S., Jimenez, J.-C., Khoury, L., Perez, J., & Panzo, M. (2019). Inability to Reverse Aspirin and Clopidogrel-induced Platelet Dysfunction with Platelet Infusion. *Cureus*, 11(1), σ. e3889. doi:10.7759/cureus.3889
- Committee, J. U. (n.d.). *Guidelines for the Blood Transfusion Services in the UK*. Ανάκτηση 07 13, 2021, από JPAC - Transfusion Guidelines:
<https://transfusionsguidelines.org.uk/>
- Currie, L., Harper, J., Allan, H., & Connor, J. (1997). Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4° C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion*, 37(1), σσ. 18-24. doi:10.1046/j.1537-2995.1997.37197176946.x
- D'Alessandro, A., Thomas, K., Stefanoni, D., Gamboni, F., Shea, S., Reisz, J., & Spinella, P. (2020). Metabolic phenotypes of standard and cold-stored platelets. *Transfusion*, 60(S3), σσ. S96-S106. doi:10.1111/trf.15651
- Delafleur-Weiss, E., & Mintz, P. (2000). The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfusion Medicine Reviews*, 14(2), σσ. 180-196. doi:10.1016/S0887-7963(00)80007-3
- Dhurat, R., & Sukesh, M. (2014). Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 7(4), σσ. 189-197. doi:10.4103/0974-2077.150734
- Duke, W. (1910). THE RELATION OF BLOOD PLATELETS TO HEMORRHAGIC DISEASE: DESCRIPTION OF A METHOD FOR DETERMINING THE BLEEDING TIME AND COAGULATION TIME AND REPORT OF THREE CASES OF HEMORRHAGIC DISEASE

- RELIEVED BY TRANSFUSION. *Journal of the American Medical Association*, 55(14), σσ. 1185-1192. doi:10.1001/jama.1910.04330140029009
- Dumont, L., AuBuchon, J., Gulliksson, H., Slichter, S., Elfath, M., Holme, S., . . . Murphy, S. (2006). In vitro pH effects on in vivo recovery and survival of platelets: an analysis by the BEST Collaborative. *Transfusion*, 46(8), σσ. 1300-1305. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00895.x
- EDQM, E. D. (2020). 20η Έκδοση του Οδηγού για την παρασκευή, τη χρήση και τη διασφάλιση της ποιότητας των συστατικών του αίματος. Εκδόσεις EDQM | EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines. Ανάκτηση από <https://www.edqm.eu/en/blood-guide>
- Ekaney, M., Grable, M., Powers, W., McKillop, I., & Evans, S. (2017, August). Cytochrome c and resveratrol preserve platelet function during cold storage. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 83(2), σσ. 271–277. doi:10.1097/TA.0000000000001547
- Ellingson, K., Sapiano, M., Haass, K., Savinkina, A., Baker, M., Chung, K.-W., . . . Basavaraju, S. (2017, 6). Continued decline in blood collection and transfusion in the United States–2015. *Transfusion*, 57(S2), σσ. 1588-1598. doi:10.1111/trf.14165
- Ellis, H. (2018). Karl Landsteiner: father of blood transfusion. *British Journal of Hospital Medicine*, 79(6), σσ. 348-348. Ανάκτηση από <https://www.magonlinelibrary.com/doi/abs/10.12968/hmed.2018.79.6.348>
- Ezuki, S., Kanno, T., Ohto, H., Herschel, L., Ito, T., Kawabata, K., . . . Nollet, K. (2008). Survival and recovery of apheresis platelets stored in a polyolefin container with high oxygen permeability. *Vox Sanguinis*, 94(4), σσ. 292-298. doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01042.x
- F.D.A. 121st Blood Products Advisory Committee Meeting, T. D. (2019). Considerations for Cold Stored Platelets Intended for Transfusion. Στο F.D.A. (Επιμ.). Silver Spring: F.D.A. Ανάκτηση 07 14, 2021, από <https://www.fda.gov/media/132379/download#:~:text=In%20the%20US%2C%20platelet%20components>
- Faraoni, D., & DiNardo, J. (2021). Viscoelastic hemostatic assays: Update on technology and clinical applications. *American Journal of Hematology*, 96(10), σσ. 1331-1337. doi:10.1002/ajh.26285
- FDA, U. (n.d.). *CFR-Code of Federal Regulations Title 21*. US Food and Drug Administration: Washington, DC, USA.
- Feinstein, M., & Fraser, C. (1975). Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. Inhibition by PGE1 and dibutyryl cyclic AMP. *Journal of General Physiology*, 66(5), σσ. 561-581. doi:10.1085/jgp.66.5.561
- Filip, D., & Aster, R. (1978). Relative hemostatic effectiveness of human platelets stored at 4° and 22°C. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 91(4), σσ. 618-624.

- Fitzpatrick, M. G. (2019). Novel platelet products under development for the treatment of thrombocytopenia or acute hemorrhage. *Transfusion and Apheresis Science*, 58(1), σσ. 7-11. doi:10.1016/j.transci.2018.12.010
- Freireich, E. (2000). Supportive care for patients with blood disorders. *British Journal of Haematology*, 111(1), σσ. 68-77. doi:10.1111/j.1365-2141.2000.02144.x
- Freireich, E. (2011). Origins of Platelet Transfusion Therapy. *Transfusion Medicine Reviews*, 25(3), σσ. 252-256. doi:10.1016/j.tmr.2011.01.003
- Frelinger, A. (2018). Using flow cytometry to monitor glycoprotein IIb-IIIa activation. *Platelets*, 29(7), σσ. 670-676. doi:10.1080/09537104.2018.1478073
- Fuller, A., Uglich, K., Braine, H., & King, K. (2011, 7). A comprehensive program to minimize platelet outdating. *Transfusion*, 51(7), σσ. 1469-1476. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.03039.x
- Ganter, M., & Hofer, C. (2008). Coagulation Monitoring: Current Techniques and Clinical Use of Viscoelastic Point-of-Care Coagulation Devices. *Anesthesia & Analgesia*, 106(5), σσ. 1366-1375. doi:10.1213/ane.0b013e318168b367
- Getz, T. (n.d.). Physiology of cold-stored platelets. *Transfusion and Apheresis Science*, 58(1), σσ. 12-15. doi:10.1016/j.transci.2018.12.011
- Getz, T., Montgomery, R., Bynum, J., Aden, J., Pidcoke, H., & Cap, A. (2016). Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*, 56(6), σσ. 1320-1328. doi:10.1111/trf.13511
- Ghoshal, K., & Bhattacharyya, M. (2014). Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal*. Ανάκτηση από <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/781857/>
- Giangrande, P. L. (2000). The history of blood transfusion. *British Journal of Haematology*, 110(4), σσ. 758-767. Ανάκτηση από <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2141.2000.02139.x>
- Goodrich, R., Li, J., Pieters, H., Crookes, R., Roodt, J., & Heyns, A. (2006). Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox Sanguinis*, 90(4), σσ. 279-285. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00761.x
- Görlinger, K., Shore-Lesserson, L., Dirkmann, D., Hanke, A., Rahe-Meyer, N., & Tanaka, K. (2013, May 1). Management of Hemorrhage in Cardiothoracic Surgery. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, σσ. S20-S34. doi:10.1053/j.jvca.2013.05.014
- Greeno, E., McCullough, J., & Weisdorf, D. (2007). Platelet utilization and the transfusion trigger: a prospective analysis. *Transfusion*, 47(2), σσ. 201-205. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01089.x

- Grindon, A. (2009). Chapter 2 - Brief History of Blood Transfusion. Στο *Transfusion Medicine and Hemostasis* (σσ. 9-11). San Diego: Academic Press. Ανάκτηση από <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744326000026>
- Guanglun, M. M., Yang, H., & Yan, W. (2017, October). Building resilience of students with disabilities in China: The role of inclusive education teachers. *Teacher and Teaching Education*, σσ. 125-134.
- Guinet, F., Carniel, E., & Leclercq, A. (2011, June 15). Transfusion-Transmitted Yersinia enterocolitica Sepsis. *Clinical Infectious Diseases*, σσ. 583-591. doi:10.1093/cid/cir452
- Gulliksson, H. (2000). Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfusion Medicine*, 10(4), σσ. 257-264. doi:10.1046/j.1365-3148.2000.00262.x
- Gutmann, C., Joshi, A., & Mayr, M. (2020). Platelet “-omics” in health and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 307, σσ. 87-96. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.022
- Gyulkhandanyan, A., Mutlu, A., Freedman, J., & Leytin, V. (2012). Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 33(4), σσ. 397-411. doi:10.1007/s11239-012-0688-8
- Hallet, J., Lauzier, F., Mailloux, O., Trottier, V., Archambault, P., Zarychanski, R., & Turgeon, A. (2013, 12). The Use of Higher Platelet: RBC Transfusion Ratio in the Acute Phase of Trauma Resuscitation: A Systematic Review*. *Critical Care Medicine*, 41(12), σσ. 2800–2811. doi:10.1097/CCM.0b013e31829a6ecb
- Handigund, M., Bae, T., Lee, J., & Cho, Y. (2016, October 1). Evaluation of in vitro storage characteristics of cold stored platelet concentrates with N acetylcysteine (NAC). *Transfusion and Apheresis Science*, 54(1), σσ. 127-138. doi:10.1016/j.transci.2016.01.006
- Handin, R., & Valeri, C. (1971). Hemostatic Effectiveness of Platelets Stored at 22°C. *New England Journal of Medicine*, 285(10), σσ. 538-543. doi:10.1056/NEJM197109022851003
- Hattori, T., Nishiyama, H., Ikegami, S., Minoshima, M., Kato, H., & Yuasa, N. (2020). Clinical evaluation of FAPlus/FNPlus bottles compared with the combination of SA/SN and FA/FN bottles in the BacT/Alert blood culture system. *The Journal of Medical Investigation*, 67(1,2). doi:10.2152/jmi.67.90
- Hegde, S., Wellendorf, A., Zheng, Y., & Cancelas, J. (2021). Antioxidant prevents clearance of hemostatically competent platelets after long-term cold storage. *Transfusion*, 61(2), σσ. 557-567. doi:10.1111/trf.16200
- Hoffmeister, K., & Falet, H. (2016). Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thrombosis Research*, 141, σσ. S68-S72. doi:10.1016/S0049-3848(16)30370-X

- Hoffmeister, K., Falet, H., Toker, A., Barkalow, K., Stossel, T., & Hartwig, J. (n.d.). Mechanisms of Cold-induced Platelet Actin Assembly*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), σσ. 24751-24759. doi:10.1074/jbc.M011642200
- Hoffmeister, K., Felbinger, T., Falet, H., Denis, C., & Bergmeier, W. (2003). The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell*, 112, σσ. 87-97.
- Hoffmeister, K., Josefsson, E., Isaac, N., Clausen, H., Hartwig, J., & Stossel, T. (2003). Glycosylation Restores Survival of Chilled Blood Platelets. *Science*, 301(5639), σσ. 1531-1534. doi:10.1126/science.1085322
- Holley, A., Marks, D., Johnson, L., Reade, M., Badloe, J., & Noorman, F. (2013). Frozen Blood Products: Clinically Effective and Potentially Ideal for Remote Australia. *Anaesthesia and Intensive Care*, 14(1), σσ. 10-19. doi:10.1177/0310057X1304100104
- Holme, S. (1998). Storage and Quality Assessment of Platelets. *Vox Sanguinis*, 74(S2), σσ. 207-216. doi:10.1111/j.1423-0410.1998.tb05422.x
- Holme, S., Heaton, A., & Momoda, G. (1989). Evaluation of a new, more oxygen-permeable, polyvinylchloride container. *Transfusion*, 29(2), σσ. 159-164. doi:10.1046/j.1537-2995.1989.29289146836.x
- Holme, S., Vaidja, K., & Murphy, S. (1978). Platelet storage at 22 degrees C: effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. *Blood*, 52(2), σσ. 425-435.
- Holtkamp, C. (2016). *Helmer scientific*. Ανάκτηση 03 16, 2022, από <https://blog.helmerinc.com/seven-day-platelet-storage>
- Hourfar, M., Jork, C., Schottstedt, V., Weber-Schehl, M., Brixner, V., Busch, M., . . . German Red Cross NAT Study. (2008). Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion*, 48(8), σσ. 1558-1566. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01718.x
- Humbrecht, C., Kientz, D., & Gachet, C. (2018). Platelet transfusion: Current challenges. *Transfusion Clinique et Biologique*, 25(3), σσ. 151-164. doi:10.1016/j.tracli.2018.06.004
- Inaba, K., Lustenberger, T., Rhee, P., Holcomb, Blackbourne, L., Shulman, I., . . . Demetriades, D. (2010). The Impact of Platelet Transfusion in Massively Transfused Trauma Patients. *Journal of the American College of Surgeons*, 211(5), σσ. 573-579. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2010.06.392
- Janetzko, K., Lin, L., Eichler, H., Mayaudon, V., Flament, J., & Klüter, H. (2004). Implementation of the INTERCEPT Blood System for Platelets into routine blood

- bank manufacturing procedures: evaluation of apheresis platelets. *Vox Sanguinis*, 86(4), σσ. 239-245. doi:10.1111/j.0042-9007.2004.00419.x
- Jiangcun, Y., Yin, W., Zhang, Y., Sun, Y., Ma, T., Gu, S., . . . Wang, W. (2018). Evaluation of the advantages of platelet concentrates stored at 4°C versus 22°C. *Transfusion*, 58(3), σσ. 736-747. doi:10.1111/trf.14462
- Johnson, L., Cameron, M., Waters, L., Padula, M., & Marks, D. (2019). The impact of refrigerated storage of UVC pathogen inactivated platelet concentrates on in vitro platelet quality parameters. *Vox Sanguinis*, 114(1), σσ. 47-56. doi:10.1111/vox.12730
- Johnson, L., Tan, S., Wood, B., Davis, A., & Marks, D. (2016). Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*, 56(7), σσ. 1807-1818. doi:10.1111/trf.13630
- Kaufman, R., Djulbegovic, B., Gernsheimer, T., Kleinman, S., & Tinmouth, A. (2015). Platelet Transfusion: A Clinical Practice Guideline From the AABB. *Annals of Internal Medicine*, 162(3), σσ. 205-213. doi:10.7326/M14-1589
- Kaushansky, K. (2008). Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, σσ. 981-986. doi:10.1182/blood-2007-05-088500
- Ketter, P., Kamucheka, R., Arulanandam, B., Akers, K., & Cap, A. (2019). Platelet enhancement of bacterial growth during room temperature storage: mitigation through refrigeration. *Transfusion*, 59(S2), σσ. 1479-1489. doi:10.1111/trf.15255
- Kim, B., & Baldini, M. (1974). The Platelet Response to Hypotonic Shock. Its Value as an Indicator of Platelet Viability After Storage. *Transfusion*, 14(2), σσ. 130-138. doi:10.1111/j.1537-2995.1974.tb04504.x
- Koerner, K. (1983). Platelet Function after Shipment of Room Temperature Platelet Concentrates. *Vox Sanguinis*, 44(1), σσ. 37-41. doi:10.1111/j.1423-0410.1983.tb04101.x
- Kofoed, K., Naesh, O., Hindberg, I., & Winther, K. (1991). Attenuated platelet aggregation in the presence of high concentrations of lactate. *Thrombosis Research*, 63(5), σσ. 549-552. doi:10.1016/0049-3848(91)90180-5
- Krachev, E., Viele, K., Spinella, P., Steiner, M., Zantek, N., & Lewis, R. (2018, June). The design of an adaptive clinical trial to evaluate the efficacy of platelets stored at low temperature in surgical patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 84(6S), σ. S41. doi:10.1097/TA.0000000000001876
- Krammer, T., Mayr, M., & Hackl, M. (2020). microRNAs as Promising Biomarkers of Platelet Activity in Antiplatelet Therapy Monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), σ. 3477. doi:10.3390/ijms21103477

- Krötz, F., Sohn, H.-Y., & Pohl, U. (2004). Reactive Oxygen Species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(11), σσ. 1988-1996.
doi:10.1161/01.ATV.0000145574.90840.7d
- Kunicki, T., Tuccelli, M., Becker, G., & Aster, R. (1975). A study of variables affecting the quality of platelets stored at "room temperature". *Transfusion*, 15(5).
doi:10.1046/j.1537-2995.1975.15576082215.x
- Learoyd, P. (2012). The history of blood transfusion prior to the 20th century—part 2. *Transfusion Medicine*, 22(6). Ανάκτηση από
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3148.2012.01189.x>
- Leeksa, C., & Cohen, J. (1956). DETERMINATION OF THE LIFE SPAN OF HUMAN BLOOD PLATELETS USING LABELLED DIISOPROPYLFLUOROPHOSPHONATE. *Journal of Clinical Investigation*, σσ. 964-969. Ανάκτηση από
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC441670/>
- Lelkens, C., Koning, J., de Kort, B., Floot, I., & Noorman, F. (2006). Experiences with frozen blood products in the Netherlands military. *Transfusion and Apheresis Science*, 34(3), σσ. 289-298. doi:10.1016/j.transci.2005.11.008
- Levin, R., Freireich, E., & Chappell, W. (1964). Effect of Storage up to 48 Hours on Response to Transfusions of Platelet Rich Plasma. *Transfusion*, 4(4), σσ. 251-256.
doi:10.1111/j.1537-2995.1964.tb02867.x
- Levy, J., Neal, M., & Herman, J. (2018, 10 27). Bacterial contamination of platelets for transfusion: strategies for prevention. *Critical Care*, 22(1), σ. 271.
doi:10.1186/s13054-018-2212-9
- Leying, G., Xiaoying, T., Saurabh, G., Allison J., Z., Gomathi, K., Scott, R., . . . Pham, T. (2017, October 9). *Big data modeling to predict platelet usage and minimize wastage in a tertiary care system*. Ανάκτηση 02 03, 2022, από PNAS:
<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1714097114>
- Leytin, V. (2012). Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Reviews*, 26(2), σσ. 51-63.
doi:10.1016/j.blre.2011.10.002
- M. Baker, & David J. Candy, Robert J. Hawker, Jennifer. (2001). Influences of pH on human platelet metabolism. *Platelets*, 12(6), σσ. 333-342.
doi:10.1080/09537100120078412
- Machlus, K., & Italiano, J. (2019). 2 - Megakaryocyte Development and Platelet Formation. Στο *Platelets (Fourth Edition)* (σσ. 25-46). Academic Press. doi:DOI: 10.1016/B978-0-12-813456-6.00002-3
- Mack, J., Miles, J., & Stolla, M. (2020). Cold-Stored Platelets: Review of Studies in Humans. *Transfusion Medicine Reviews*, 34(4), σσ. 221-226. doi:10.1016/j.tmr.2020.08.003
- Mack, J., Miles, J., & Stolla, M. (2020). Cold-Stored Platelets: Review of Studies in Humans. *Transfusion Medicine Reviews*, 34(4), σσ. 221-226. doi:10.1016/j.tmr.2020.08.003

- Manno, C., Hedberg, K., Kim, H., Bunin, G., Nicolson, S., Jobes, D., . . . Norwood, W. (1991). Comparison of the Hemostatic Effects of Fresh Whole Blood, Stored Whole Blood, and Components After Open Heart Surgery in Children. *Blood*, *77*(5), σσ. 930-936. doi:10.1182/blood.V77.5.930.930
- Marini, I., Aurich, K., Jouni, R., Nowak-Harnau, S., Hartwich, O., Greinacher, A., . . . Bakchoul, T. (2019). Cold storage of platelets in additive solution: the impact of residual plasma in apheresis platelet concentrates. *Haematologica*, *104*(1), σσ. 207-214. doi:10.3324/haematol.2018.195057
- Marini, I., Rigoni, F., Zlamal, J., Pelzl, L., Althaus, K., Nowak-Harnau, S., . . . Bakchoul, T. (2020). Blood donor-derived buffy coat to produce platelets in vitro. *Vox Sanguinis*, *115*(1), σσ. 94-102. doi:10.1111/vox.12863
- Mason, K., Carpinelli, M., Fletcher, J., Collinge, J., & Hilton, A. (2007). Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span. *Cell*, *128*(6), σσ. 1173-1186. doi:10.1016/j.cell.2007.01.037
- Massini, P., & Lüscher, E. (1974). Some effects of ionophores for divalent cations on blood platelets Comparison with the effects of thrombin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *372*(1), σσ. 109-121. doi:10.1016/0304-4165(74)90077-4
- Mathai, J., Resmi, K., Sulochana, P., Sathyabhama, S., Baby saritha, G., & Krishnan, L. (2006). Suitability of measurement of swirling as a marker of platelet shape change in concentrates stored for transfusion. *Platelets*, *17*(6), σσ. 393-396. doi:10.1080/09537100600757695
- McArthur, K., Chappaz, S., & Kile, B. (2018). Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood*, *131*(6), σσ. 605-610. doi:10.1182/blood-2017-11-742684
- McFadyen, J., & Kaplan, Z. (2015). Platelets Are Not Just for Clots. *Transfusion Medicine Reviews*, *29*(2), σσ. 110-119. doi:10.1016/j.tmr.2014.11.006
- McGill, M. (1978). Temperature cycling preserves platelet shape and enhances in vitro test scores during storage at 4 °. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *92*(6), σσ. 971-982. doi:10.5555/uri:pii:0022214378900343
- Merten, M., & Thiagarajan, P. (2000). P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation*, *102*(16), σσ. 1931-1936. doi:10.1161/01.CIR.102.16.1931
- Miles, J., Bailey, S., Fang, L., Osborne, B., Corson, J., Mack, J., & Stolla, M. (2019). Evaluation of Efficacy and Safety of Cold-Stored Platelets in Healthy Human Subjects Treated with Dual Antiplatelet Therapy. *Blood*, *134*, σ. 718. doi:10.1182/blood-2019-124122

- Milford, E., & Reade, M. (2016). Comprehensive review of platelet storage methods for use in the treatment of active hemorrhage. *Transfusion*, *56*(S2), σσ. S140-S148. doi:10.1111/trf.13504
- Mohammadi, T., Pietersz, R., Vandenbroucke-Grauls, C., Savelkoul, P., & Reesink, H. (2005). Detection of bacteria in platelet concentrates: comparison of broad-range real-time 16S rDNA polymerase chain reaction and automated culturing. *Transfusion*, *45*(5), σσ. 731-736. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04258.x
- Montgomery, R., Reddoch, K., Evani, S., Cap, A., & Ramasubramanian, A. (2013). Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion*, *53*(7), σσ. 1520-1530. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03917.x
- Morrissey, J. (2018, August 2). *The New York Times*. Ανάκτηση από How to Write a Good College Application Essay: <https://www.nytimes.com/2018/08/02/education/learning/writing-college-application-essay.html?rref=collection%2Fsectioncollection%2Feducation&action=click&contentCollection=education®ion=rank&module=package&version=highlights&contentPlacement=2&pgtype=s>
- Mukai, N., Nakayama, Y., Ishi, S., Murakami, T., Ogawa, S., Kageyama, K., . . . Nakajima, Y. (2019). Cold storage conditions modify microRNA expressions for platelet transfusion. *PLOS ONE*, *14*(7), σ. e0218797. doi:10.1371/journal.pone.0218797
- Murphy, S., & Gardner, F. (1969). Platelet Preservation — Platelet Preservation-Effect of Storage Temperature on Maintenance of Platelet Viability —Deleterious Effect of Refrigerated Storage. *New England Journal of Medicine*, *280*(20), σσ. 1094-1098. doi:10.1056/NEJM196905152802004
- Murphy, S., & Gardner, F. (1975). Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, *46*(2), σσ. 209-218.
- Murphy, S., & Gardner, F. (1976). Room Temperature Storage of Platelets. *Transfusion*, *16*(1), σσ. 2-3. doi:10.1046/j.1537-2995.1976.16176130831.x
- Nair, P., Meledeo, M., Wells, A., Wu, X., Bynum, J., Leung, K., . . . Cap, A. (2021). Cold-stored platelets have better preserved contractile function in comparison with room temperature-stored platelets over 21 days. *Transfusion*, *61*(S1), σσ. S68-S79. doi:10.1111/trf.16530
- Nair, P., Pandya, S., Dallo, S., Reddoch, K., Montgomery, R., Pidcoke, H., . . . Ramasubramanian, A. (2017). Platelets stored at 4°C contribute to superior clot properties compared to current standard-of-care through fibrin-crosslinking. *British Journal of Haematology*, *178*(1), σσ. 119-129. doi:10.1111/bjh.14751
- Nemkov, T., Hansen, K., Dumont, L., & D'Alessandro, A. (2016). Metabolomics in transfusion medicine. *Transfusion*, *56*(4), σσ. 980-993. doi:10.1111/trf.13442

- Ng, M., Tung, J.-P., & Fraser, J. (2018, April 1). Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? *Transfusion Medicine Reviews*, 32(3), σσ. 144-154.
doi:10.1016/j.tmr.2018.04.001
- Nomura, S., Ozaki, Y., & Ikeda, Y. (2009). Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thrombosis Research*, 123(1), σσ. 8-23.
doi:10.1016/j.thromres.2008.06.006
- Oliver, A., Tablin, F., Walker, N., & Crowe, J. (1999). The internal calcium concentration of human platelets increases during chilling. *1416(1)*, σσ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. doi:10.1016/S0005-2736(98)00239-9
- Paglia, G., Sigurjónsson, Ó., Rolfsson, Ó., Valgeirsdóttir, S., Hansen, M., Brynjólfsson, S., . . . Palsson, B. (2014). Comprehensive metabolomic study of platelets reveals the expression of discrete metabolic phenotypes during storage. *Transfusion*, 54(11), σσ. 2911-2923. doi:10.1111/trf.12710
- Palavecino, E., Yomtovian, R., & Jacobs, M. (2010). Bacterial contamination of platelets. *Transfusion and Apheresis Science*, 42(1), σσ. 71-82.
doi:10.1016/j.transci.2009.10.009
- Perkins, J., Andrew, C., Spinella, P., Blackbourne, L., Grathwohl, K., Repine, T., . . . Holcomb, J. (2009). An Evaluation of the Impact of Apheresis Platelets Used in the Setting of Massively Transfused Trauma Patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 66(4), σ. S77. doi:10.1097/TA.0b013e31819d8936
- Perrotta, P., Parsons, J., Rinder, H., & Snyder, E. (2013). *Chapter 62 - Platelet Transfusion Medicine*. Academic Press. Ανάκτηση από
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123878373000626>
- Picker, S. (2011, March 1). In-vitro assessment of platelet function. *Transfusion and Apheresis Science*, 44(3), σσ. 305-319. doi:10.1016/j.transci.2011.03.006
- Pidcoke, H., Aden, J., Mora, A., Borgman, M., Spinella, P., Dubick, M., . . . Cap, A. (2012). Ten-year analysis of transfusion in Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom: Increased plasma and platelet use correlates with improved survival. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 73(6), σ. S445.
doi:10.1097/TA.0b013e3182754796
- Pidcoke, H., Aden, J., Mora, A., Borgman, M., Spinella, P., Dubick, M., . . . Cap, A. (2012, December). Ten-year analysis of transfusion in Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom: Increased plasma and platelet use correlates with improved survival. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 73(6), σ. S445.
doi:10.1097/TA.0b013e3182754796
- Pidcoke, H., Spinella, P., Ramasubramanian, A., Strandenes, G., Hervig, T., Ness, P., & Cap, A. (2014). Refrigerated Platelets for the Treatment of Acute Bleeding: A Review of the Literature and Reexamination of Current Standards. *Shock*, 41, σσ. 51–53.
doi:10.1097/SHK.0000000000000078

- Pienimaeki-Roemer, A., Kuhlmann, K., Böttcher, A., Konovalova, T., Black, A., Orsó, E., . . . Schmitz, G. (2015). Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion*, *55*(3), σσ. 507-521. doi:10.1111/trf.12874
- Quach, M., Chen, W., & Li, R. (2018). Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood*, *131*(14), σσ. 1512-1521. doi:10.1182/blood-2017-08-743229
- Reddoch, R., Pidcoke, H., Montgomery, R., Fedyk, C., Aden, J., Ramasubramanian, A., & Cap, A. (2014). Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4 °C and 22 °C. *Shock (Augusta, Ga.)*, *41*(1), σσ. 54-61. doi:10.1097/SHK.0000000000000082
- Reddoch-Cardenas, K., Montgomery, R., Lafleur, C., Peltier, G., Bynum, J., & Cap, A. (2018). Cold storage of platelets in platelet additive solution: an in vitro comparison of two Food and Drug Administration–approved collection and storage systems. *Transfusion*, *58*(7), σσ. 1682-1688. doi:10.1111/trf.14603
- Reddoch-Cardenas, K., Sharma, U., Salgado, C., Montgomery, R., Cantu, C., Cingoz, N., . . . Cap, A. (2019). An in vitro pilot study of apheresis platelets collected on Trima Accel system and stored in T-PAS+ solution at refrigeration temperature (1-6°C). *Transfusion*, *59*(5). doi:10.1111/trf.15150
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2007). Giulio Bizzozzero and the discovery of platelets. *Leukemia Research*, *31*(10), σσ. 1339-1341. Ανάκτηση από <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145212607000793>
- Rinder, H., & Smith, B. (2003). In vitro evaluation of stored platelets: Is there hope for predicting posttransfusion platelet survival and function? *Transfusion*, *43*(1), σσ. 2-6. doi:10.1046/j.1537-2995.2003.00261.x
- Romlin, B., Söderlund, F., Wåhlander, H., Nilsson, B., Baghaei, F., Jeppsson, A., & Thompson, J. (2014, August 1). Platelet count and function in paediatric cardiac surgery: a prospective observational study. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, *113*(5), σσ. 847-854. doi:10.1093/bja/aeu194
- Rumjantseva, V., & Hoffmeister, K. (2010). Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets. *Transfusion and Apheresis Science*, *42*(1), σσ. 63-70. doi:10.1016/j.transci.2009.10.008
- Rumjantseva, V., Grewal, P., Wandall, H., Josefsson, E., Sørensen, A., Larson, G., . . . Hoffmeister, K. (2009). Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets. *Nature Medicine*, *15*(11), σσ. 1273-1280. doi:10.1038/nm.2030
- Sandgren, P., Shanwell, A., & Gulliksson, H. (2006). Storage of buffy coat–derived platelets in additive solutions: in vitro effects of storage at 4°C. *Transfusion*, *46*(5), σσ. 828-834. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00803.x

- Sandgren, P., Shanwell, A., & Gulliksson, H. (2006). Storage of buffy coat–derived platelets in additive solutions: in vitro effects of storage at 4°C. *Transfusion*, *46*(5), σσ. 828-834. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00803.x
- Schiffer, C., Aisner, J., & Wiernik, P. (1976). Clinical Experience with Transfusion of Cryopreserved Platelets. *British Journal of Haematology*, *34*(3), σσ. 377-385. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03584.x
- Schrezenmeier, H., Walther-Wenke, G., Müller, T., Weinauer, F., Younis, A., Holland-Letz, T., . . . Seifried, E. (2007). Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospective multicenter study comparing pooled whole blood–derived platelets and apheresis platelets. *Transfusion*, *47*(4), σσ. 644-652. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01166.x
- Scorer, T., FitzGibbon, L., Aungraheeta, R., Sharma, U., Peltier, G., McIntosh, C., . . . Mumford, A. (2020). TEG PlateletMapping assay results may be misleading in the presence of cold stored platelets. *Transfusion*, *60*(S3), σσ. S119-S123. doi:10.1111/trf.15753
- Scorer, T., Williams, A., Reddoch-Cardenas, K., & Mumford, A. (2019). Manufacturing variables and hemostatic function of cold-stored platelets: a systematic review of the literature. *Transfusion*, *59*(8), σσ. 2722-2732. doi:10.1111/trf.15396
- Seltsam, A. (2017). Pathogen Inactivation of Cellular Blood Products—An Additional Safety Layer in Transfusion Medicine. *Frontiers in Medicine*, *4*. Ανάκτηση από <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00219>
- Semple, J., Italiano, J., & Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology*, *11*(4), σσ. 264-274. doi:10.1038/nri2956
- Shams Hakimi, C., Hesse, C., Wallén, H., Boulund, F., Grahn, A., & Jeppsson, A. (2015, October 17). In vitro assessment of platelet concentrates with multiple electrode aggregometry. *Platelets*, *26*(2), σσ. 132-137. doi:10.3109/09537104.2014.898141
- Shea, S., Thomas, K., & Spinella, P. (2019). The effect of platelet storage temperature on haemostatic, immune, and endothelial function: potential for personalised medicine. *Blood Transfusion*, *17*(4), σσ. 321-330. doi:10.2450/2019.0095-19
- Shevchuk, O., Begonja, A., Gambaryan, S., Totzeck, M., Rassaf, T., Huber, T., . . . Sickmann, A. (2021). Proteomics: A Tool to Study Platelet Function. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), σ. 4776. doi:10.3390/ijms22094776
- Silva, V., & Miller, W. (1977). Platelet transfusion survey in a regional blood program. *Transfusion*, *17*(3), σσ. 255-260. doi:10.1046/j.1537-2995.1977.17377196361.x
- Simon, T. (1994). The Collection of Platelets by Apheresis Procedures. *Transfusion Medicine Reviews*, *8*(2), σσ. 132-145. doi:10.1016/S0887-7963(94)70105-X
- Six, K., Compennolle, V., & Feys, H. (2020, 6 30). When platelets are left in the cold. *Annals of Blood*, *5*(0). doi:10.21037/aob.2020.03.04

- Skripchenko, A., Gelderman, M., Awatefe, H., Turgeon, A., Thompson-Montgomery, D., Cheng, C., . . . Wagner, S. (2016). Automated cold temperature cycling improves in vitro platelet properties and in vivo recovery in a mouse model compared to continuous cold storage. *Transfusion*, *56*(1), σσ. 24-32. doi:10.1111/trf.13273
- Slichter, S., & Harker, L. (1976). Preparation and Storage of Platelet Concentrates: II. STORAGE VARIABLES INFLUENCING PLATELET VIABILITY AND FUNCTION. *British Journal of Haematology*, *34*(3), σσ. 403-419. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03587.x
- Slichter, S., Kaufman, R., Assmann, S., McCullough, J., & Triulzi, D. (2010). Dose of Prophylactic Platelet Transfusions and Prevention of Hemorrhage. *New England Journal of Medicine*, *362*(7). doi:10.1056/NEJMoa0904084
- Spinella, P., Dunne, J., Beilman, G., O'Connell, R., Borgman, M., Cap, A., & Rentas, F. (2012). Constant challenges and evolution of US military transfusion medicine and blood operations in combat. *Transfusion*, *52*(5), σσ. 1146-1153. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03594.x
- Stolla, M., Bailey, S., Fang, L., Fitzpatrick, L., Gettinger, I., Pellham, E., & Christoffel, T. (2020). Effects of storage time prolongation on in vivo and in vitro characteristics of 4°C–stored platelets. *Transfusion*, *60*(3), σσ. 613-621. doi:10.1111/trf.15669
- Stolla, M., Fitzpatrick, L., Gettinger, I., Bailey, S., Pellham, E., Christoffel, T., & Slichter, S. (2018). In vivo viability of extended 4°C-stored autologous apheresis platelets. *Transfusion*, *58*(10), σσ. 2407-2413. doi:10.1111/trf.14833
- Storch, E., Custer, B., Jacobs, M., Menitove, J., & Mintz, P. (2019). Review of current transfusion therapy and blood banking practices¹¹This article reflects the views of the author and should not be construed to represent FDA's views or policies. *Blood Reviews*, *38*. doi:10.1016/j.blre.2019.100593
- Strandenes, G., Sivertsen, J., Bjerkvig, C., Fosse, T., Cap, A., del Junco, D., . . . Apelseth, T. (2020, 12 1). A Pilot Trial of Platelets Stored Cold versus at Room Temperature for Complex Cardiothoracic Surgery. *Anesthesiology*, *133*(6), σσ. 1173-1183. doi:10.1097/ALN.0000000000003550
- Stroncek, D., & Rebullá, P. (2007). Platelet transfusions. *The Lancet*, *370*(9585), σσ. 427-438. doi:10.1016/S0140-6736(07)61198-2
- Stubbs, J., Tran, S., Emery, R., Hammel, S., Haugen, D., Zielinski, M., . . . Jenkins, D. (2017). Cold platelets for trauma-associated bleeding: regulatory approval, accreditation approval, and practice implementation—just the “tip of the iceberg”. *Transfusion*, *57*(12), σσ. 2836-2844. doi:10.1111/trf.14303
- Tiberghien, P., Folléa, G., & Muller, J.-Y. (2016). *Platelet Transfusions in Acute Leukemia*. Ανάκτηση από <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1515066>

- Turner, V., Hawker, R., Mitchell, S., & Mead, A. (1994). Paired in vivo and in vitro comparison of apheresis and "recovered" platelet concentrates stored for 5 days. *Journal of Clinical Apheresis*, *9*(3), σσ. 189-194. doi:10.1002/jca.2920090309
- Valeri, C. (1974). Hemostatic Effectiveness of Liquid-Preserved and Previously Frozen Human Platelets. *New England Journal of Medicine*, *290*(7), σσ. 353-358. doi:10.1056/NEJM197402142900702
- Valeri, C. (1976). Circulation and Hemostatic Effectiveness of Platelets Stored at 4 C or 22 C: Studies in Aspirin-Treated Normal Volunteers. *Transfusion*, *16*(1), σσ. 20-23. doi:10.1046/j.1537-2995.1976.16176130832.x
- Valeri, C., Feingold, H., & Marchionni, L. (1974). The Relation Between Response to Hypotonic Stress and the 51Cr Recovery In Vivo of Preserved Platelets. *Transfusion*, *14*(4), σσ. 331-337. doi:10.1111/j.1537-2995.1974.tb04541.x
- van der Meijden, P., & Heemskerk, J. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, *16*(3), σσ. 166-179. doi:10.1038/s41569-018-0110-0
- Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R., Weyrich, A., & Zimmerman, G. (2012). Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Seminars in immunopathology*, *34*(1), σσ. 5-30. doi:10.1007/s00281-011-0286-4
- Vit, G., Klüter, H., & Wuchter, P. (2020). Platelet storage and functional integrity. *Journal of Laboratory Medicine*, *44*(5), σσ. 285-293. doi:10.1515/labmed-2020-0067
- Vostal, J., Gelderman, M., Skripchenko, A., Xu, F., Li, Y., Ryan, J., . . . Wagner, S. (2018). Temperature cycling during platelet cold storage improves in vivo recovery and survival in healthy volunteers. *Transfusion*, *58*(1), σσ. 25-33. doi:10.1111/trf.14392
- Wandall, H., Hoffmeister, K., Sørensen, A., Rumjantseva, V., Clausen, H., Hartwig, J., & Slichter, S. (2008). Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4°C-stored platelets. *Blood*, *111*(6), σσ. 3249-3256. doi:10.1182/blood-2007-06-097295
- Wang, S., Jiang, T., Fan, Y., & Zhao, S. (2019). A proteomic approach reveals the variation in human platelet protein composition after storage at different temperatures. *Platelets*, *30*(3), σσ. 403-412. doi:10.1080/09537104.2018.1453060
- White, J. (n.d.). Influence of taxol on the response platelets to chilling. *American Journal of Pathology*, *108*(2), σσ. 184-195.
- White, J., & Krivit, W. (1967). An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. *Blood*, *30*(5), σσ. 625-635. doi:10.1182/blood.v30.5.625.625
- White, J., & Krumwiede, M. (1973). Influence of Cytochalasin B on the Shape Change Induced in Platelets by Cold. *Blood*, *41*(6), σσ. 823-832. doi:10.1182/blood.V41.6.823.823

- White, J., Rao, G., & Gerrard, J. (1974). Effects of the Ionophore A23187 on Blood Platelets. *The American Journal of Pathology*, 77(2), σσ. 135-150. Ανάκτηση από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1910910/>
- White, N., Ward, K., Pati, S., Strandenes, G., & Cap, A. (2017, 6). Hemorrhagic blood failure: Oxygen debt, coagulopathy and endothelial damage. *The journal of trauma and acute care surgery*, 82(6), σσ. S41-S49. doi:10.1097/TA.0000000000001436
- Winokur, R., & Hartwig, J. (1995). Mechanism of shape change in chilled human platelets. *Blood*, 85(7), σσ. 1796-1804. doi:10.1182/blood.V85.7.1796.bloodjournal8571796
- Wood, B., Johnson, L., Hyland, R., & Marks, D. (2018). Maximising platelet availability by delaying cold storage. *Vox Sanguinis*, 113(5), σσ. 403-411. doi:10.1111/vox.12649
- World Health Organization. (2012). *Blood donor selection - Guidelines on Assessing Donor Suitability for Blood Donation*. WORLD HEALTH ORGANIZATION.
- Wu, X., Darlington, D., Montgomery, R., Liu, B., & Keese, J. (2017). Platelets derived from fresh and cold-stored whole blood participate in clot formation in rats with acute traumatic coagulopathy. *British Journal of Haematology*, 179(5), σσ. 802-810. doi:10.1111/bjh.14999
- Xiang, B., Zhang, G., Zhang, Y., Wu, C., Joshi, S., Morris, A., . . . Li, Z. (2021). Calcium Ion Chelation Preserves Platelet Function During Cold Storage. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(1), σσ. 234-249. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314879
- Xu, F., Gelderman, M., Farrell, J., & Vostal, J. (2013). Temperature cycling improves in vivo recovery of cold-stored human platelets in a mouse model of transfusion. *Transfusion*, 53(6), σσ. 1178-1186. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03896.x
- Zhao, H., & Devine, D. (2022). The Missing Pieces to the Cold-Stored Platelet Puzzle. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), σ. 1100. doi:10.3390/ijms23031100
- Zhao, H., Serrano, K., Stefanoni, D., D'Alessandro, A., & Devine, D. (2021). In Vitro Characterization and Metabolomic Analysis of Cold-Stored Platelets. *Journal of Proteome Research*, 20(5), σσ. 2251-2265. doi:10.1021/acs.jproteome.0c00792
- Zharikov, S., & Shiva, S. (2013). Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), σσ. 118-123. doi:10.1042/BST20120327
- Zucker, M., & Borrelli, J. (1954). Reversible Alterations in Platelet Morphology Produced by Anticoagulants and by Cold. *Blood*, 9(3), σσ. 602-608. doi:10.1182/blood.V9.6.602.602
- Κατευθυντήριες οδηγίες μετάγγισης αίματος και παραγώγων του. (2010). Ελληνική Αιματολογική Εταιρία - Τμήμα Αιμοδοσίας- Αφαιρέσης.

Όμηρος. (ραψωδία λ'). *Οδύσσεια* (Τόμ. ραψωδία λ').

Πλάτων. (n.d.). *Θεαίτητος*.

Πηγές Εικόνων

Εικόνα 1	4
Εικόνα 2 Science Photo Library (SPL) 327-329	4
Εικόνα 3 Ng, M., Tung, J.-P., & Fraser, J. (2018, April 1). Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? <i>Transfusion Medicine Reviews</i> , 32(3), σσ. 144-154. doi:10.1016/j.tmr.2018.04.001	7
Εικόνα 4 Gutmann, C., Joshi, A., & Mayr, M. (2020). Platelet “-omics” in health and cardiovascular disease. <i>Atherosclerosis</i> , 307, σσ. 87-96. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.022	9
Εικόνα 5 Ng, M., Tung, J.-P., & Fraser, J. (2018, April 1). Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? <i>Transfusion Medicine Reviews</i> , 32(3), σσ. 144-154. doi:10.1016/j.tmr.2018.04.001	15
Εικόνα 6 (Stroncek & Rebutta, 2007)	16
Εικόνα 7 (Holtkamp, 2016)	19
Εικόνα 8 (Schrezenmeier, et al., 2007) (Hourfar, et al., 2008) (Vit, et al., 2020)	20
Εικόνα 9 (Stroncek & Rebutta, 2007)	25
Εικόνα 10 Ng, M., Tung, J.-P., & Fraser, J. (2018, April 1). Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? <i>Transfusion Medicine Reviews</i> , 32(3), σσ. 144-154. doi:10.1016/j.tmr.2018.04.001	27
Εικόνα 11 Ng, M., Tung, J.-P., & Fraser, J. (2018, April 1). Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? <i>Transfusion Medicine Reviews</i> , 32(3), σσ. 144-154. doi:10.1016/j.tmr.2018.04.001	28
Εικόνα 12 (Scorer, et al., 2019)	34
Εικόνα 13 (Aslan, 2017)	39
Εικόνα 14 (Aslan, 2017)	39
Εικόνα 15 (Aslan, 2017)	39
Εικόνα 16 (Rumjantseva & Hoffmeister, 2010)	44
Εικόνα 17	45
Εικόνα 18 (Getz, et al., 2016)	48
Εικόνα 19 (Stolla, et al., 2020)	49
Εικόνα 20 Jiangcun, Y., Yin, W., Zhang, Y., Sun, Y., Ma, T., Gu, S., . . . Wang, W. (2018). Evaluation of the advantages of platelet concentrates stored at 4°C versus 22°C. <i>Transfusion</i> , 58(3), σσ. 736-747. doi:10.1111/trf.14462	50
Εικόνα 21 (Jiangcun, et al., 2018)	51
Εικόνα 22 (Jiangcun, et al., 2018)	52

Εικόνα 23. (Johnson, et al., 2016)	53
Εικόνα 24	54
Εικόνα 25 (Stolla, et al., 2020).....	55
Εικόνα 26 (Reddoch, et al., 2014).....	58
Εικόνα 27 (Stolla, et al., 2020).....	60
Εικόνα 28 (Getz, et al., 2016)	61
Εικόνα 29 (Leytin, 2012).....	63
Εικόνα 30 (Gyulkhandanyan, et al., 2012).....	64
Εικόνα 31 (McArthur, et al., 2018)	66
Εικόνα 32 (Stolla, et al., 2020).....	68
Εικόνα 33 (Reddoch, et al., 2014).....	70
Εικόνα 34 (Jiangcun, et al., 2018).....	71
Εικόνα 35 (Faraoni & DiNardo, 2021).....	72
Εικόνα 36 (Faraoni & DiNardo, 2021).....	72
Εικόνα 37 (Reddoch, et al., 2014).....	73
Εικόνα 38 (Jiangcun, et al., 2018).....	74
Εικόνα 39 (Nair, et al., 2017).	75
Εικόνα 40 (Nair, et al., 2017)	76
Εικόνα 41 (Nair, et al., 2021)	77
Εικόνα 42 (Nair, et al., 2021)	78
Εικόνα 43 (Gutmann, et al., 2020).....	81
Εικόνα 44 (Gutmann, et al., 2020).....	81
Εικόνα 45 (D'Alessandro, et al., 2020).....	83
Εικόνα 46 (D'Alessandro, et al., 2020).....	83
Εικόνα 47 (D'Alessandro, et al., 2020).....	84
Εικόνα 48 (Stolla, et al., 2020).....	91
Εικόνα 49 (Stolla, et al., 2018).....	93
Εικόνα 50 (Getz, et al., 2016)	104
Εικόνα 51 (Wood, et al., 2018)	110
Εικόνα 52 (Wood, et al., 2018).....	111
Εικόνα 53 (Wood, et al., 2018).....	112
Εικόνα 54 (Wood, et al., 2018).....	112
Εικόνα 55 (Wood, et al., 2018).	113
Εικόνα 56 (Braathen, et al., 2019)	114
Εικόνα 57 (Zhao & Devine, 2022)	126