



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΨΥΧΘΕΙ ΚΑΙ  
ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ

ΟΝΟΜΑ: ΜΑΛΛΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 14017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

Αθήνα, 2021



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES  
DIRECTION OF MEDICAL LABORATORIES

## COLD PLATELETS INTENDED FOR TRANSFUSION

NAME: MALLI EIRINI

REGISTER NUMBER: 14017

SUPERVISOR: KRIEBARDIS ANASTASIOS

**Athens 2021**

Αναστάσιος Κριεμπάρδης

Παπαγεωργίου Ευσταθία

Γεωργατζάκου Χαρά

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μάλλη Ειρήνη του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 14017 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής 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».

Η Δηλούσα



## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	iv
Abstract.....	v
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Ιστορία της μετάγγισης.....	6
1.2 Ολικό αίμα.....	7
1.3 Αιμοπετάλια.....	8
2. Δημιουργία αιμοπεταλίων.....	10
2.1 Βιολογία αιμοπεταλίων.....	12
2.1.1 Μοριακός μηχανισμός αιμοπεταλίων.....	12
2.1.2 Πρωτεϊνική ανάλυση αιμοπεταλίων.....	13
2.2 Δομή αιμοπεταλίων.....	13
2.2.1 Περιφερική ζώνη.....	13
2.2.2 Ζώνη κολλοειδούς γέλης.....	14
2.2.3 Ζώνη οργανιδίων.....	15
2.2.4 Κοκκία των αιμοπεταλίων.....	16
2.2.5 Σύστημα μεμβράνης.....	21
2.2.6 Επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων.....	22
2.5 Λειτουργία αιμοπεταλίων.....	23
2.5.1 Προσκόλληση αιμοπεταλίων και δημιουργία θρόμβου.....	24
2.5.2 Ρύθμιση μεγέθους θρόμβου.....	26
3. Αποθηκευτικές βλάβες αιμοπεταλίων.....	27
3.1 Ζωτικότητα των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων : σημαντικοί παράγοντες.....	27
3.1.1 Θερμοκρασία αποθήκευσης.....	27
3.1.2 Δοχεία αποθήκευσης αιμοπεταλίων.....	29
3.1.3 Αποθήκευση αιμοπεταλίων και ανάδευση.....	29

3.1.4 Αποθήκευση αιμοπεταλίων και υπολείμματα λευκοκυττάρων .....	29
3.2 Βλάβες στην λειτουργία των αιμοπεταλίων .....	30
3.2.1 Αποθηκευτικές βλάβες αιμοπεταλίων που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.....	31
3.2.2 Μεταβολικές βλάβες αιμοπεταλίων .....	32
3.2.4 Μορφολογικές και μεμβρανικές βλάβες αιμοπεταλίων .....	33
4. Φυσιολογία των παγωμένων αιμοπεταλίων .....	34
4.1 Αλλαγή στην μορφολογία των αιμοπεταλίων κατά την ψύξη.....	34
4.2 Ψύξη και διαρροή ασβεστίου .....	35
4.3 Μιτοχόνδρια και καταστολή του μεταβολικού ρυθμού των αιμοπεταλίων κατά την ψύξη.....	36
5. Παγωμένα αιμοπετάλια .....	37
5.1 Παγωμένα αιμοπετάλια και τραύματα .....	37
5.2 Παγωμένα αιμοπετάλια και αδρανοποίηση της βακτηριακής μόλυνσης.....	39
5.2.1 Μηχανισμοί αδρανοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών.....	40
5.2.2 Μέθοδος Intercept και παγωμένα αιμοπετάλια .....	41
Συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και ενεργοποίηση ιντεκρίνης.....	41
Ρυθμός προσκόλλησης και πήξης.....	42
Έκφραση φωσφατιδυλσερίνης και σχηματισμός μικροσωματιδίων (MP).....	42
Παραγωγή θρομβίνης .....	43
5.3 Χρήση των παγωμένων αιμοπεταλίων .....	43
5.4 Κλινικό όφελος παγωμένων αιμοπεταλίων .....	48
5.4.1 Θεραπευτική αντιμετώπιση σε κακοήθειες .....	48
5.4.2 Μετεγχειρητική θεραπεία .....	49
5.4.3 Δράσεις πέρα από την αιμόσταση .....	49
5.4.4 Ελλείψεις προϊόντων αίματος κατά την πανδημία .....	50
Βιβλιογραφία .....	52



## Περίληψη

Τα αιμοπετάλια είναι ένα συστατικό του αίματος που χρησιμοποιείται σαν προϊόν μετάγγισης εδώ και πολλά χρόνια, για προφυλακτικούς σκοπούς, σε ογκολογικούς ασθενείς και σε ασθενείς με αιματολογικές ασθένειες ενώ ταυτόχρονα αποτελούν ένα σημαντικό συστατικό στην αντιμετώπιση ασθενών με εκτεταμένη αιμορραγία. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων γίνεται στους 22°C – 24°C με συνεχή ανάδευση και η διάρκεια ζωής τους είναι μεταξύ 5 - 7 ημερών. Η συνθήκες αποθήκευσης αυτές των αιμοπεταλίων δημιουργούν πολλά προβλήματα στις τράπεζες αίματος καθώς η διάρκεια αποθήκευσής τους είναι αρκετά περιορισμένη ενώ ταυτόχρονα έχουν αυξημένο κίνδυνο βακτηριακής μόλυνσης με αποτέλεσμα να καταστρέφεται ένα μεγάλο ποσοστό του προϊόντος. Επιπλέον η ανάγκη διακομιδής των αιμοπεταλίων σε απομακρυσμένες περιοχές όπου η πρόσβαση δεν είναι εύκολη, δεδομένου του ότι χρειάζονται συνεχή ανάδευση κάνει την μεταφορά τους ιδιαίτερα δύσκολη. Τα προβλήματα αυτά σε συνδυασμό με το ολοένα αυξανόμενο ποσοστό των ανθρώπων που χρειάζονται να υποβληθούν σε μετάγγιση αιμοπεταλίων τόσο για προφυλακτικούς σκοπούς όσο και σε περιπτώσεις αιμορραγίας είναι απαραίτητο να βρεθεί ένα ασφαλή αλλά και αποτελεσματικό προϊόν ώστε να μειωθεί το λογιστικό πρόβλημα που δημιουργείται στις τράπεζες αίματος. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων στους 2°C – 4°C χωρίς ανάδευση είναι μια μέθοδος που δίνει την δυνατότητα να διευρυνθεί η διάρκεια ζωής του προϊόντος σε 8 – 10 ημέρες, να μειωθούν οι πιθανότητες βακτηριακής μόλυνσης ενώ ταυτόχρονα διευκολύνει και την μεταφορά του προϊόντος. Έχουν γίνει πολλές μελέτες για να διαπιστωθεί κατά πόσο τα παγωμένα αιμοπετάλια είναι αποτελεσματικά και ασφαλή έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν σαν προϊόν μετάγγισης έναντι των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δείχνουν ότι τα παγωμένα αιμοπετάλια έχουν μειωμένη διάρκεια ζωής στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών με αποτέλεσμα να μην αποτελούν το βέλτιστο προϊόν για προφυλακτική χρήση σε σχέση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αντίθεση όμως με τα παραπάνω αποτελέσματα τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται στο ψύχος αποτελούν ένα αρκετά βελτιωμένο προϊόν όσον αφορά την αιμοστατική τους δραστηριότητα παρέχοντας ισχυρότερους θρόμβους, ταχύτερη απόκριση συσσωματώματος και προσκόλλησης σε σχέση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου, καθιστώντας τα ένα πολλά υποσχόμενα προϊόν.



## **Abstract**

Platelets are a blood component which is used as a transfusion product for many years, for prophylactic purposes, to oncology patients and to patients with hematological malignancies while at the same time they represent a very important product concerning patients suffering from active bleeding. Platelets are stored at 22°C – 24°C with constant agitation, while having a lifespan between 5 – 7 days. The conditions under they are stored are causing various problems to blood banks, as they have a very limited lifespan. In addition they have a high risk of bacterial contamination which results to an extended waste of platelets. Furthermore the need for platelets to be distributed to remoted areas, while taking into consideration their constant need for agitation makes their transfer particularly difficult. These problems in combination with the percentage of patients who need a platelet transfusion either for prophylactic purposes or in cases of bleeding it is necessary to find a safe and effective product to reduce the accounting problem created in the blood banks. The storage of platelets at 2°C - 4°C without agitation is a method that allows to extend the life of the product to 8 - 10 days, to reduce the chances of bacterial contamination while also facilitating the transport of the product. Numerous studies have been performed to determine whether frozen platelets are effective and safe to be used as a transfusion product against platelets stored at room temperature. The results of these experiments show that frozen platelets have a shorter lifespan in the bloodstream of patients and therefore are not the best product for prophylactic use compared to platelets stored at room temperature. In contrast to the above results, cold-stored platelets are a fairly improved product in terms of their hemostatic activity, providing stronger clots, faster aggregation and adhesion response than platelets stored at room temperature, making them a rather promising product.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ιστορία της μετάγγισης

Η έννοια της μετάγγισης αίματος είναι σχετικά πρόσφατη και δηλώνει την μεταφορά αίματος από την κυκλοφορία ενός ατόμου σε ένα άλλο για πρακτικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς. Αν και πρακτικά χρησιμοποιήθηκε μετά τον 2ο Παγκόσμιο πόλεμο σαν ιδέα υπήρχε πολλά χρόνια πριν. Οι πρώτες προσπάθειες αντικατάστασης χαμένου αίματος αφορούσαν την κατανάλωση αίματος από τον ασθενή, το αίμα που χρησιμοποιούσαν ήταν κατά προτίμηση από ένα νέο υγιή άτομο ή ζώο.

Υπάρχουν αναφορές για την εφαρμογή αλλά και την κατανάλωση αίματος στις τελετουργίες, στις πεποιθήσεις και στους εορτασμούς πολλών πολιτισμών. Μερικοί από τους αρχαίους βασιλιάδες της Αιγύπτου λούζονταν με αίμα πιστεύοντας ότι έτσι θα αναζωογονούσαν τους άρρωστους. Έτσι και οι αρχαίοι Νορβηγοί έπιναν το αίμα από φάλαινες και τις φώκιες ως φάρμακο για την επιληψία και το σκορβούτο. Ενώ μια από τις πιο γνωστές αναφορές όσον αφορά τη «δύναμη» του αίματος είναι ο θρύλος του βαμπίρ, ο οποίος δηλώνει ότι ζει για πάντα πίνοντας το αίμα ζωντανών ανθρώπων (Learoyd, P., 2012).

Ο Άγγλος γιατρός William Harvey (1578-1657) ήταν ο πρώτος που περιέγραψε λεπτομερώς ότι το αίμα ρέει μέσα από μια συστηματική κυκλοφορία αιμοφόρων αγγείων σε μια κατεύθυνση ωθούμενο από την καρδιά σε όλο το σώμα. Η ανακάλυψη αυτή ξεκίνησε πολλές εικασίες όσον αφορά τη δυνατότητα της μετάγγισης αλλά και την έγχυση φαρμάκων στο σώμα. Το πανεπιστήμιο της Πάντοβα στο οποίο σπούδασε ο Harvey πιθανώς γνωρίζοντας τη δουλειά του ανέφερε πώς η μετάγγιση αίματος μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανή μέθοδος για την παράταση της ζωής.

Το πρώτο πείραμα μετάγγισης έγινε από τον Dr. Richard Lower, καταγράφηκε στις 31 Μαΐου 1665 και αναφέρει την άμεση μετάγγιση από ένα σκύλο σε έναν άλλον. Είναι ο πρώτος που καθόρισε την καταλληλότητα της μετάγγισης σαν πρακτική αντικατάστασης του αίματος, δεδομένου ότι ήταν σε θέση να αποδείξει ότι ένας σκύλος θα μπορούσε να εξαντληθεί μέχρι το σημείο θανάτου και στη συνέχεια να αποκατασταθεί πλήρως με μετάγγιση.

Η εργασία του Lower ήταν το ερέθισμα για μια σειρά πειραμάτων από διάφορους ανθρώπους και κατέληξε στη μετάγγιση από ζώο σε άνθρωπο. Στις 22 Νοεμβρίου 1667, ο

Lower, με βοήθo τον Dr Edmund King έκαναν την πρώτη μετάγγιση όπου χρησιμοποίησαν αγκάθια και ασημένιους σωλήνες για ην μεταφορά αίματος μεταξύ της καρωτίδας ενός προβάτου και της βραχιόνιας φλέβας του λήπτη.

Οι μεταγγίσεις αίματος αυτής της περιόδου εκτελούνταν χωρίς τις απαραίτητες γνώσεις για την ανοσία μεταξύ των ειδών, χωρίς την χρήση της μεθοδολογίας των αντιπηκτικών και με περιορισμένο πρακτικό και λειτουργικό εξοπλισμό (Leaoyd, P., 2012).

## **1.2 Ολικό αίμα**

Το ολικό αίμα έχει μεγάλη ιστορία στην στρατιωτική ιατρική, ξεκινώντας από τον Πρώτο Παγκόσμιο Πόλεμο έως και τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο όπου συλλέγονταν φρέσκο ολικό αίμα από άμεσα διαθέσιμους δότες και είτε χρησιμοποιούνταν ταυτόχρονα είτε συσκευάζονταν και παραδίνονταν για ανάνηψη στο σημείο τραυματισμού.

Το ολικό αίμα μπορεί να αποθηκευτεί στους 2 °C - 6 °C χωρίς ανάδευση έως 21 ημέρες αν συλλεχθεί σε διάλυμα δεξτρόζης φωσφορικού κιτρικού είτε για 35 ημέρες σε διάλυμα αδενίνης- 1- δεξτρόζης φωσφορικού κιτρικού άλατος. Ο FDA (Food and Drug Administration) αναφέρει ότι το ολικό αίμα ενδείκνυται σε περιπτώσεις συμπτωματικής αναιμίας με μεγάλη έλλειψη όγκου, καθώς επίσης αναφέρεται ότι το αίμα του δότη και του δέκτη θα πρέπει να έχουν την ίδια ομάδα κατά ABO (Spinella & Cap, 2016).

Σύμφωνα με την λογική η χρήση μιας μονάδας ολικού αίματος η οποία θα μεταγγιστεί σε ασθενή του οποίου η ζωή απειλείται από ακατάσχετη αιμορραγία θα έχει καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα σε σχέση με την μετάγγιση των συστατικών του. Αυτό συμβαίνει γιατί βιολογικά το ολικό αίμα παρέχει μια πιο ισορροπημένη αναλογία ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs), πλάσματος και αιμοπεταλίων (PLTs) σε αντίθεση με το πρωτόκολλο της επείγουσας μετάγγισης όπου τα συστατικά του ολικού αίματος πρέπει να μεταγγίζονται με αναλογία 1:1:1.

Επιπλέον η ξεχωριστή μετάγγιση των προϊόντων του ολικού αίματος μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση αραιωτικής θρομβοπάθειας στον ασθενή, αφού κάθε ασκός περιέχει μεγάλες ποσότητες αντιπηκτικών. Επιπρόσθετα η μέθοδος αποθήκευσης του ολικού αίματος είναι πιθανό να βελτιστοποιήσει τις λειτουργίες των συστατικών του καθώς μπορεί να περιορίσει τις βλάβες των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όταν αυτά αποθηκεύονται ως ξεχωριστές μονάδες ενώ ταυτόχρονα η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε χαμηλές θερμοκρασίες φαίνεται να ενισχύει τις αιμοστατικές τους ικανότητες. Αυτά τα χαρακτηριστικά του ολικού αίματος το καθιστούν ένα αρκετά χρήσιμο προϊόν μετάγγισης το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε

ένα ευρύ φάσμα ασθενών όπως εκείνους με ακατάσχετη αιμορραγία και εκείνους που πάσχουν από θρομβοπάθειες που είναι ικανές να οδηγήσουν σε οργανική ανεπάρκεια.

Αν και το ολικό αίμα φαίνεται να είναι ένα καλό προϊόν αιμοστατικής ανάνηψης δεν χρησιμοποιείται τόσο συχνά στον ανεπτυγμένο κόσμο σε σχέση με τα μεμονωμένα συστατικά του τα RBCs, το πλάσμα και τα PLTs τα οποία χορηγούνται σε αναλογία είτε 1:1:2 είτε 1:1:1 (Spinella & Cap, 2016).

### 1.3 Αιμοπετάλια

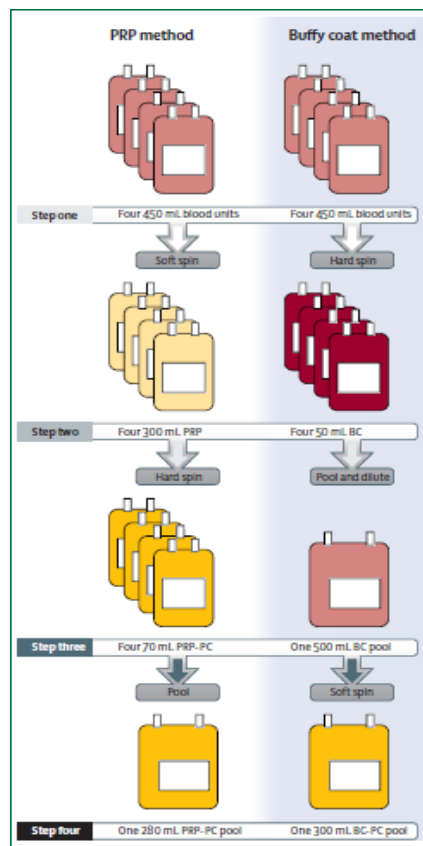
Η μετάγγιση αιμοπεταλίων χρησιμοποιείται από το 1950 με σκοπό την θεραπεία ασθενών που πάσχουν από αιμορραγία, έκτοτε το φάσμα χρήσης τους έχει αυξηθεί και περιλαμβάνει την θεραπεία του καρκίνου, αιματολογικές κακοήθειες, την ανεπάρκεια του μυελού των οστών αλλά και την προληπτική μετάγγιση σε ασθενής με πολύ χαμηλά ποσοστά αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται στους 22-24 °C, με συνεχή ανάδευση για 5-7 ημέρες. Η συλλογή των αιμοπεταλίων γίνονταν σε γυάλινα δοχεία, όμως το προϊόν για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί χρίζει κάποιας επεξεργασίας η οποία με την αποθήκευσή του σε γυάλινα δοχεία αύξανε τον κίνδυνο βακτηριακής μόλυνσης. Για τον λόγο αυτό ο τρόπος αυτός αποθήκευσης άλλαξε και αντί για γυάλινα δοχεία χρησιμοποιούνται πλέον πλαστικοί ασκοί μιας χρήσης, μειώνοντας έτσι σημαντικά τον κίνδυνο μόλυνσης των αιμοπεταλίων καθώς η επεξεργασία τους λαμβάνει μέρος σε κλειστό κύκλωμα.

Υπάρχουν τρεις μέθοδοι συλλογής και επεξεργασίας των αιμοπεταλίων η μέθοδος που χρησιμοποιεί «πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια» (PRP), η μέθοδος «Buffy coat» και τα αιμοπετάλια αφαίρεσης (Stroncek & Rebull, 2007).

- **Μέθοδος PRP** : αργή φυγοκέντρηση του ολικού αίματος με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων αλλά και την απομόνωση των αιμοπεταλίων στο υπερκείμενο πλάσμα το οποίο ονομάζεται «πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια». Στη συνέχεια το PRP φυγοκεντρείται σε υψηλές στροφές με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των αιμοπεταλίων από το πλάσμα. Το αρνητικό της μεθόδου αυτής είναι ότι χρειάζεται μεγάλος αριθμός συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων για ποσότητα που αντιστοιχεί σε μια δόση αιμοπεταλίων για έναν ενήλικα (Stroncek & Rebull, 2007).
- **Αιμοπετάλια αφαίρεσης** : τα αιμοπετάλια αφαιρούνται κατευθείαν από τον δότη στην επιθυμητή ποσότητα. Η μέθοδος αυτή αν και είναι πιο ακριβή έχει το πλεονέκτημα ότι δεν εκθέτει τον δέκτη σε μεγάλο αριθμό δοτών με αποτέλεσμα να

μειώνει τις πιθανότητες μετάδοσης ασθένειας που να οφείλεται στην μετάγγιση (Stroncek & Rebulla, 2007).

- **Μέθοδος «Buffy coat» :** η μέθοδος αυτή ξεκινά με μια φυγοκέντρηση του ολικού αίματος σε υψηλές στροφές με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια καθώς και τα αιμοπετάλια, με τα αιμοπετάλια και τα λευκά αιμοσφαίρια να βρίσκονται στο υπερκείμενο αποτελώντας την στοιβάδα του buffy coat. Στη συνέχεια ενώνονται τέσσερις με οχτώ στοιβάδες του buffy coat με την ίδια ομάδα αίματος κατά ABO και φυγοκεντρώνονται σε χαμηλές στροφές, το υπερκείμενο του πλάσματος που περιέχει τα αιμοπετάλια αποθηκεύεται ενώ τα λευκά αιμοσφαίρια απορρίπτονται. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να γίνει επιλογή του διαλύματος στο οποίο θα εναιωρηθούν τα αιμοπετάλια κατά την αποθήκευση μειώνοντας έτσι τις παρενέργειες που προκαλούνται από την μετάγγιση μεγάλου όγκου πλάσματος ενώ ταυτόχρονα βελτιώνουν και τον μεταβολισμό των αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση (Stroncek & Rebulla, 2007).



Εικόνα 1. Σύγκριση των μεθόδων PRP και buffy coat για την παραγωγή αιμοπεταλίων (Stroncek & Rebulla, 2007).

Τα αιμοπετάλια είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο της ιατρικής πράξης που βρίσκεται εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα ασθενών. Ο τρόπος συλλογής και ο τρόπος αποθήκευσης αυτού του προϊόντος έχει αλλάξει με το πέρασμα των χρόνων έτσι ώστε να γίνει ασφαλέστερη η χρήση του. Παρόλα αυτά υπάρχουν ακόμα πολλοί περιορισμοί όπως αυτός του χρόνου αποθήκευσής του και της διατήρησης των λειτουργιών του (Stroncek & Rebutta, 2007).

## **2. Δημιουργία αιμοπεταλίων**

Οι ενήλικες άνθρωποι έχουν στην κυκλοφορία τους σχεδόν ένα τρισεκατομμύριο αιμοπετάλια (PLTs) με μέσο όρο ζωής μόνο 8-10 ημέρες. Μεταξύ των πρωταρχικών τους λειτουργιών, τα αιμοπετάλια χρησιμεύουν και ως βοηθητικά μέσα της κυκλοφορίας του αίματος, ενώ ταυτόχρονα ανταποκρίνονται σε τραυματισμό των αιμοφόρων αγγείων μεταβάλλοντας το σχήμα τους, εκκρίνουν το περιεχόμενό τους και δημιουργούν συσσωματώματα με σκοπό τον σχηματισμό θρόμβου στο αίμα. Τα αιμοπετάλια παίζουν επίσης δευτερεύοντα ρόλο βοηθώντας στη ρύθμιση της αγγειογένεσης και της έμφυτης ανοσίας. Για να διατηρηθεί ο όγκος των αιμοπεταλίων στα φυσιολογικά επίπεδα 150-400 x 10<sup>9</sup> PLTs/ λίτρο ολικού αίματος, πρέπει να παράγονται καθημερινά περίπου 100 δισεκατομμύρια νέα αιμοπετάλια (Thon & Italiano, 2012).

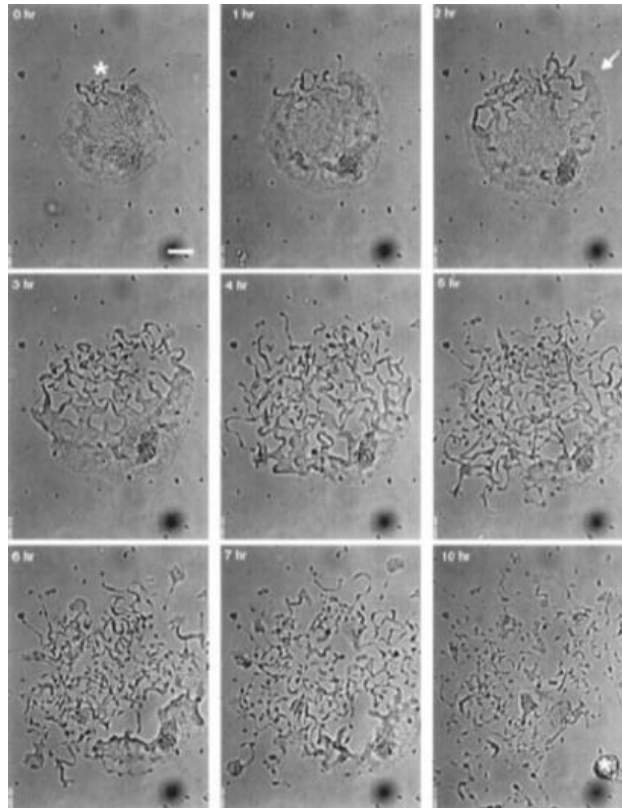
Τα αιμοπετάλια παράγονται από γιγαντιαία πολυπλοειδή κύτταρα που ονομάζονται μεγακαρυοκύτταρα, αυτά είναι σπάνια μυελοειδή κύτταρα και βρίσκονται στον μυελό των οστών (Εικόνα 2) (Zufferey, et.al., 2012). Τα μεγακαρυοκύτταρα προκύπτουν από πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα που βρίσκονται ως επί το πλείστο στην οστεοβλαστική θέση του εγγύς οστού. Αυτά αναπτύσσονται από πρόδρομες μορφές και δημιουργούν αποικίες, οι οποίες εκφράζουν το αντιγόνο CD34 και συνεχίζουν να ωριμάζουν καταλήγοντας έτσι σε μεγακαρυοκύτταρα. Αποτελούν λιγότερο από το 0,1% του κυτταρικού πληθυσμού του μυελού των οστών και ο αριθμός τους μπορεί να διαμορφωθεί από παράγοντες όπως η θρομβοποιητίνη (TPO) και οι χημειοκίνες. Η διαφοροποίηση αυτή στηρίζεται κατά κύριο λόγο στη σηματοδότηση της TPO μέσω του υποδοχέα cMpl και υποβοηθάται από επιπρόσθετους αυξητικούς παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη-3 (IL-3), ο παράγοντας βλαστικών κυττάρων (SCF), η IL-6 και η IL-11 (Thon & Italiano, 2012).

Κατά την ωρίμανση, τα μεγακαρυοκύτταρα υφίστανται αρκετούς κύκλους χρωμοσωμικού διπλασιασμού χωρίς κυτταρική διαίρεση (έως 64 φορές) μια διαδικασία που ονομάζεται

ενδομήτωση. Στη διαδικασία αυτή το μεγακαρυοκύτταρο προχωράει διαδοχικά από τις φάσεις G1, S και G2, χωρίς όμως να ολοκληρώνει την φάση M και εισέρχεται ξανά στη φάση G1, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία ενός και μόνο συμπυκνωμένου πυρήνα. Ο κυτταροπλασματικός όγκος των μεγακαρυοκυττάρων αυξάνεται αναλογικά με τη περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA, η οποία χρησιμοποιείται για την κατευθυνόμενη σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων για την υποστήριξη της παραγωγής αιμοπεταλίων. Αυτό αυξάνει ουσιαστικά το μέγεθος του μεγακαρυοκυττάρου (περίπου μέχρι διάμετρο 100 nm) και το εμπλουτίζει με οργανίδια, κόκκους, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες αιμοπεταλίων (Thon & Italiano, 2012), ενώ ταυτόχρονα προσαρμόζει το κυτταρόπλασμα και την μεμβράνη τους σχηματίζοντας ένα σύστημα μεμβράνης διαχωρισμού (DMS), η λειτουργία της οποίας είναι βασισμένη σε ένα πυκνό σωληνοειδές δίκτυο. Το DMS συνδέεται με την μεμβράνη, λειτουργώντας ως δεξαμενή για τη βιογένεση των αιμοπεταλίων (Zufferey, et.al., 2012).

Στη συνέχεια ο μεγακαρυοβλάστης αφού προέλθει από ένα δυνητικά προγονικό μεγακαρυοκύτταρο υφίσταται μια σειρά διαιρέσεων, κατά τις οποίες το κυτταρόπλασμα του αρχίζει να εκφράζει ειδικές πρωτεΐνες αιμοπεταλίων (π.χ. β1-τουμπουλίνη). Η επιφανειακή μεμβρανόδης περιοχή αρχίζει να εκφράζει έναν επιλεκτικό αριθμό πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων (π.χ. ιντεγκρίνη αIIb/β3, ιντεγκρίνη αII/β1, γλυκοπρωτεΐνη GpIb,GpVI) καθώς και κυτταροπλασματικούς κόκκους και τα συστατικά τους (π.χ. FIV, αυξητικό παράγοντα β1, τον παράγοντα von Willebrand Factor, P-σελεκτίνη) ενώ παράλληλα αρχίζουν να σχηματίζονται εσωτερικές μεμβράνες που επιτρέπουν την ταχεία ροή του ασβεστίου και τον σχηματισμό των προαιμοπεταλίων (Kaushansky & Kaushansky, 2014).

Τα απελευθερωμένα προαιμοπετάλια συνεχίζουν να ωριμάζουν στο αγγειακό σύστημα και τελικά απελευθερώνουν μεμονωμένα αιμοπετάλια από τις άκρες τους. Ένα μεγακαρυοκύτταρο μπορεί να μας δώσει από 1.000-3.000 αιμοπετάλια πριν απομακρυνθούν τα υπολείμματα του πυρηνικού υλικού με την βοήθεια της φαγοκυττάρωσης (Thon & Italiano, 2012).



Εικόνα 2. Ενισχυμένο βίντεο μικροσκοπίου από μεγακαρυοκύτταρα ενός ποντικού κατά την διάρκεια δημιουργίας προαιμοπεταλίων *in vitro*. Κατά την διάρκεια των αρχικών σταδίων του σχηματισμού προαιμοπεταλίων το μεγακαρυοκύτταρο εξαπλώνεται και το φλοιώδες κυτταρόπλασμα αρχίζει να ξετυλίγεται σε ένα πόλο (αυτή η ζώνη διάβρωσης είναι επισημασμένη με λευκό αστερίσκο στην πρώτη ομάδα). Καθώς το κύτταρο εξαπλώνεται το κυτταρόπλασμα στη θέση της διάβρωσης διαμορφώνεται σε μεγάλα ψευδοπόδια (λευκό βέλος στην τρίτη εικόνα) τα οποία επιμηκύνονται και μακραίνουν σχηματίζοντας λεπτούς σωλήνες διαμέτρου 2-4 μm. Οι επεκτάσεις των προαιμοπεταλίων συχνά κάμπτονται και οι θέσεις κάμψης διαδοχικά διχαλώνονται για να ενεργοποιήσουν νέες διαδικασίες των προαιμοπεταλίων. Με αυτό τον τρόπο ολόκληρος ο κυτταροπλασματικός όγκος του μεγακαρυοκυττάρου μετατρέπεται σε διακλαδισμένα αιμοπετάλια και τα άκρα αυτών αυξάνονται δραματικά. Τα προαιμοπετάλια αναπτύσσουν επίσης τεταμένες ενώσεις κατά το μήκος τους οι οποίες προσδίδουν μια εμφάνιση σφαιριδίων. Η διαδικασία επεξεργασίας των αιμοπεταλίων τελειώνει με μια ταχεία απόσυρση που διαχωρίζει τους κλώνους των αιμοπεταλίων από τον υπολειμματικό γυμνό πυρήνα (αστερίσκος στην κάτω δεξιά εικόνα). Η κλίμακα της εικόνας είναι 20 μm. Η περιγραφή προέρχεται από την εικόνα 1 της πηγής (Zufferey, et.al., 2012).

## 2.1 Βιολογία αιμοπεταλίων

### 2.1.1 Μοριακός μηχανισμός αιμοπεταλίων

Κατά μέσο όρο τα αιμοπετάλια περιέχουν μόλις  $2 \times 10^{-3}$  fg mRNA/ κύτταρο (περίπου 3-4 λιγότερα RNA αντίγραφα από ένα τυπικό πυρηνικό κύτταρο), ωστόσο τα νεότερα αιμοπετάλια περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες mRNA. Τα αιμοπετάλια έχουν ένα τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, πολυριβωσώματα, ενώ διατηρούν και την ικανότητα τους για βιοσύνθεση πρωτεϊνών από το κυτταροπλασματικό mRNA. Τα ανενεργά αιμοπετάλια εμφανίζουν ελαττωμένη μεταφραστική δραστηριότητα, ενώ τα αιμοπετάλια που έχουν δημιουργηθεί πρόσφατα συνθέτουν διάφορες μεμβρανικές και α-κοκκίων γλυκοπρωτεΐνες όπως την GPIb και GPIIb/IIIa (αIIbβ3). Επιπρόσθετα, η διέγερση των ανενεργών



αιμοπεταλίων από αγωνιστές όπως η α-θρομβίνη αυξάνει την πρωτεϊνική σύνθεση διάφορων πρωτεϊνών συμπεριλαμβανόμενης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης Bcl-3 και της προφλεγμονώδους κυτοκίνης και ιντερλευκίνης-1β (Bahou & Wadie , 2012).

### **2.1.2 Πρωτεϊνική ανάλυση αιμοπεταλίων**

Το πρωτεϊνωμα μπορεί να περιγραφεί ως το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα καθορισμένο δείγμα υπό διαφορετικές συνθήκες. Το γεγονός ότι όλες οι βιολογικές διεργασίες ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες, το πρωτεϊνωμα (σε αντίθεση με το γονιδίωμα) είναι πολύ δυναμικό και μπορεί να αλλάξει τη σύνθεσή του τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά με την πάροδο του χρόνου. Πρόσφατες έρευνες κατέδειξαν ότι με τη χρήση της σύγχρονης τεχνολογίας για την μελέτη του πρωτεϊνώματος, μπορούν να ανιχνευθούν περίπου 10.000 πρωτεΐνες σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Burkhart et.al., 2014). Οι αρχικές μελέτες του πρωτεϊνώματος των αιμοπεταλίων επικεντρώθηκαν κυρίως στα ανενεργά αιμοπετάλια χρησιμοποιώντας τις μεθόδους δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα (2-DE) και μονοκλωνικά αντισώματα μέσα σε πήκτωμα για την ανίχνευση πρωτεϊνών (Bahou & Wadie , 2012).

## **2.2 Δομή αιμοπεταλίων**

Τα αιμοπετάλια έχουν μέση διάμετρο 2 έως 5 μm, πάχος 0,5 μm και μέσο όγκο κυττάρων από 6 έως 10 fl. Για πρακτικούς λόγους η δομή του αιμοπεταλίου μπορεί να χωριστεί σε μία περιφερική ζώνη, μία ζώνη κολλοειδούς-γέλης, μια ζώνη οργανιδίων και ένα σύστημα μεμβράνης (Gremmel et.al., 2016).

### **2.2.1 Περιφερική ζώνη**

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων είναι σχετικά λεία και έχει ένα παχύ στρώμα από γλυκοκάλυκα (GP- με επικάλυψη από έναν πολυσακχαρίτη). Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υψηλής ανάλυσης παρουσιάζεται μια τσαλακωμένη εμφάνιση με πολλές μικροσκοπικές πτυχές και τυχαία κατανομημένα ανοίγματα του καναλοειδούς της συστήματος. Ο γλυκοκάλυκας σαν εξωτερική επίστρωση του κυττάρου είναι μια δυναμική δομή και αποτελεί την πρώτη επαφή του με τον περιβάλλοντα χώρο. Περιέχει επιφανειακούς GPs οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τις υποενδοθηλιακές δομές του τραυματισμένου τοιχώματος του αγγείου, για την ενεργοποίηση, την προσκόλληση και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και για την απόσυρση του θρόμβου. Πιο συγκεκριμένα έχουμε τα σύμπλοκα GPIb-IX-V και την

ιντεγκρίνη-αIIbβ3 οι οποίες εκφράζονται άφθονα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση (Gremmel et.al., 2016).

Κάτω από την γλυκοκαλυκή επιφάνεια βρίσκεται η λιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία είναι ασυμπίεστη και ασταθής. Κατά συνέπεια η πρόσθετη μεμβράνη που χρειάζεται για την εξάπλωση των αιμοπεταλίων παρέχεται από τις μικροσκοπικές πτυχές τους και τα εσωτερικά τμήματα της μεμβράνης του ανοιχτού καναλοειδούς συστήματός τους. Η λιπιδική διπλοστιβάδα μοιάζει μορφολογικά με τις μεμβράνες άλλων κυτταρικών τύπων αλλά στα αιμοπετάλια παίζει σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος. Περιέχει ιστικό παράγοντα (TF) στην επιφάνεια των ανενεργών αιμοπεταλίων μαζί με αρνητικά φορτισμένη φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία ακολουθεί την ενεργοποίησή τους. Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν μικροσωματίδια (MP) που φέρουν τον TF και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τους παράγοντες πήξης Va, VIIa, Xa στην επιφανειακή φωσφατιδυλοσερίνη.

Τέλος η υπομεμβρανώδη περιοχή των αιμοπεταλίων βρίσκεται κάτω από τη λιπιδική διπλοστιβάδα και έχει μεγάλη σημασία για την λειτουργία τους. Περιέχει ένα σύστημα λεπτών ινών ακτίνης το οποίο απαιτείται για την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και τη μετατόπιση των υποδοχέων και των σωματιδίων στην επιφάνεια τους. Η αλληλεπίδραση των κυτταροπλασματικών περιοχών με πρωτεΐνες ρυθμίζουν τις διαδικασίες σηματοδότησης που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Gremmel et.al., 2016).

### **2.2.2 Ζώνη κολλοειδούς γέλης**

Η διαφανής αλλά παχύρρευστη μήτρα εντός των αιμοπεταλίων χαρακτηρίζεται ως ζώνη κολλοειδούς- γέλης. Μοιάζει με υγρό πήκτωμα και περιέχει οργανωμένα μικροσωληνάρια και μικρονημάτια, τυχαία κατανεμημένο γλυκογόνο, μικρά κυστίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη και εκκριτικά οργανίδια. Πειράματα αναφέρουν ότι τα μικροσωληνάρια είναι απαραίτητα για τη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματος των αιμοπεταλίων. Οι μικροϊνες ακτίνης στη ζώνη κολλοειδούς γέλης σχηματίζουν τον κυτταροσκελετό, ο οποίος αποτελεί το καλούπι για την αναστολή των οργανιδίων και βοηθάει να κρατάει τα οργανίδια μακριά το ένα από το άλλο, αλλά και μακριά από το κυτταρικό τοίχωμα των ανενεργών αιμοπεταλίων. Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων το σύστημα της κυτταροπλασματικής ακτίνης συστέλλει τα πηνία των μικροσωληναρίων για να κινηθούν τα α-κοκκία και τα πυκνά σώματα στο κέντρο των αιμοπεταλίων, με σκοπό να οδηγήσουν

στην έκκριση του περιεχομένου τους μέσω του ανοιχτού καναλοειδούς συστήματος (Gremmel et.al., 2016).

### **2.2.3 Ζώνη οργανιδίων**

Υπάρχουν τρεις τύποι εκκριτικών οργανιδίων στα αιμοπετάλια: τα α-κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα (Πίνακας 1). Επιπλέον τα αιμοπετάλια περιέχουν μιτοχόνδρια, τα οποία χρησιμεύουν στον μεταβολισμό της ενέργειάς τους, γλυκοσώματα, πυκνές αλυσίδες και συμπλέγματα ηλεκτρονίων και έγκλειστα σωληνοειδή.

Άλλες δομές αδιαφανών ηλεκτρονίων στο κυτταρόπλασμα είναι οι αλυσίδες και τα συμπλέγματα εξαγωνικών σφαιριδίων που υπάρχουν στο 2-22% των ανθρώπινων αιμοπεταλίων και αυξάνονται με την ηλικία. Η λειτουργία και ο σχηματισμός των δομών αυτών παραμένει άγνωστος (Gremmel et.al., 2016).

Τα γλυκοσώματα των αιμοπεταλίων που περιέχουν γλυκογόνο είναι ένα άλλο συστατικό της ζώνης των οργανιδίων των αιμοπεταλίων. Αυτά έχουν στρογγυλό ή ωοειδές σχήμα και παρόμοιο μέγεθος με τα α-κοκκία τα οποία περιέχουν επίσης γλυκογόνο, με αποτέλεσμα να συγχέονται εύκολα μεταξύ τους. Οι σωληνωτές εγκλείσεις, οι οποίες συχνά περιέχουν επίσης γλυκογόνο, μπορούν να διακριθούν από τα γλυκοσώματα μέσω της πολυελασματικής μεμβράνης τους.

Τα μιτοχόνδρια παρατηρούνται και αυτά στη ζώνη των οργανιδίων. Παρά τον μικρό αριθμό και την απλή δομή τους, παρέχουν τις ενεργειακές απαιτήσεις των αιμοπεταλίων και εξασφαλίζουν ότι και με τον αποκλεισμό της αναερόβιας γλυκόλυσης δεν επηρεάζει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Αν και τα μιτοχόνδρια θεωρούνται σημαντικοί παροχείς ασβεστίου για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, παρόλα αυτά φαίνεται πως οι πιο σημαντικοί είναι το πυκνό σωληνοειδές σύστημα και το εξωκυτταρικό ασβέστιο (Gremmel et.al., 2016).

## ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΚΟΚΚΙΩΝ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

	Αριθμός/PLT	Διάμετρος (nm)	Περιοχή επιφάνειας ( $\mu\text{m}^2$ )/ PLT	Κοινοί δείκτες	Γενική λειτουργία
<b><math>\alpha</math>-κοκκία</b>	50-80	200-500	14	VWF CXCL4 (PF4) P- σελεκτίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αιμόσταση/Θρόμβωση</li> <li>• Φλεγμονή</li> <li>• Αγγειογένεση</li> <li>• Άμυνα ξενιστή</li> <li>• Μιτογένεση</li> </ul>
<b>Πυκνά κοκκία</b>	3-8	150	<1	CD63 Σεροτονίνη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αιμόσταση/Θρόμβωση</li> <li>• Φλεγμονή</li> </ul>
<b>Λυσοσώματα</b>	<3	200-250	<1	Οξική φωσφατάση	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ενδοσωματική πέψη</li> </ul>

Πίνακας 1. Συνοτομογραφίες: CXCL4, χημειοκίνη (μοτίβο O-X-O,PF4, παράγοντα αιμοπεταλίων 4, VWF παράγοντας von Willebrand.Ο πίνακας προέρχεται από τον Πίνακα 1 της πηγής: (Gremmel et.al., 2016).

### 2.2.4 Κοκκία των αιμοπεταλίων

Τα κοκκία των αιμοπεταλίων περιεγράφηκαν για πρώτη φορά στα τέλη του 19ου αιώνα. Ωστόσο η διαφοροποίηση των  $\alpha$ - κοκκίων από τα πυκνά κοκκία έγινε το 1966, ενώ χρειάστηκε και έναν επιπλέον χρόνο για να διακριθούν τα δύο προηγούμενα από τα λυσοσώματα με την τότε αναπτυχθείσα μέθοδο του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Gremmel et.al., 2016).

#### **Α-κοκκία**

Τα  $\alpha$ -κοκκία έχουν στρογγυλό προς ωοειδές σχήμα με διάμετρο 200 έως 500 nm. Ένα μέσο ανθρώπινο αιμοπετάλιο περιέχει 50 έως 80  $\alpha$ -κοκκία, γεγονός που τα καθιστά τα πιο συχνά οργανίδια. Στα ανενεργά αιμοπετάλια, τα  $\alpha$ -κοκκία διαχωρίζονται το ένα από το άλλο με τη βοήθεια του κυτταροσκελετού που δημιουργεί η κυτταροπλασματική ακτίνη. Η ένωση των  $\alpha$ -κοκκίων κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας αποθήκευσης αιμοπεταλίων είναι ένα από τα πρώτα σημάδια κυτταρικής βλάβης. In vivo, παρατηρείται ένωση  $\alpha$ -κοκκίων με αποτέλεσμα την δημιουργία γιγαντιαίων  $\alpha$ -κοκκίων σε ασθενείς με σύνδρομο Paris-Trousseau-Jacobsen, σύνδρομο λευκών αιμοπεταλίων κ.α.. Ενώ η ζώνη υπομεμβράνης των

α-κοκκίων περιέχει τον παράγοντα von Willebrand (VWF) σε σωληνοειδείς δομές, στην περιφερική ζώνη βρέθηκαν διάφορες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών που συνθέτει το μεγακρυοκύτταρο, όπως ο παράγοντας πήξης V, η θρομβοσπονδίνη, η P-σελεκτίνη και ο vWF καθώς και οι εξωτερικά συντεθειμένες πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων (π.χ. το ινωδογόνο) (Gremmel et.al., 2016).

Οι πρωτεΐνες που είναι αποθηκευμένες στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων παρέχονται με σύνθεση και ενδοκυττάρωση. Οι πρωτεΐνες που παράγονται με τη μέθοδο της σύνθεσης μεταφέρονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο δίκτυο trans-Golgi, όπου πακετάρονται και δημιουργούν τα ανώριμα κοκκία, ενώ οι πρωτεΐνες του πλάσματος απορροφώνται από τα μεγακαρυοκύτταρα μέσω της ενδοκυτταρικής οδού και η πρόσληψη των πρωτεϊνών αυτών συνεχίζεται μέσω των ώριμων αιμοπεταλίων.

Τα α-κοκκία περιέχουν σχετιζόμενες με τη μεμβράνη, διαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες όπως στην κυτταρική προσκόλληση, στην πήξη, στην φλεγμονή, στην κυτταρική ανάπτυξη και στην άμυνα του ξενιστή (Πίνακας 2). Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, οι πρωτεΐνες των κοκκίων που είναι συνδεδεμένες με την μεμβράνη εκφράζονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, ενώ οι διαλυτές πρωτεΐνες των κοκκίων απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με την μεμβράνη είναι ήδη παρούσες στην επιφάνεια των ανενεργών αιμοπεταλίων όπως για παράδειγμα, οι ιντεγκρίνες  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , οι υποδοχείς των ανοσοσφαιρίνων όπως το GPVI, οι υποδοχείς Fc (FcR), το μόριο προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοπεταλίων, το σύμπλεγμα GPIb-IX-V, οι τετρασπανίνες, το CD36 και το Glut-3. Ωστόσο, μερικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένων του ινωδογόνου L, CD109 και P-σελεκτίνης, εκφράζονται αποκλειστικά στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Ειδικότερα, η έκφραση της επιφανειακής P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων χρησιμοποιείται ευρέως ως ευαίσθητος κυτταρομετρικός δείκτης ροής ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Gremmel et.al., 2016).

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ Α-ΚΟΚΚΙΩΝ</b>	
<b>Τύπος</b>	<b>Παραδείγματα</b>
<b>Πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την μεμβράνη</b>	αIIbβ3, GPIb-IX-V, GPVI, P-σελεκτίνη
<b>Πηκτικά, αντιπηκτικά και ινωδολυτικές πρωτεΐνες</b>	Παράγοντες V, IX, XIII, αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη S, αναστολέας ιστικού παράγοντα, πλασμινογόνο, α <sub>2</sub> -μακροσφαιρίνη
<b>Προσκολλητικές πρωτεΐνες</b>	Ινωδογόνο, παράγοντας von Willebrand, θρομβοσπονδίνη
<b>Χημειοκίνες</b>	CXCL1 (GRO-α), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES)
<b>Αυξητικοί παράγοντες</b>	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων, αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β
<b>Αγγειογενείς παράγοντες και αναστολείς</b>	Παράγοντας ανάπτυξης αγγειακού ενδοθηλίου, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων, αγγειοστατίνη, ενδοστατίνη
<b>Μικροβιοκτόνες πρωτεΐνες</b>	Θυμοσίνη-β4, θρομβοκιδίνες1 και 2
<b>Ανοσοποιητικοί μεσολαβητές</b>	Πρόδρομη μορφή συμπληρώματος C3, Πρόδρομη μορφή συμπληρώματος C4, IgG

Πίνακας 2. Συντομογραφίες: CCL, chemokine (C-C motif) ligand; CXCL, chemokine (C-X-C motif) ligand; ENA-78, epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78; GP, glycoprotein; GRO-α, growth-regulated oncogene α; IgG, immunoglobulin G; IL8, interleukin 8; MCP-1, monocyte chemotactic protein 1; MIP-1α, macrophage inflammatory protein 1α; PF4, platelet factor 4; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted. Ο πίνακας προέρχεται από τον Πίνακα 2 της πηγής: (Gremmel et.al., 2016).

## Πυκνά κοκκία

Τα 3-8 πυκνά κοκκία ανά φυσιολογικό ανθρώπινο αιμοπετάλιο είναι μικρότερα από τα α-κοκκία και παρουσιάζουν μεγάλη μορφολογική μεταβλητότητα. Το χαρακτηριστικό τους είναι η σφαιρική δομή που είναι αδιαφανής σε ηλεκτρόνια, η οποία συνήθως περιβάλλεται από κενό χώρο. Ωστόσο, σε ορισμένα πυκνά κοκκία, ο χώρος αυτός διασχίζεται από νήματα ή είναι γεμάτος με μια ουσία που μοιάζει με τα κοκκία. Εκτός από τα νουκλεοτίδια αδερίνης, όπως η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), οι πυκνοί κόκκοι περιέχουν σεροτονίνη, πυροφωσφορικό, ασβέστιο και μαγνήσιο. Οι πυκνοί κόκκοι είναι οργανίδια που σχετίζονται με λυσοσώματα, πράγμα που σημαίνει ότι προέρχονται από το ενδοσωμικό σύστημα και όχι από το δίκτυο trans-Golgi (Gremmel et.al., 2016).

Οι πυκνοί κόκκοι αιμοπεταλίων περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νουκλεοτιδίων αδερίνης, πιο συγκεκριμένα ADP και ATP, νουκλεοτίδια ουρακίλης, γουανίνης, καθώς επίσης ασβέστιο και κάλιο (Πίνακας 3). Τα πυκνά κοκκία αιμοπεταλίων περιέχουν επίσης πολυφωσφορικές, βιοενεργές αμίνες όπως η σεροτονίνη και η ισταμίνη. Ο χώρος εντός των πυκνών κόκκων αιμοπεταλίων διατηρείται σε pH περίπου 5,4 με την βοήθεια της αντλίας πρωτονίων  $H^+$ -ATPase.

Επιπλέον, στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων έχει αναφερθεί η ύπαρξη της πρωτεΐνης της πολυανθεκτικότητας 4 και θεωρείται πως είναι υπεύθυνη για την πρόσληψη των νουκλεοτιδίων αδερίνης, ενώ η σεροτονίνη διακινείται από το κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων σε πυκνούς κόκκους μέσω του κυστικού φορέα μονοαμίνης 2. Ο τελευταίος μπορεί επίσης να συμπυκνώνει την ισταμίνη μέσα στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων. Η GPIb, η ιντεγκρίνη  $\alpha IIb\beta 3$ , η CD63 (κοκκιοφυσίνη) και η LAMP-2 συγκαταλέγονται στις συσχετιζόμενες με τη μεμβράνη πρωτεΐνες που βρίσκονται στους πυκνούς κόκκους των αιμοπεταλίων (Gremmel et.al., 2016).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΥΚΝΩΝ ΚΟΚΚΙΩΝ	
Τύπος	Παραδείγματα
Κατιόντα	$Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $K^+$
Φωσφορικά	Πολυφωσφορικό, πυροφωσφορικό
Βιοενεργές αμίνες	Σεροτονίνη, ισταμίνη
Νουκλεοτίδια	ADP, ATP, UTP, GTP

Πίνακας 3 Συνοτομογραφίες: ADP διφωσφορική αδερίνη. ATP τριφωσφορική αδερίνη. GTP τριφωσφορική γουανίνη, UTP τριφωσφορική ουρακίλη. Ο πίνακας προέρχεται από τον Πίνακα 3 της πηγής: (Gremmel et.al., 2016)

## Λυσοσώματα

Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης 0 έως 2 σφαιρικά λυσοσώματα, τα οποία είναι ελαφρώς μικρότερα από τα α-κοκκία. Η περιεκτικότητά τους περιλαμβάνει τουλάχιστον 13 όξινες υδρολάσες, καθεψίνη D και E, πρωτεΐνη μεμβράνης σχετιζόμενη με λυσοσώματα (LAMP) -2, CD63 και μπορούν να απελευθερωθούν ως απόκριση σε ισχυρή διέγερση των αιμοπεταλίων *in vitro*. Ωστόσο, ο ρόλος των λυσοσωμάτων στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και την αιμόσταση παραμένει άγνωστος.

Τα λυσοσώματα των αιμοπεταλίων φέρουν ένζυμα αποικοδόμησης πρωτεϊνών όπως οι καθεψίνες, η ελαστάση και η κολλαγενάση καθώς και ένζυμα που αποικοδομούν υδατάνθρακες, όπως η γλυκοσιδάση και η γαλακτοσιδάση. Επιπλέον διαθέτουν και την όξινη φωσφατάση ως ένζυμο υπεύθυνο για την διάσπαση του φωσφορικού εστέρα (Πίνακας 4). Τα LAMP-1, LAMP-2 και CD63 βρίσκονται στη λυσοσωμική μεμβράνη σε κατάσταση υψηλής γλυκοζυλίωσης και ενισχύουν την προστατευτική της λειτουργία (Gremmel et.al., 2016).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΩΝ	
Τύπος	Παραδείγματα
Ένζυμα αποικοδόμησης πρωτεϊνών	Καθεψίνες, ελαστάση, κολλαγενάση, καρβοξυπεπτιδάση
Ένζυμα αποικοδόμησης υδατανθράκων	Γλυκοσιδάση, γαλακτοσιδάση, μαννοσιδάση
Ένζυμα διασπάσεως φωσφορικού εστέρα	Οξική φωσφατάση

Πίνακας 4 Ο πίνακας προέρχεται από τον Πίνακα 4 της πηγής: (Gremmel et.al., 2016).



### 2.2.5 Σύστημα μεμβράνης

Εκτός από την εξωτερική μεμβράνη πλάσματος, τα συστήματα μεμβράνης στα ανθρώπινα αιμοπετάλια περιλαμβάνουν σύμπλοκα Golgi, το ανοικτό καναλιούχο σύστημα που συνδέεται στην επιφάνεια, το πυκνό σωληνοειδές σύστημα και το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο.

Το ανοικτό καναλιούχο σύστημα είναι ένα μέρος της επιφανειακής μεμβράνης του αιμοπεταλίου, το οποίο εκτείνεται προς το εσωτερικό του και σχηματίζει έτσι μια σωληνοειδή δομή η οποία ασκεί τρεις κύριες λειτουργίες. Τα κανάλια του μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά των συστατικών του πλάσματος, όπως το ινωδογόνο και των α-κοκκίων ενώ ταυτόχρονα μπορούν να χρησιμεύσουν ως οδοί απελευθέρωσης των περιεχομένων των α-κοκκίων κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, τα κανάλια του ανοικτού καναλοειδούς συστήματος μπορούν να εξαχθούν και έτσι να παράσχουν τμήματα μεμβράνης που απαιτούνται για την εξάπλωση των αιμοπεταλίων μετά την συγκόλληση τους σε ένα τραυματισμένο τοίχωμα του αγγείου. Μέσω αυτού του μηχανισμού, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είναι ικανά να αυξήσουν την επιφάνεια τους περισσότερο από τέσσερις φορές σε σύγκριση με τα δισκοειδή αδρανή αιμοπετάλια (Gremmel et.al., 2016).

Το πυκνό σωληνοειδές σύστημα είναι ένα υπόλειμμα του λείου ενδοπλασματικού δικτύου του μητρικού μεγακαρυοκυττάρου και αποτελείται από κανάλια τυχαία διασκορπισμένα στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων. Τα κανάλια του λείου ενδοπλασματικού δικτύου διαχωρίζονται από τα κανάλια του ανοικτού καναλοειδούς συστήματος καθώς τα πρώτα φαίνονται κενά με την βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε αντίθεση με τα κανάλια του ανοικτού καναλοειδούς συστήματος που περιέχουν μια άμορφη ουσία που μοιάζει με το περιβάλλον κυτταρόπλασμα σε αδιαφάνεια (Gremmel et.al., 2016).

## 2.2.6 Επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται ο πίνακας 5, ο οποίος περιλαμβάνει τις γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας των αιμοπεταλίων και τον ρόλο τους.

<b>ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ</b>	
<b>Γλυκοπρωτεΐνη</b>	<b>Ρόλος</b>
<b>GPIIb-IX-V Complex</b>	Το σύμπλεγμα GPIIb-IX-V δρα ως δέκτης επιφάνειας αιμοπεταλίων και εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην φυσιολογική αιμόσταση καθώς και στην αρτηριακή θρόμβωση
<b>Glycoprotein VI</b>	Ο GPVI είναι ο κύριος υποδοχέας σηματοδότησης για κολλαγόνο στα ανθρώπινα αιμοπετάλια και χρησιμεύει σε λειτουργίες όπως η αιμόσταση αλλά και σε άλλες διεργασίες που εμπλέκονται τα αιμοπετάλια.
<b>Integrin <math>\alpha</math>IIb<math>\beta</math>3</b>	Η επιφανειακή ιντεγκρίνη $\alpha$ IIb $\beta$ 3 των αιμοπεταλίων (προηγουμένως ονομαζόμενη GPIIb / IIIa) μετασχηματίζεται από χαμηλής συγγένειας υποδοχέα (στην αδρανή της κατάσταση) σε έναν υποδοχέα υψηλής συγγένειας ως το τελικό στάδιο της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και στη συνέχεια μεσολαβεί στη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων σε μοριακό επίπεδο.

Πίνακας 5 . Τα στοιχεία του πίνακα χρησιμοποιήθηκαν από την πηγή (Gremmel et.al., 2016)

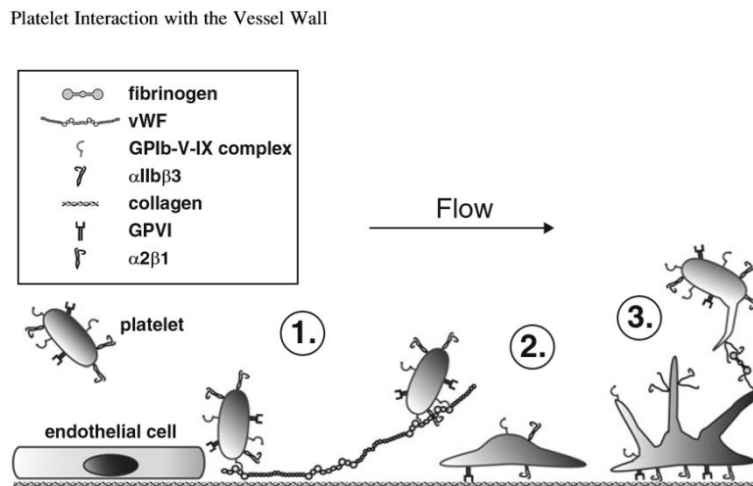
## 2.5 Λειτουργία αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα αιμοφόρα αγγεία. Μετά το σχηματισμό τους από τα μεγακαρυοκύτταρα, τα αιμοπετάλια επιβιώνουν στην κυκλοφορία του αίματος από 5 έως 7 ημέρες και λειτουργούν κυρίως ως ρυθμιστές της αιμόστασης και της θρόμβωσης (Holinstat, Michael, 2017). Τα αιμοπετάλια δεν προσκολλώνται σε μη κατεστραμμένα τοιχώματα αγγείων, αλλά κυκλοφορούν παθητικά μέσω των αγγείων. Τα περισσότερα αιμοπετάλια δεν θα τεθούν ποτέ σε λειτουργία καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Αντιθέτως κυκλοφορούν στο αίμα μας σε αδρανή κατάσταση μέχρι να χρειαστούν, αλλά σε περίπτωση ανάγκης, μπορούν να ενεργοποιηθούν αμέσως. Κυκλοφορούν στο αίμα κοντά στο τοίχωμα του αγγείου σε συνεχή αναζήτηση για τυχόν τραυματισμό του και δρουν σαν κινητοί «επιθεωρητές» ώστε να διατηρείται η ακεραιότητα του τοιχώματος του, ενώ είναι έτσι σχεδιασμένα ώστε να σταματούν οποιαδήποτε διαρροή. Στην επιφάνεια τους έχουν συγκεκριμένους υποδοχείς οι οποίοι είναι σε θέση να αναγνωρίσουν τις πρωτεΐνες που θα εκτεθούν στο αίμα μετά από τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος. Τα PLTs ανταποκρίνονται άμεσα στους τραυματισμούς, προσκολλώνται, ενεργοποιούνται και αρχίζουν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων που καλύπτει την τραυματισμένη περιοχή. Τα συσσωματωμένα αιμοπετάλια παρέχουν επίσης μια επιφάνεια στην οποία μπορούν να δεσμευτούν οι παράγοντες πήξης και να σχηματιστεί ινώδες έτσι ώστε να σταθεροποιηθεί ο θρόμβος. Η λειτουργία των αιμοπεταλίων πρέπει να ρυθμίζεται προσεκτικά. Η αυτόματη ή παρατεταμένη συσσώρευση των αιμοπεταλίων πρέπει να αποφεύγεται ανά πάσα στιγμή. Η σωστή λειτουργία των αιμοπεταλίων επιτυγχάνεται όταν περιορίζεται η απώλεια αίματος, χωρίς όμως περαιτέρω βλάβες που μπορεί να προκληθούν από αγγειακή απόφραξη (Thon & Italiano, 2012).

Μετά από κάποιον αγγειακό τραυματισμό, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται στο αίμα με αποτέλεσμα την προσκόλληση τους, εξωκυττάρια, στην περιοχή του υποενδοθηλίου. Η παραπάνω διεργασία έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συσσωματώματος αιμοπεταλίων και τελικά τον σχηματισμό και την παγίωση ενός θρόμβου, που αποτελείται τόσο από πυρήνα όσο και από κυτταροσκελετό. Σε παθολογικές καταστάσεις, τα αιμοπετάλια είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό αποφρακτικού θρόμβου και για τον λόγο αυτό αποτελούν τον πρωταρχικό παράγοντα για την πρόληψη σχηματισμού αρτηριακού θρόμβου. Εκτός από τη ρύθμιση της αιμόστασης στο αγγείο, τα PLTs έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσική ανοσία, καθώς και στη ρύθμιση της ανάπτυξης όγκων (Holinstat, Michael, 2017).

### 2.5.1 Προσκόλληση αιμοπεταλίων και δημιουργία θρόμβου

Η προσκόλληση αιμοπεταλίων είναι το πρώτο βήμα όσον αφορά την ανταπόκρισή τους σε έναν αγγειακό τραυματισμό. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων γίνεται μέσα στο αίμα, πράγμα που σημαίνει ότι η συγκολλητική διαδικασία πρέπει να ενεργοποιείται ταχέως και τα προσκολλημένα αιμοπετάλια πρέπει να μπορούν να αντέχουν τις διατμητικές δυνάμεις που υπάρχουν σε αυτό το περιβάλλον. Αυτό έχει οδηγήσει στην εξέλιξη των προσκολλητικών υποδοχέων, οι οποίοι έχουν μοναδική χρήση την προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Πριν από την πρώτη αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και ενός τραυματισμένου τοιχώματος του αγγείου, ο παράγοντας von Willebrand (vWF) που υπάρχει στο πλάσμα θα προσκολληθεί στο κολλαγόνο που υπάρχει διάχυτο στο υποενδοθήλιο (Εικόνα 3) (Thon & Italiano, 2012).



Εικόνα 3 . Σχηματική επισκόπηση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν σε κατάσταση ηρεμίας σε υψηλή ταχύτητα. (1.) Μετά από αγγειακή βλάβη, ο η πρωτεΐνη πλάσματος, παράγοντας Von Willebrand (vWF) θα δεσμευτεί στο εκτεθειμένο υποενδοθήλιο κολλαγόνο μέσω της περιοχής του A3, και στη συνέχεια θα αποκτήσει την ιδιότητα του να δεσμεύει αιμοπετάλια. Έπειτα ο vWF δεσμεύει αιμοπετάλια από την κυκλοφορία μέσω της αλληλεπίδρασης του vWF (περιοχή A1) με το σύμπλεγμα GPIb-V-IX του αιμοπεταλίου. Δεδομένου ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ vWF και GPIb-V-IX είναι παροδική, η κύλιση των αιμοπεταλίων πάνω από το τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα θα επιβραδυνθεί. (2.) Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια που βρίσκονται στην κυκλοφορία θα προσκολληθούν στο εκτεθειμένο κολλαγόνο μέσω της ιντεγκρίνης α2β1. Η αλληλεπίδραση του GPVI με το κολλαγόνο θα οδηγήσει σε περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. (3.) Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια θα εξαπλωθούν και θα υποστούν μια αλλαγή σχήματος που αυξάνει δραματικά την επιφάνειά τους. Ακολούθως θα απελευθερώσουν το περιεχόμενο των κοκκίων α και δ, πράγμα που θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση ενός δεύτερου στρώματος από αιμοπετάλια κυκλοφορίας. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκφράζουν την ιντεγκρίνη αIIbβ3 σε μορφή που επιτρέπει την υψηλή δέσμευση ινωδογόνου πράγμα το οποίο θα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό συσσωματωμένων αιμοπεταλίων. Η εικόνα προέρχεται από το Σχήμα 2 της πηγής: (Thon & Italiano, 2012).

Στη συνέχεια το αιμοπετάλιο μπορεί να συνδεθεί με το αγγειακό τοίχωμα μέσω της γλυκοπρωτεΐνης Iba (GPIba) (μια γλυκοπρωτεΐνη από τα πολυπεπίδια του συμπλόκου υποδοχέα αιμοπεταλίων GPIb-V-IX) με την βοήθεια του ακινητοποιημένου vWF. Η

αλληλεπίδραση του vWF με το GPIba είναι παροδική και δεν επιτρέπει τη σταθερή τους προσκόλληση. Η σταθερή αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων ξεκινάει με την πρόσδεσή τους στο αγγειακό τοίχωμα. Τα αιμοπετάλια θα αρχίσουν να κινούνται γύρω από τον vWF προς την κατεύθυνση της ροής του αίματος, κινούμενα από τις δυνάμεις διάτμησης που ασκούνται από το ρέον αίμα. Η ασταθής αλληλεπίδραση του συμπλόκου GPIba-vWF στην κάτω πλευρά των αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός νέων αλληλεπιδράσεων στην πάνω πλευρά τους προκαλούν μια διαδικασία κύλισης. Η διαδικασία αυτή επιβραδύνει τα αιμοπετάλια και καθιστά δυνατή την αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες του τοιχώματος των αγγείων μέσω άλλων υποδοχέων. Η αλληλεπίδραση GPIba-vWF διεγείρει επίσης μια ασθενή ενδοκυτταρική σηματοδότηση που θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Η μειωμένη ταχύτητα σε συνδυασμό με την ήπια ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επιτρέπει την επακόλουθη αλληλεπίδραση με επιπλέον υποδοχείς, όπως ο aIIbβ3 (γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa, GPII/bIIIa), του α2b1 και της γλυκοπρωτεΐνης (GP) VI με τον vWF και το κολλαγόνο, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την προσκόλληση των αιμοπεταλίων (Thon & Italiano, 2012).

Για την περαιτέρω σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με το υποενδοθήλιο, τα αιμοπετάλια θα εξάπλωθούν, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων τους με την επιφάνεια. Αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα τα αιμοπετάλια να αντέξουν τις δυνάμεις διάτμησης που ασκούνται από το ρέον αίμα. Η εξάπλωση των αιμοπεταλίων γίνεται κυρίως με την βοήθεια της ιντεγκρίνης aIIbβ3. Πριν καθιερωθεί η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων και η εξάπλωσή τους, ένα μέρος τους θα αποκολληθεί και θα ξαναγυρίσει στην κυκλοφορία του αίματος, δημιουργώντας έτσι μια νέα επιφάνεια για να προσκολληθεί το επόμενο αιμοπετάλιο. Ο μηχανισμός με τον οποίο ένα αιμοπετάλιο που βρίσκεται στην κυκλοφορία θα συνδεθεί με ένα ήδη προσκολλημένο αιμοπετάλιο έχει πολλές ομοιότητες με εκείνον που ένα PLT θα συνδεθεί σε ένα τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα. Το αιμοπετάλιο που κυκλοφορεί θα πρέπει να συνδεθεί με το προσκολλημένο αιμοπετάλιο όταν αυτό δέχεται ακόμα δυνάμεις διάτμησης, ενώ ταυτόχρονα το τελευταίο θα συνδέσει το ινωδογόνο με τον παράγοντα vWF που βρίσκεται στην κυκλοφορία μέσω των γλυκοπρωτεϊνών aIIbβ3 και GPIba, αντίστοιχα, δημιουργώντας έτσι μια ιδανική επιφάνεια για να προσκολληθεί το αιμοπετάλιο.

Ο παράγοντας Von Willebrand βοηθάει ως συγκολλητική επιφάνεια για τη βέλτιστη προσκόλληση των αιμοπεταλίων όταν εκτίθενται σε ψηλές δυνάμεις διάτμησης. Επιπλέον, το υποενδοθήλιο και ο συνδετικός ιστός περιέχουν πολλά άλλα συγκολλητικά μόρια, όπως τύπους κολλαγόνου I, III, IV, V και VI, κ.α., για τα οποία όλα τα αιμοπετάλια διαθέτουν

υποδοχείς. Όλες αυτές οι συγκολλητικές πρωτεΐνες βοηθούν στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων όταν εκτίθενται σε χαμηλές δυνάμεις διάτμησης. Οι υποδοχείς και οι εξωκυττάρια πρωτεΐνες που εμπλέκονται στα διαφορετικά στάδια προσκόλλησης εξαρτώνται από την αγγειακή φύση της βλάβης. Στο φλεβικό σύστημα, οι χαμηλές δυνάμεις διάτμησης επιτρέπουν την αλληλεπίδραση πολλών διαφορετικών υποδοχέων, σε αντίθεση με την αρτηριακή κυκλοφορία, όπου οι υψηλές δυνάμεις περιορίζουν τη συμμετοχή της πλειονότητας των υποδοχέων και η κύρια προσκολλητική πρωτεΐνη θεωρείται ότι είναι ο παράγοντας vWF (Thon & Italiano, 2012).

### **2.5.2 Ρύθμιση μεγέθους θρόμβου**

Εάν μια φλέβα δεν έχει υποστεί πλήρη τομή, η απώλεια αίματος από το τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα πρέπει να αποτραπεί χωρίς όμως να παρεμποδίζεται η ροή του αίματος μέσω του αγγείου. Για να γίνει αυτό πρέπει να περιοριστεί το μέγεθος του αναπτυσσόμενου θρόμβου. Καθώς ο θρόμβος μεγαλώνει οι δυνάμεις διάτμησης στην επιφάνειά του αυξάνονται, γεγονός που σημαίνει ότι η δύναμη που πρέπει να ξεπεράσει το αιμοπετάλιο το οποίο ετοιμάζεται να προσκολληθεί είναι και αυτή μεγαλύτερη. Ταυτόχρονα, καθώς ο θρόμβος μεγαλώνει τα αιμοπετάλια που βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος αυτού είναι ασθενέστερα ενεργοποιημένα και η προσκόλλησή τους γίνεται ασθενέστερη. Κάποια στιγμή αυτά τα δύο ισορροπούν και τα αιμοπετάλια παύουν να προσκολλώνται. Επιπλέον, επειδή τα αιμοπετάλια που βρίσκονται στο εξωτερικό του θρόμβου ενεργοποιούνται λιγότερο, οι υποδοχείς τους απενεργοποιούνται σταδιακά και επιτρέπουν στα αιμοπετάλια να αποκολληθούν.

Εάν μεγάλα τμήματα του θρόμβου αποκοπούν από τις δυνάμεις διάτμησης σχηματίζουν μια εμβολή. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μια τέτοια εμβολή διασπάται ταχύτατα σε μεμονωμένα αιμοπετάλια, τα οποία είτε θα συνεχίσουν να βρίσκονται φυσιολογικά στην κυκλοφορία του αίματος, είτε θα απομακρυνθούν αν η δομή τους έχει αλλάξει δραματικά. Τα αιμοπετάλια αφού απομακρυνθούν από την θέση του τραυματισμένου αγγείου εκτίθενται σε προσταγλανδίνες και οξείδιο του αζώτου, ώστε να μειωθεί η δραστηριότητά τους και οποιαδήποτε ενέργεια που σχετίζεται με το ADP απομακρύνεται ταχέως από την εκφραζόμενη απυράση που εκφράζεται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. Στο τέλος το κατεστραμμένο τοίχωμα του αγγείου καλύπτεται με ένα μη θρομβογόνο στρώμα αιμοπεταλίων, το οποίο σταματά την περαιτέρω απώλεια αίματος. Δεν είναι γνωστό το πώς η επιφάνεια του θρόμβου γίνεται μη θρομβογόνος. Το πιθανότερο σενάριο είναι να μην

εκφράζονται ή και να μην υπάρχουν θέσεις δεσμεύσεως vWF / ινωδογόνου στην επιφάνεια αυτή (Clemetson, Kenneth J., 2012).

### **3. Αποθηκευτικές βλάβες αιμοπεταλίων**

Η διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων κυμαινόταν από 3 έως 5 ημέρες. Με την πάροδο του χρόνου και λόγω της βελτίωσης της τεχνολογίας αποθήκευσής τους η διάρκεια ζωής τους αυξήθηκε σε 7 ημέρες. Αργότερα, παρατηρήθηκε αύξηση της βακτηριακής επιμόλυνσης λόγω της παρατεταμένης αποθήκευσης τους σε θερμοκρασία δωματίου με αποτέλεσμα να μειωθεί ξανά ο χρόνος αποθήκευσής τους στις 5 ημέρες. Οι αλλοιώσεις που υφίστανται τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται στους 22°C ως προς την ποιότητά τους χαρακτηρίζονται ως, βλάβες αποθήκευσης αιμοπεταλίων (PSL). Το PSL ορίζεται καλύτερα ως το άθροισμα όλων των επιβλαβών αλλαγών, που οδηγούν σε προοδευτικές βλάβες στη δομή και τη λειτουργία των αιμοπεταλίων οι οποίες προκύπτουν από τη στιγμή που το αίμα αντλείται από τον δότη μέχρι τη μετάγγιση του αίματος στον δέκτη (Shrivastava, 2009).

Οι αλλοιώσεις των αιμοπεταλίων που υποβαθμίζουν την ποιότητά τους διακρίνονται σε μορφολογικές, μεταβολικές, λειτουργικές ενώ ταυτόχρονα σχετίζονται με την ικανότητα ενεργοποίησής τους και την απόπτωση. Μερικές από αυτές τις αλλαγές είναι αναστρέψιμες μετά τη μετάγγιση των αιμοπεταλίων.

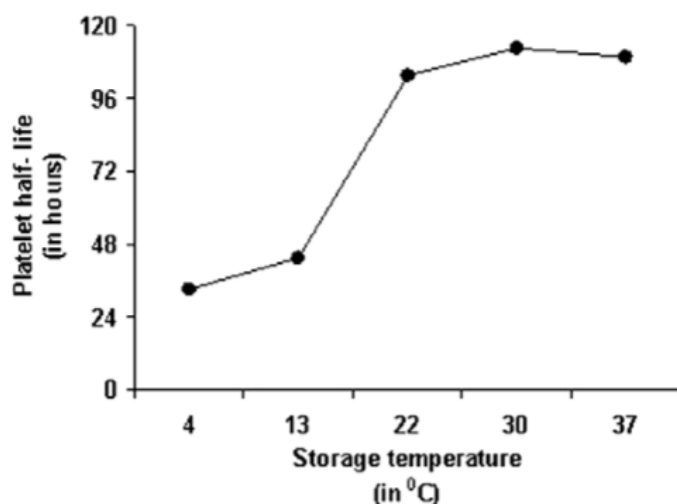
Η εξάλειψη του PSL παραμένει το καθοριστικό εμπόδιο προτού να μπορέσουν να επεκταθούν οι χρόνοι αποθήκευσης των αιμοπεταλίων. Η *in vitro* αποθήκευση των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων (PCs) έχει κάποιες παραμέτρους οι οποίες επηρεάζουν την ζωτικότητα τους αυτές είναι ο τύπος του πλαστικού δοχείου αποθήκευσης, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα του μεταβολικού καυσίμου, η αναπνευστική ικανότητα (εξαρτάται από τη διάχυση του αερίου μέσω του δοχείου, την ανάδευση και την περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια (Shrivastava, 2009).

#### **3.1 Ζωτικότητα των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων : σημαντικοί παράγοντες**

##### **3.1.1 Θερμοκρασία αποθήκευσης**

Η βέλτιστη θερμοκρασία αποθήκευσης των αιμοπεταλίων είναι 22-24°C με συνεχή ήπια ανάδευση. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων στους 4°C εφαρμόζονταν μέχρι τα τέλη του 1960 μέχρι που ανακαλύφθηκε ότι τα προϊόντα που αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου (22-24°C) είχαν μεγαλύτερη *in vivo* επιβίωση και καλύτερη αιμοστατική

δραστικότητα, σε σχέση με εκείνα που αποθηκεύονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Μετά από την αποθήκευση τους στους 4°C για 24 έως και 72 ώρες, η βιωσιμότητα των αιμοπεταλίων μειώθηκε κατά 18% και 9% αντίστοιχα. Η έκθεση των αιμοπεταλίων στο κρύο προκαλεί μεταβολή στη μορφολογία τους μετατρέποντας τα από δισκοειδή σε σφαιρικά ενώ ταυτόχρονα εμφανίζεται μια ακανθώδης προεξοχή στην επιφάνεια τους λόγω της εξαρτώμενης από ασβέστιο ενεργοποίησης γελσολίνης και του πολυμερισμού της ακτίνης με τη μεσολάβηση της φωσφοϊνοσιτιδής. Το γεγονός ότι η ψύξη δεν επηρεάζει αναγκαστικά τη λειτουργία των αιμοπεταλίων *in vivo* αλλά μειώνει την χρονική περίοδο κυκλοφορίας των αιμοπεταλίων στο αίμα εξηγείται από το ακόλουθο γεγονός. Το σύμπλεγμα του υποδοχέα vWf/(GPIb) των αιμοπεταλίων σχηματίζει μια ένωση κατά την ψύξη η οποία διευκολύνει την σύνδεσή τους με τους υποδοχείς αMβ2 της ιντεγκρίνης στα μακροφάγα του ήπατος με αποτέλεσμα την ταχεία κάθαρση τους από την κυκλοφορία. Η (Εικόνα 4) δείχνει την επίδραση διάφορων θερμοκρασιών σε σημασμένα αιμοπετάλια κατά την αποθήκευσή τους για 18 ώρες μετά από επανέγχυση σε υγιείς εθελοντές. Η αναστρεψιμότητα των βλαβών των αιμοπεταλίων έχει να κάνει τόσο με τη διάρκεια αποθήκευσης όσο και με τη θερμοκρασία (Shrivastava, 2009).



Εικόνα 4. Επίδραση 18 ωρών αποθήκευσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε επισημασμένα αυτόλογα αιμοπετάλια *in vivo*. Η περιγραφή προέρχεται από την εικόνα 2 της πηγής: (Shrivastava, 2009).



### **3.1.2 Δοχεία αποθήκευσης αιμοπεταλίων**

Παλιότερα ο ίδιος τύπος δοχείου συλλογής χρησιμοποιούνταν τόσο για την αποθήκευση του ολικού αίματος όσο και για την αποθήκευση αιμοπεταλίων. Σήμερα, χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι δοχείων με διαφορετικά σχήματα, μεγέθη και πάχος για την αποθήκευση των αιμοπεταλίων. Η πρώτη γενιά δοχείων αιμοπεταλίων αποτελούνταν από ένα σχετικά παχύ στρώμα πολυβινυλοχλωριδίου (PVC) και 2-διαιθυλοεξυλοφθαλικό άλας (DEHP) ως πλαστικοποιητή. Αυτός ο τύπος δοχείου δεν επέτρεψε την επαρκή ανταλλαγή οξυγόνου (Seghatchian & Krailadsiri, 1997), ώστε να αποτρέψει την δραματική μείωση του pH (Shrivastava, 2009) και να καταστεί δυνατή η αποθήκευση αιμοπεταλίων πέραν των 3 ημερών. Η βλάβη αυτή σχετίστηκε με την ανάπτυξη τοξικής ένωσης προερχόμενη από τον αναλώσιμο πλαστικοποιητή (Seghatchian & Krailadsiri, 1997).

Τα δοχεία δεύτερης γενιάς χρησιμοποιούν το Ακετυλικό-τριοεθυλικό κιτρικό άλας και έναν πλαστικοποιητή με βάση το βουτυρυλο τρι-κ-εξυλο κιτρικό το οποίο φαίνεται να είναι λιγότερο διαλυτό στο πλάσμα. Επιπλέον, αυτός ο πλαστικοποιητής με βάση το κιτρικό μπορεί να μεταβολιστεί από τα αιμοπετάλια μέσω του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος σε χρήσιμες ενώσεις (Seghatchian & Krailadsiri, 1997).

### **3.1.3 Αποθήκευση αιμοπεταλίων και ανάδευση**

Τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται με συνεχή ήπια ανάδευση, ως μέσο διευκόλυνσης της διαπερατότητας του οξυγόνου, έχουν καλύτερη διατήρηση της μορφολογίας τους και της *in vitro* λειτουργικότητας τους σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που είναι αποθηκευμένα χωρίς ανάδευση. Η ανάδευση συμβάλλει επίσης στη μείωση του ρυθμού πτώσης του pH κατά την αποθήκευση (Shrivastava, 2009).

### **3.1.4 Αποθήκευση αιμοπεταλίων και υπολείμματα λευκοκυττάρων**

Η σημασία συνύπαρξης λευκοκυττάρων με αιμοπετάλια έχει τέσσερις ερμηνείες. Η πρώτη αφορά τις συνέπειες της αναπόφευκτης ενεργοποίησης ή κατακερματισμού των λευκοκυττάρων κατά την αποθήκευση. Η δεύτερη ερμηνεία αφορά την παρουσία λευκοκυττάρων και το γεγονός πως αυτή μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά άμεσων δυσμενών επιδράσεων σε μεταγγιζόμενους λήπτες. Ένας τρόπος αποφυγής του συμβάντος αυτού είναι η απομάκρυνση των λευκοκυττάρων από τα αιμοπετάλια με την διαδικασία της διήθησης για την παραγωγή λευκαφαιρεμένων αιμοπεταλίων, η ενέργεια αυτή παρόλο που είναι χρήσιμη για τη μείωση κάποιων παρενεργειών, μπορεί να προκαλέσει βλάβες στη σταθερότητα της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων.

Η τρίτη ερμηνεία έχει να κάνει με το γεγονός ότι, τα λευκοκύτταρα που υπάρχουν στο αίμα παίζουν σημαντικό ρόλο στη βακτηριοκτόνο δράση του μεταγγιζόμενου αίματος και των αιμοπεταλίων μέσα στις πρώτες 22-48 ώρες μετά τη συλλογή. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι η φαγοκυτταρική ικανότητα των κοκκιοκυττάρων είναι επαρκής για την απομάκρυνση του μικρού φορτίου των βακτηριδίων που μπορεί να υπάρχουν στην επιφάνεια του δέρματος και που μπορούν περιστασιακά να εισέρχονται στον σάκο αίματος κατά τη στιγμή της αιμοληψίας. Με αυτό το ενδεχόμενο, η διήθηση ή η πλήρης απομάκρυνση των κοκκιοκυττάρων κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης της επεξεργασίας, μπορεί να καταστήσει τα αιμοπετάλια πιο επιρρεπή σε βακτηριακή ανάπτυξη. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οποιαδήποτε πρόσθετη επεξεργασία, όπως η μεταφορά των αιμοπεταλίων σε νέο δοχείο, η λευκαφαίρεση είτε με φυγοκέντρηση είτε με τη βοήθεια φίλτρων, η πλασμαφαίρεση, το πλύσιμο, η κρυσυντήρηση και η έκθεσή τους σε ακτινοβολία UV-B μπορούν να δημιουργήσουν βλάβες στα αιμοπετάλια σε πολλούς τομείς (Seghatchian & Krailadsiri, 1997).

### **3.2 Βλάβες στην λειτουργία των αιμοπεταλίων**

Σε αντίθεση με άλλα προϊόντα αίματος, τα αιμοπετάλια απαιτούν πολύ συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης για τη διατήρηση της λειτουργίας και της ζωτικότητάς τους. Δεδομένου του κινδύνου πρόωρης ενεργοποίησης, τα αιμοπετάλια που προορίζονται για μετάγγιση πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου, σε δοχεία που να υπάρχει διακίνηση αερίων και με συνεχή ανάδευση. Παρά το γεγονός ότι τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται κάτω από αυτές τις συνθήκες μετά το από κάποιο χρονικό διάστημα αναπτύσσουν βλάβες, οι οποίες είναι γνωστές ως "αποθηκευτικές βλάβες αιμοπεταλίων" και χαρακτηρίζονται από σταδιακή μείωση της ενεργοποίησής, της ικανότητας συσσωμάτωσης και της αποκοκκιοποίησης τους, διεργασίες που είναι απαραίτητες για την αιμοστατική τους ικανότητα. Επιπλέον, ο χρόνος αποθήκευσης έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την αύξηση παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) καθώς και με την ταχεία ενεργοποίηση της απόπτωσης. Είναι επίσης πιθανό ότι ο αυξημένος χρόνος αποθήκευσης των αιμοπεταλίων σχετίζεται άμεσα με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία τους η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μη σωστή λειτουργία τους (Villarroel et.al., 2013).

### **3.2.1 Αποθηκευτικές βλάβες αιμοπεταλίων που σχετίζονται με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία**

Η βιοενέργεια των μιτοχονδρίων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της καλής λειτουργίας των αιμοπεταλίων. Το ATP που παράγεται από μιτοχονδριακά κύτταρα παρέχει την κύρια πηγή ενέργειας για τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας και της λειτουργίας των αιμοπεταλίων τόσο *in vivo* όσο και κατά την αποθήκευση. Τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια παρουσιάζουν δραματική μείωση της μιτοχονδριακής αναπνοής σε συνδυασμό με αυξημένη παραγωγή ROS, αυξημένη απόπτωση και μειωμένη λειτουργική ικανότητα. Η παρατηρούμενη μείωση στην αναπνευστική και κυτταρική λειτουργία των αιμοπεταλίων ξεκινάει μέσα στις 2 πρώτες ημέρες αποθήκευσης.

Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων μπορεί ανεξάρτητα να αυξήσει την παραγωγή ROS. Η παραμονή των αιμοπεταλίων χωρίς ανάδευση έχει σχετιστεί με την υποξία και την μειωμένη διανομή οξυγόνου, η οποία ενεργοποιεί την παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, η αυξημένη παραγωγή οξυγόνου κατά την υποξία μπορεί να διεγείρει επιπλέον την παραγωγή ROS από την κυτταρολυτική οξειδάση NADPH. Αυτή η αύξηση στο ROS μπορεί να προκαλέσει το άνοιγμα των διαύλων καλίου των μιτοχονδρίων, που είναι ευαίσθητοι στο ATP, προκαλώντας περισσότερη παραγωγή ROS, διαιωνίζοντας έτσι έναν φαύλο κύκλο. Επίσης, η αυξημένη παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό ενός διαπερατού πόρου μεταπτώσεως των μιτοχονδρίων, της απώλειας του κυτοχρώματος C και στην αυξημένη απόπτωση. Από την άλλη πλευρά, η παραγωγή ROS μπορεί να είναι ένας βασικός ενδοκυτταρικός ρυθμιστής στην ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, με πρωταρχικό ρόλο να διαδραματίζει η οξειδάση NADPH (Villarreal et.al., 2013).

Οι σημερινές συνθήκες αποθήκευσης των αιμοπεταλίων μπορούν να προάγουν την απόπτωση των αιμοπεταλίων. Αν και η απόπτωση είναι ένας μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε πυρηνικά κύτταρα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης να υποβληθούν σε αυτή τη διαδικασία παρά το γεγονός ότι είναι κυτταρικά θραύσματα. Η έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ενεργοποίησης αιμοπεταλίων σε διάφορα πειράματα, εντούτοις η έκφρασή της σε αποθηκευμένα αιμοπετάλια συνδέεται στενά με την ενεργοποίηση της απόπτωσης και της δυσλειτουργίας των αιμοπεταλίων. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των PLTs, η έκθεση σε φωσφατιδυλοσερίνη σχετίζεται με διάφορα αποπτωτικά συμβάντα, συμπεριλαμβανομένης της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C, της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και της διέγερσης της Rho κινάσης-1. Επειδή τα αιμοπετάλια που εκφράζουν

φωσφατιδυλσερίνη απομακρύνονται ταχέως από την κυκλοφορία του αίματος, εκείνα που φυλάσσονται με τις συμβατικές μεθόδους αποθήκευσης μπορεί επίσης να κινδυνεύουν από άμεση κάθαρση in vitro, μειώνοντας έτσι τη συνολική αποτελεσματικότητα της μετάγγισης τους (Villarreal et.al., 2013).

### **3.2.2 Μεταβολικές βλάβες αιμοπεταλίων**

Οι αποθηκευτικές βλάβες των αιμοπεταλίων θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα ενός συνδυασμού διαφόρων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων συλλογής, επεξεργασίας, αποθήκευσης και χειρισμού μετά τη συλλογή. Οι βλάβες αυτές προκαλούν προβλήματα στη μορφολογία, τον μεταβολισμό, τη φυσιολογική ενεργοποίηση και την απελευθέρωση κοκκίων των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα τη μη σωστή λειτουργία τους κατά την αποθήκευση (Chernoff and Snyder, 1992).

Όσον αφορά τις μεταβολικές βλάβες των PLTs έχει παρατηρηθεί μια σταθερή κατανάλωση γλυκόζης ταυτόχρονα με μια σταθερή απελευθέρωση γαλακτικού οξέος. Η συσσώρευση αυτή του γαλακτικού οξέος προκαλεί μεταβολική οξέωση μειώνοντας έτσι τον αριθμό του pH γεγονός που με τη σειρά του, αναστέλλει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων και προάγει κατώτερης ποιότητας PLTs.

Μελέτες έχουν δείξει ότι κατά την αποθήκευση των αιμοπεταλίων, συμβαίνει μια συνεχής ανταλλαγή μεταβολιτών μεταξύ του εξωκυτταρικού και του ενδοκυτταρικού τους περιβάλλοντος. Τα PLTs χρησιμοποιούν μεταβολίτες πλάσματος για να διατηρήσουν το μεταβολισμό τους όπως η γλυκόζη και η γλουταμίνη. Επιπλέον με την πάροδο του χρόνου παρατηρήθηκε μια αυξημένη συσσώρευση αρκετών μεταβολιτών όπως γαλακτικό, μηλικό και σουκινικό οξύ καθώς και υποξανθίνη, ινοσίνη και ξανθίνη (Paglia et.al., 2014).

Η κατανάλωση και η έκκριση των περισσότερων αυτών μεταβολιτών δεν παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Κατά την πρώτη ημέρα αποθήκευσης καταναλώνεται περίπου 1 mmol /L γλυκόζη ενώ εκκρίνονται περίπου 2 mmol /L γαλακτικό. Από την 1η έως την 6η ημέρα, η μέση κατανάλωση γλυκόζης μειώνεται φθάνοντας περίπου 0,6 mmol /L/ ημέρα, ενώ η απελευθέρωση γαλακτικού φτάνει περίπου 1,2 mmol /L/ ημέρα.

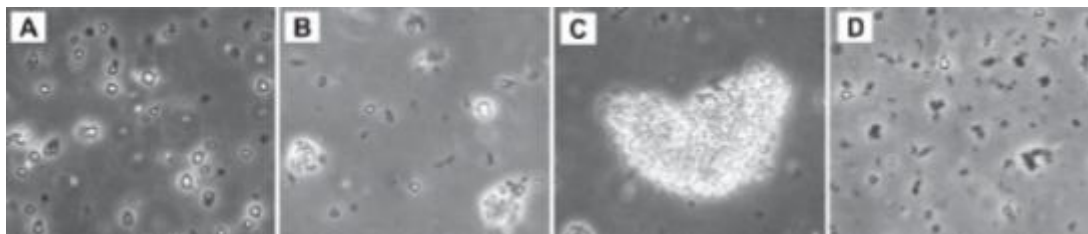
Συνοπτικά, ο μεταβολικός φαινότυπος για τα αποθηκευμένα για μικρό χρονικό διάστημα PLTs παρουσιάζει μειωμένη λειτουργία του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος και τη συσσώρευση προϊόντων αποικοδόμησης ATP. Το χαρακτηριστικό αυτού του φαινοτύπου είναι η συσσώρευση σουκινικού, υποξανθίνης, μηλικού, ξανθίνης και ινοσίνης στο διάλυμα αποθήκευσης. Σε περίσσεια γλυκόζης, μπορεί να συμβεί αναστολή της οξειδωτικής

φωσφορυλίωσης με σκοπό να ρυθμιστούν τα μιτοχονδριακά και κυτοσολικά οξειδωτικά μονοπάτια.

Τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παρουσιάζουν μέτρια λειτουργία του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος αλλά και του μεταβολισμού, γεγονός το οποίο αντισταθμίζει την εξάντληση του ενδοκυτταρικού ATP. Αυτή η αντιστάθμιση είναι σε θέση να διατηρήσει το μεταβολισμό των PLTs μέχρι την 6η ημέρα, μέχρι που τα αιμοπετάλια αρχίζουν να παρουσιάζουν μεγαλύτερη φθορά γεγονός που οδηγεί σε λύση κυττάρων και συσσώρευση αρκετών μεταβολιτών στο μέσο αποθήκευσης (Paglia et.al., 2014).

### 3.2.4 Μορφολογικές και μεμβρανικές βλάβες αιμοπεταλίων

Στην κλινική πρακτική, η μορφολογία των αιμοπεταλίων είναι ο καλύτερος δείκτης όσον αφορά την ικανότητα των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων να παραμείνουν στην κυκλοφορία. Τα αιμοπετάλια που συλλέγονται και αποθηκεύονται σε διάλυμα κιτρικού διατηρούν το δισκοειδές τους σχήμα, εμφανίζοντας όμως σε ορισμένες περιπτώσεις κοιλότητες οι οποίες παρατηρούνται στα αρχικά στάδια ενεργοποίησής τους. Η δισκοειδής αυτή εμφάνιση των αιμοπεταλίων αλλοιώνεται βαθμιαία όταν αυτά αποθηκεύονται στους 22°C ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται μια αύξηση στον αριθμό των μικροσωματιδίων γεγονός που προκύπτει από τον διαχωρισμό των κοιλοτήτων και τον κατακερματισμό της κυτταρικής μεμβράνης. Μετά από 5 έως 7 ημέρες αποθήκευσης στους 22°C σχεδόν όλα τα αιμοπετάλια που έχουν pH χαμηλότερο από το επιτρεπόμενο (<6,4) και είναι είτε σφαιρικά είτε σε θρυμματισμένες μορφές. Συμπερασματικά τόσο το μέγεθος όσο και η ικανότητα συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων μειώνονται ραγδαία κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, αν και έχει αποδειχθεί ότι η επαναιώρηση τους σε φρέσκο πλάσμα μπορεί να αναστρέψει αυτή την κατάσταση (Seghatchian & Krailadsiri, 1997).



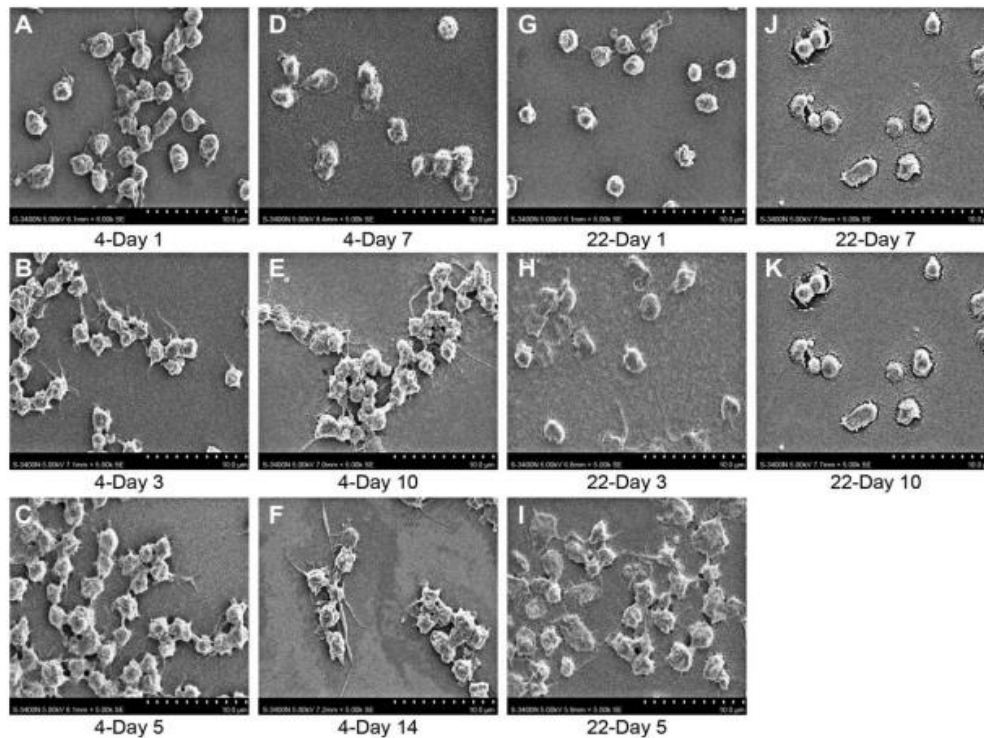
Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτικές εικόνες αντίθετης φάσης οι οποίες παρουσιάζουν την μορφολογία των αιμοπεταλίων σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης σε PRP. Στην εικόνα A) Τα αιμοπετάλια εμφανίζονται με δισκοειδή μορφολογία αμέσως μετά τη συλλογή του αίματος (αδρανή PLTs), στην εικόνα B) και C) Φαίνεται ο σχηματισμός μικρών και μεγάλων συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων και στην D) Φαίνονται τα υπολείμματα των PLTs μετά από 4 - 24 ώρες αποθήκευσης. (Η κλίμακα της εικόνας αντιστοιχεί σε 25 μm). . Η περιγραφή προέρχεται από την εικόνα 4 της πηγής: (Braune et.al, 2014).

## **4. Φυσιολογία των παγωμένων αιμοπεταλίων**

### **4.1 Αλλαγή στην μορφολογία των αιμοπεταλίων κατά την ψύξη**

Φυσιολογικά τα αιμοπετάλια βρίσκονται στην κυκλοφορία έχοντας δισκοειδές σχήμα το οποίο κατά την ενεργοποίησή τους από ενδογενείς παράγοντες υπόκειται σε διάφορες μορφολογικές αλλαγές. Η αναδόμηση αυτή των αιμοπεταλίων είναι μια αρκετά σημαντική διαδικασία που τους επιτρέπει να επεκτείνουν την επιφάνειά τους, το γεγονός αυτό αυξάνει την πιθανότητα πρόσδεσης των υποδοχέων των αιμοπεταλίων αυξάνοντας έτσι την αποδοτικότητα τους κατά την διαδικασία της αιμόστασης. Εκτός από αυτές τις αλλαγές που συμβαίνουν στην μορφολογία τους κατά την ενεργοποίησή τους έχει βρεθεί πως εξίσου σημαντικές μεταβολές συμβαίνουν και κατά την αποθήκευσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Η αλλαγή στην μορφολογία των αιμοπεταλίων που συμβαίνει όταν αυτά εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες σχετίζονται με την απώλεια του περιφερειακού δακτυλίου μικροσωληνίσκων τους. Φαινομενικά η μορφολογική αλλαγή των αιμοπεταλίων είναι ίδια είτε πρόκειται για ενεργοποίησή τους από παράγοντες συσσωμάτωσης είτε από την ψύξη τους, παρόλα αυτά η ενδοκυτταρική αλλαγή που συμβαίνει είναι τελείως διαφορετική για κάθε περίπτωση. Η βασική διαφορά είναι ότι τα παγωμένα αιμοπετάλια διατηρούν σε τυχαίες θέσεις τα οργανίδια τους παρά την έλλειψη του δικτύου μικροσωληνίσκων ενώ τα ενεργοποιημένα από παράγοντες συσσωμάτωσης αιμοπετάλια διατηρούν τα οργανίδια τους στο κέντρο τους όπου περιβάλλονται από μικροσωληνίσκους (Getz, Todd M., 2019).



Εικόνα 6. Αποτελέσματα ύστερα από παρατήρηση της επιφάνειας των αιμοπεταλίων όταν αυτά αποθηκεύτηκαν στους 4oC και στους 22oC. (A-F) Αποτελέσματα της επιφάνειας των PLTs που ήταν αποθηκευμένα στους 4oC για τις ημέρες 1,3,5,7,10 και 14. (G-K) Αποτελέσματα της επιφάνειας των PLTs που ήταν αποθηκευμένα στους 22oC για τις ημέρες 1,3,5,7 και 10 (Yang et.al., 2018).

## 4.2 Ψύξη και διαρροή ασβεστίου

Κατά την διαδικασία της ψύξης τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους και εκθέτουν στην επιφάνειά τους φωσφατιδυλσερίνη. Η ενεργοποίηση αυτή των αιμοπεταλίων η οποία πραγματοποιείται κατά την ψύξη τους είναι πιθανόν να οφείλεται σε αύξηση του ενδοκυτταρικού τους ασβεστίου. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αυξάνεται το ενδοκυτταρικό ασβέστιο στα παγωμένα αιμοπετάλια δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός και είναι πιθανό να εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες.

Μια λογική εξήγηση είναι να υπάρχει διαρροή ασβεστίου από το οργανίδιο στο οποίο είναι αποθηκευμένο το ασβέστιο, υπάρχει επίσης μεγάλη πιθανότητα η μεμβράνη των αιμοπεταλίων να γίνεται παροδικά διαπερατή καθώς τα αιμοπετάλια υφίστανται μια μετάβαση σε λιπιδιακή φάση κατά την διάρκεια της διαδικασίας ψύξης. Όσον αφορά την λιπιδιακή μεμβράνη των αιμοπεταλίων, η αποδόμησή της κατά την ψύξη, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια σειρά γεγονότων τα οποία περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C, της ινοσιτόλης 1 και της 4,5-τριφωσφατάσης με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ασβεστίου. Επιπλέον είναι πιθανό να μειώνεται η ενεργότητα των αντλιών ασβεστίου όταν εκτίθενται σε χαμηλές

θερμοκρασίες με αποτέλεσμα την αργή συσσώρευση ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Μια τελευταία υπόθεση αναφέρει ότι τα μόρια και πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνα για την δέσμευση ασβεστίου επηρεάζονται από τις χαμηλές θερμοκρασίες και έχοντας ως συνέπεια να υπάρχει μειωμένη δυνατότητα δέσμευσης ασβεστίου (Getz, Todd M., 2019).

### **4.3 Μιτοχόνδρια και καταστολή του μεταβολικού ρυθμού των αιμοπεταλίων κατά την ψύξη**

Τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της σωστής λειτουργίας των αιμοπεταλίων. Εκτιμάται ότι το 85% της ενέργειας σε ένα αιμοπετάλιο που βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας παράγεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Τα μιτοχόνδρια τροφοδοτούν τα αιμοπετάλια με ενέργεια για πολλές διεργασίες τους, ενώ ταυτόχρονα εμπλέκονται και σε μονοπάτια που δεν απαιτείται ενέργεια αλλά και στην απόπτωση αυτών.

Μελέτες αναφέρουν ότι τα αιμοπετάλια που είναι αποθηκευμένα στο κρύο μειώνουν τόσο την χρήση γλυκόζης όσο και την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε σχέση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης της γλυκόζης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος και στην λειτουργία και την ζωτικότητα των αιμοπεταλίων καθώς μέσω αυτής της διαδικασίας μειώνεται το pH κάτω από τα επιτρεπτά επίπεδα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η ψύξη τους μειώνει τις μεταβολικές τους ανάγκες κατά την αποθήκευση και συμβάλλει στην διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας έτσι ώστε να έχουν καλύτερη απόδοση με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Getz, Todd M., 2019).

Ο μεταβολισμός των αιμοπεταλίων μέσω της γλυκολυτικής οδού περιλαμβάνει την διάσπαση γλυκόζης με αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος, ελεύθερων ιόντων υδρογόνου, διοξειδίου του άνθρακα και νερό. Το γαλακτικό οξύ προσδίδει ενέργεια στα μιτοχόνδρια και προάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Σύμφωνα με πειράματα που αφορούν την βασική παραγωγή ROS στα αιμοπετάλια, βρέθηκε ότι τα αιμοπετάλια που έχουν ψυχθεί παρουσιάζουν μειωμένη ενδοκυτταρική παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου σε σχέση με αυτά που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον τα ψυχθέντα αιμοπετάλια διατηρούν την ικανότητά τους να παράγουν περισσότερες ρίζες ελεύθερου οξυγόνου σε απόκριση θρομβίνης. Όλα αυτά τα στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αποθήκευση των αιμοπεταλίων στο 4°C δίνουν στα αιμοπετάλια την ικανότητα να μπορούν να δημιουργήσουν μια οξειδωτική έκρηξη. Αυτό



αποτελεί μια σημαντική ικανότητα των ψυχθέντων αιμοπεταλίων αφού η ενεργοποίηση παραγωγής ROS βοηθά στην περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συμβάλλοντας στην έκθεση φωσφατιδυλσερίνης, μια ενέργεια που έχει ιδιαίτερη σημασία στην ενεργοποίηση της πήξης (Getz, Todd M., 2019).

## **5. Παγωμένα αιμοπετάλια**

### **5.1 Παγωμένα αιμοπετάλια και τραύματα**

Έρευνες αναφέρουν ότι τα δύο τρίτα των μεταγγίσεων των αιμοπεταλίων που πραγματοποιούνται στην ιατρική πράξη γίνονται με σκοπό να προφυλάξουν τους ασθενείς από τυχόν αιμορραγίες, ενώ το υπόλοιπο ένα τρίτο χρησιμοποιείται για την θεραπεία ενεργής αιμορραγίας. Αυτές οι δύο χρήσεις των αιμοπεταλίων, τόσο η θεραπευτική όσο και η προφυλακτική, αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικούς σκοπούς και επομένως απαιτούν την χρήση προϊόντων με διαφορετικά χαρακτηριστικά που να ανταποκρίνονται στις ανάγκες της εκάστοτε χρήσης. Τα χαρακτηριστικά αυτά, όσον αφορά τα αιμοπετάλια μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με τις μεθόδους επεξεργασίας που υφίστανται όπως ο τρόπος συλλογής του προϊόντος, ο τρόπος επεξεργασίας αλλά και οι συνθήκες αποθήκευσής τους. Οι συνδυασμοί μεθόδων παραγωγής αιμοπεταλίων θα οδηγήσουν στην δημιουργία ποικίλων προϊόντων με διαφορετική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια το καθένα, επιτυγχάνοντας έτσι την κάλυψη μεγάλου εύρους κλινικών αναγκών.

Συγκεκριμένα τα παγωμένα αιμοπετάλια υφίστανται πολλές βιοχημικές και λειτουργικές αλλαγές με κυριότερη την βελτιωμένη αιμοστατική δραστηριότητά τους, η οποία οφείλεται στην μείωση του μεταβολικού του ρυθμού και μπορεί να βελτιστοποιήσει την θεραπεία ασθενών με αιμορραγίες. Επιπλέον αλλαγές που προκαλούνται κατά την αποθήκευση των αιμοπεταλίων στους 4°C είναι το γεγονός ότι παρουσιάζουν μειωμένη πιθανότητα βακτηριακής μόλυνσης κατά την αποθήκευση σε σχέση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται στους 22°C, περιορίζοντας έτσι τον κίνδυνο μόλυνσης του ασθενή από το προϊόν της μετάγγισης. Τέλος τα ψυχρά αιμοπετάλια μπορούν να διατηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και να αυξήσουν την διάρκεια ζωής τους σε 10-15 ημέρες (Shea et.al., 2019) .

Το αιμορραγικό σοκ αποτελεί μια κατάσταση η οποία απαιτεί την άμεση μετάγγιση είτε εντός του νοσοκομείου είτε εκτός αυτού, ερυθρών αιμοσφαιρίων, πλάσματος και αιμοπεταλίων με σκοπό την αναζωογόνηση του τραύματος και την διόρθωση των αιμοστατικών μηχανισμών. Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην θετική

έκβαση ασθενών με ενεργή αιμορραγία, όμως η αποθήκευση τους σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχόμενη ανάδευση προκαλεί ποικίλα προβλήματα. Αυτά αφορούν τόσο στην ποσότητα των αποθεμάτων καθώς υπάρχει μεγάλη πιθανότητα βακτηριακής μόλυνσης που έχει σαν αποτέλεσμα να έχουν μειωμένο χρόνο ζωής όσο και στην μεταφορά τους όταν πρόκειται για άμεση μετάγγιση που γίνεται εκτός του χώρου του νοσοκομείου. Ένα διετές πείραμα (Νοέμβριος 2013 - Οκτώβριος 2015) ξεκίνησε με σκοπό να συγκρίνει τα παγωμένα αιμοπετάλια και τα αιμοπετάλια που έχουν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου σε ασθενείς με εκτεταμένη αιμορραγία (Stubbs et.al., 2017).

Στην έρευνα αυτή αναφέρεται ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου έχουν μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης μέσα στον οργανισμό και βοηθούν να αποκατασταθεί γρηγορότερα ο αριθμός των PLTs, οι ιδιότητες τους αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες όσον αφορά την χρήση τους σε θρομβοπενικούς ασθενείς και σε περιπτώσεις όπου χορηγούνται αιμοπετάλια για προληπτικούς λόγους. Παρόλα αυτά η ανταπόκριση τους σε περιπτώσεις εκτεταμένης αιμορραγίας φαίνεται να μην είναι άμεση πράγμα που δυσχεραίνει την κατάσταση των ασθενών. Αντίθετα τα παγωμένα αιμοπετάλια έχουν μειωμένο χρόνο ζωής στον οργανισμό των ασθενών ενώ, δεν αποκαθιστούν άμεσα τον αριθμό των αιμοπεταλίων στο αίμα αλλά φαίνεται να έχουν αυξημένη αιμοστατική δραστηριότητα ενώ ταυτόχρονα είναι πιο εύκολη η μεταφορά τους εκτός του χώρου του νοσοκομείου δίνοντας έτσι την δυνατότητα αντιμετώπισης της αιμορραγίας σε ταχύτατο χρόνο (Stubbs et.al., 2017).

Τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται στους 4 °C φαίνεται να αναπτύσσουν θρόμβους μέσα στα δοχεία αποθήκευσης μετά από 3 ημέρες πράγμα το οποίο οφείλεται σε έναν ενδοκυτταρικό μηχανισμό ο οποίος εξαρτάται από το ασβέστιο και προκαλεί ενεργοποίηση μικρών ποσοστών της γλυκοπρωτεΐνης IIb-IIIa. Η ενεργοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης αυτής σε ασκούς που περιέχουν φυσιολογικές ποσότητες ινωδογόνου προκαλεί την δημιουργία συσσωματώματος αιμοπεταλίων. Για την αποφυγή του προβλήματος αυτού φαίνεται να συμβάλει το προσθετικό διάλυμα (PAS) σαν συστατικό στους ασκούς των αιμοπεταλίων καθώς διαλύει το ινωδογόνο σε ποσοστά τα οποία δεν επιτρέπουν την συσσωμάτωση ενώ ταυτόχρονα δεν αυξάνει τον αριθμό των μικροσωματιδίων αλλά ούτε και την έκφραση της P- σελεκτίνης και της φωσφατιδυλσερίνης σε σχέση με τα αιμοπετάλια που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία 22 °C με PAS. Επιπλέον τα αιμοπετάλια που βρίσκονται σε θερμοκρασίες 1-6 °C σε συνδυασμό με το διάλυμα PAS εμφανίζουν μειωμένες μεταβολικές απαιτήσεις με αποτέλεσμα να μπορούν να διατηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα

(έως και δέκα μέρες) και αυτό χωρίς να ελλοχεύουν κινδύνους βακτηριακής τους μόλυνσης και συνεπώς αποτελούν ένα ασφαλέστερο προϊόν.

Τα παραπάνω πλεονεκτήματα δείχνουν πως η αποθήκευση των αιμοπεταλίων στους 1-6 °C θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, ξεκινώντας από ασθενείς με αιμορραγικό σοκ, σε ένα ευρύ φάσμα και να συμβάλλει στην δημιουργία ενός ασφαλούς προϊόντος που θα έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να δοθεί λύση σε προβλήματα όπως αυτό της μεταφοράς των αιμοπεταλίων σε απομακρυσμένες περιοχές αλλά και στην άμεση αντιμετώπιση ασθενών με εκτεταμένα τραύματα τόσο λόγω της αυξημένης αιμοστατικής δραστικότητάς τους όσο και στο γεγονός ότι μπορούν να μεταφερθούν ευκολότερα στο σημείο τραυματισμού. Ενώ ταυτόχρονα μπορεί να συμβάλλει στην μείωση της έλλειψης αποθεμάτων και σπατάλης αυτών λόγω της αυξημένης πιθανότητας βακτηριακής μόλυνσης των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (Stubbs et.al., 2017).

## **5.2 Παγωμένα αιμοπετάλια και αδρανοποίηση της βακτηριακής μόλυνσης**

Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων στους 1-6 °C παρατείνει την διάρκεια ζωής τους μέχρι και 21 ημέρες. Αυτό οφείλεται στην μείωση του μεταβολικού τους ρυθμού με αποτέλεσμα την μείωση κατανάλωσης της γλυκόζης, μειωμένη παραγωγή γαλακτικού οξέος και διατήρηση του pH στις επιτρεπτές τιμές. Ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και ο κίνδυνος από βακτηριακή μόλυνση καθιστώντας το προϊόν ασφαλέστερο ιδιαίτερα όσον αφορά την πιθανότητα σήψης του ασθενή μετά την μετάγγιση.

Το πρόβλημα της βακτηριακής μόλυνσης των αιμοπεταλίων αποτελεί ένα μεγάλο εμπόδιο στην ιατρική πράξη και είναι ο κύριος παράγοντας περιορισμού της διάρκειας ζωής των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Η κύρια πηγή μόλυνσης του προϊόντος, παρά το γεγονός ότι η διαδικασία γίνεται κάτω από άσηπτες συνθήκες και ύστερα από απολύμανση της περιοχής, είναι από το δέρμα του δότη με την νύξη της βελόνας. Κάτω από ιδανικές συνθήκες όλα τα παθογόνα βακτήρια θα εντοπίζονταν κατά την διάρκεια του screening test ή κατά την διαδικασία επιλογής του δότη με την χρήση ερωτηματολογίου. Παρόλα αυτά η διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων δεν επιτρέπει να υπάρχει ένα απόλυτα ασφαλές χρονικό διάστημα ώστε να μπορούν να εμφανιστούν τυχόν βακτηριακές μολύνσεις. Επιπλέον, άλλοι παράγοντες που δεν επιτρέπουν τον πλήρη έλεγχο των αιμοπεταλίων είναι, το γεγονός ότι εμφανίζονται διαρκώς καινούριοι παθογόνοι μικροοργανισμοί, τα πρωτόκολλα ελέγχου διαφέρουν από χώρα σε χώρα, ενώ ταυτόχρονα

υπάρχουν περιορισμοί που αφορούν το ίδιο το screening test το οποίο μπορεί να δώσει σε ορισμένες περιπτώσεις είτε ψευδώς θετικά είτε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα να ελλοχεύει ο κίνδυνος μετάγγισης μολυσμένων αιμοπεταλίων προκαλώντας συμπτωματική σήψη (Waters et.al., 2018).

### 5.2.1 Μηχανισμοί αδρανοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών

Οι μηχανισμοί αδρανοποίησης των παθογόνων μικροοργανισμών περιλαμβάνουν την έκθεση των αιμοπεταλίων σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) με ή χωρίς την προσθήκη φωτοευαίσθητου παράγοντα. Με αυτό τον τρόπο καταστρέφουν τα νουκλεϊκά οξέα των παθογόνων μικροοργανισμών, μειώνοντας την παραγωγή πρωτεϊνών και την αντιγραφή των κυττάρων καθιστώντας τους αδρανείς. Οι τρεις μηχανισμοί αδρανοποίησης είναι οι ακόλουθοι «INTERCEPT Blood System», «Mirasol Pathogen Reduction Technology System» και «THERAFLEX UV-Platelets System», με του δύο πρώτους να έχουν ευρεία εφαρμογή σε πολλές χώρες. Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί έχουν ως κοινό στόχο την αδρανοποίηση των παθογόνων παρόλα αυτά οι μέθοδοι με τους οποίους δρουν διαφέρουν τόσο ως προς το μήκος κύματος της ακτινοβολίας UV όσο και ως προς τον φωτοευαίσθητο παράγοντα που χρησιμοποιούν (Waters et.al., 2018).

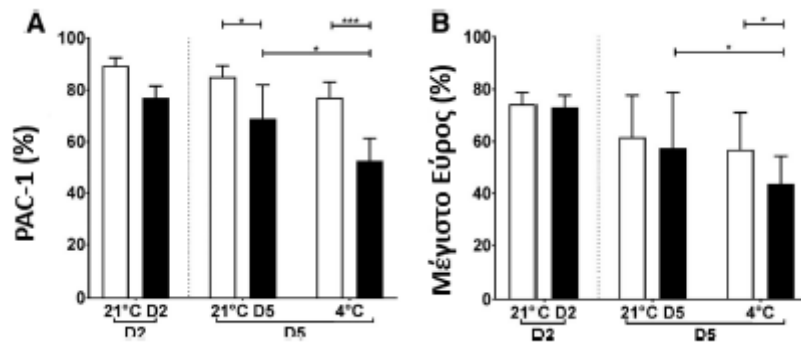
Αναλυτικά η κάθε μέθοδος λειτουργεί όπως αναφέρεται παρακάτω:

- **INTERCEPT** : χρησιμοποιείται ακτινοβολία UVA μήκους κύματος 320-400 nm σε συνδυασμό με τον φωτοευαίσθητο παράγοντα αμοτοσαλένιο, το οποίο κατά την έκθεση του στο φως συνδέεται μη αναστρέψιμα με το DNA/RNA (Waters et.al., 2018).
- **MIRASOL** : χρησιμοποιεί ένα ευρύ φάσμα ακτινοβολίας UVA/UVB μήκους κύματος 280-360 nm με την παρουσία του φωτοευαίσθητου παράγοντα ριβοφλαβίνη. Η αλληλεπίδραση της ριβοφλαβίνης με το νουκλεϊκό οξύ κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία οδηγούν στην οξείδωση του και την θραύση των κλώνων εμποδίζοντας έτσι την αντιγραφή και την διόρθωση αυτών (Waters et.al., 2018).
- **THERAFLEX** : χρησιμοποιεί ακτινοβολία UV μήκους κύματος 200-280 με δυνατή ανάδευση έτσι ώστε να διασφαλιστεί η διάχυση της ακτινοβολίας σε ολόκληρο το προϊόν, ενώ δεν χρησιμοποιείται κάποιος φωτοευαίσθητος παράγοντας. Με την μέθοδο αυτή δημιουργούνται πυριμιδίνες κυκλοβουτανίου και διμερή πυριμιδόνης τα οποία αναστέλλουν την επιμήκυνση του νουκλεϊκού οξέος κατά την διάρκεια της μεταγραφής του (Waters, et al., 2018).

## 5.2.2 Μέθοδος Intercept και παγωμένα αιμοπετάλια

Πολλά πειράματα έχουν δείξει ότι η χρήση της μεθόδου INTERCEPT με τον φωτοευαίσθητο παράγοντα αμοτοσαλένιο (AS-PCT), προκαλεί μεταβολές στην λειτουργία των αιμοπεταλίων όταν αυτά αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αλλαγές αυτές αφορούν την μεταγραφή γονιδίων, τον μεταβολισμό των αιμοπεταλίων καθώς και την δημιουργία θρόμβου. Παρόλα αυτά η μελέτη της αλληλεπίδρασης των ψυχθέντων αιμοπεταλίων με την χρήση του AS-PCT δεν είχε μελετηθεί μέχρι πρόσφατα. Μια μελέτη που διεξάχθηκε το έτος 2019 από τους ερευνητές είχε ως στόχο να αναλύσει τις επιπτώσεις που έχει η χρήση AS-PCT σε παγωμένα αιμοπετάλια όσον αφορά την λειτουργία τους και τα χαρακτηριστικά τους (Six et.al., 2019).

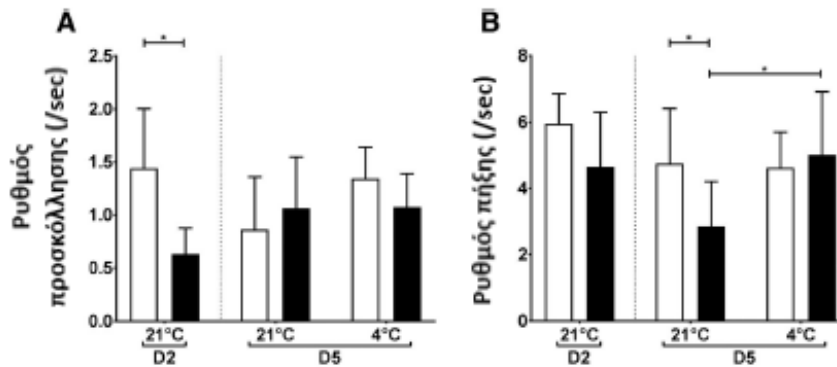
### Συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και ενεργοποίηση ιντεκρίνης



Εικόνα 7. Ενεργοποίηση και συσσωμάτωση παγωμένων PLTs. (Α) Το ποσοστό των PLTs που εκφράζουν την ενεργοποιημένη ιντεκρίνη  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 σε απόκριση 32,5  $\mu$ mol / L TRAP6 (ο προσδιορισμός έγινε με βάση την δέσμευση PAC-1). (Β) Μέγιστο εύρος (%) της συσσωμάτωσης των PLTs σε απόκριση 10  $\mu$ g / mL κολλαγόνου. ■ Μαύρη στήλη: PLTs μετά την χρήση AS-PCT, □ Ασπρη στήλη: PLTs χωρίς χρήση AS-PCT, D2: PLTs πριν την αποθήκευση, D5: PLTs 3 μέρες μετά την αποθήκευση (Six et.al., 2019).

Για τα παγωμένα αιμοπετάλια τα οποία έχουν υποστεί την χρήση AS-PCT η ενεργοποίηση της ιντεκρίνης μειώθηκε σε απόκριση του υποδοχέα θρομβίνης TRAP6 ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε και η συσσωμάτωση τους σε απόκριση στο κολλαγόνο (Six et.al., 2019).

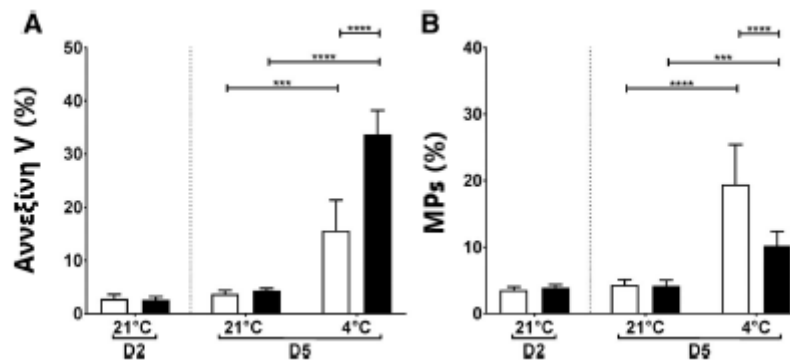
## Ρυθμός προσκόλλησης και πήξης



Εικόνα 8. Προσκόλληση και πήξη αιμοπεταλίων σε υδροδυναμικές συνθήκες μετά την ψύξη. Το αίμα ανασυστάθηκε με φθορίζουσα ουσία. (A) Ο ρυθμός προσκόλλησης (/ δευτ.) υποδεικνύει την αύξηση του σήματος φθορισμού των PLT σε συνάρτηση του χρόνου διάχυσης. (B) Ο ρυθμός πήξης (/ sec) υποδηλώνει τη συσσώρευση φθορίζοντος ινώδους σε συνάρτηση του χρόνου διάχυσης. ■ Μαύρη στήλη: PLTs μετά την χρήση AS-PCT, □ Άσπρη στήλη: PLTs χωρίς χρήση AS-PCT, D2: PLTs πριν την αποθήκευση, D5: PLTs 3 μέρες μετά την αποθήκευση (Six et.al., 2019).

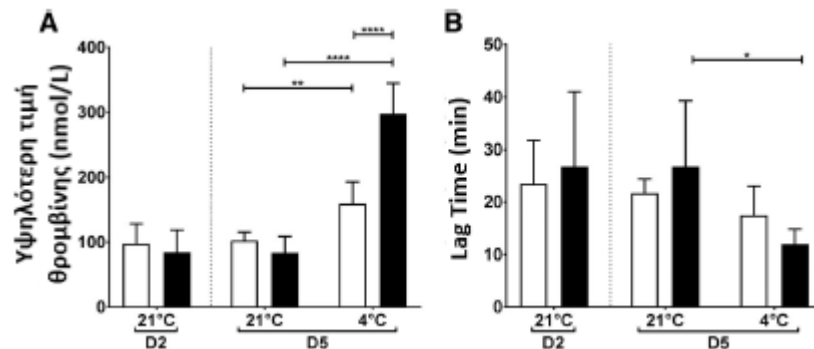
Σε αντίθεση με τα παραπάνω η διαδικασία της πήξης φάνηκε να είναι ταχύτερη, μετά από τρεις μέρες αποθήκευσης, στα παγωμένα αιμοπετάλια με AS-PCT σε σχέση με αυτή των αιμοπεταλίων που είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη έρευνα τα δεδομένα αυτά είναι πιθανόν να καταδεικνύουν μια αλλαγή στην βιοχημεία των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα να πυροδοτούν τους προ-πηκτικούς μηχανισμούς (Six et.al., 2019).

## Έκφραση φωσφατιδυλσερίνης και σχηματισμός μικροσωματιδίων (MP)



Εικόνα 9. Έκφραση φωσφατιδυλσερίνης και σχηματισμός MP σε ψυχρά αποθηκευμένα PLTs. (A) Το ποσοστό των PLTs που συνδέονται με την Αννεξίνη V χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο για την έκφραση αμινοφωσφολιπιδίων.(B) Τα MPs ορίστηκαν ως GPIIb θετικά συμβάντα μικρότερα από 0,9 μm (όριο ανίχνευσης 0,5 μm). Αναφέρεται ο σχετικός αριθμός των MPs στο συνολικό αριθμό GPIIb θετικών συμβάντων. AS-PCT PLTs. ■ Μαύρη στήλη: PLTs μετά την χρήση AS-PCT, □ Άσπρη στήλη: PLTs χωρίς χρήση AS-PCT, D2: PLTs πριν την αποθήκευση, D5: PLTs 3 μέρες μετά την αποθήκευση. ■ Μαύρη στήλη: PLTs μετά την χρήση AS-PCT, □ Άσπρη στήλη: PLTs χωρίς χρήση AS-PCT, D2: PLTs πριν την αποθήκευση, D5: PLTs 3 μέρες μετά την αποθήκευση (Six et.al., 2019).

## Παραγωγή θρομβίνης



Εικόνα 20. Παραγωγή θρομβίνης σε στατικές συνθήκες μετά από αποθήκευση των PLTs στο κρύο. Η παραγωγή θρομβίνης μετρήθηκε στο πλάσμα παρουσία TF και  $50 \times 10^9$  PLTs / L. (A) Υψηλότερη τιμή θρομβίνης (nmol / L), (B) Lag Time (λεπτά). ■ Μαύρη στήλη: PLTs μετά την χρήση AS-PCT, □ Άσπρη στήλη: PLTs χωρίς χρήση AS-PCT, D2: PLTs πριν την αποθήκευση, D5: PLTs 3 μέρες μετά την αποθήκευση (Six et.al., 2019).

### 5.3 Χρήση των παγωμένων αιμοπεταλίων

Η χρήση των παγωμένων αιμοπεταλίων σαν προϊόν μετάγγισης εγκαταλείφθηκε σαν τεχνική την δεκαετία του 1980 λόγω της περιορισμένης επιβιώσής τους στον οργανισμό των ασθενών. Ταυτόχρονα υπόκεινται και σε μια σειρά αποθηκευτικών βλαβών που οφείλεται στην ψύξη, αυτή περιλαμβάνει την αμετάβλητη αλλαγή του δισκοειδούς σχήματός τους, την απόπτωση και την ενεργοποίησή τους κατά την αποθήκευση.

Παρόλα αυτά το γεγονός της πρώιμης αυτής ενεργοποίησής τους τα καθιστά πιο αποτελεσματικά στην επίτευξη της αιμόστασης σε σχέση με τα αιμοπετάλια που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου. Πολλά πειράματα που έχουν διεξαχθεί *in vitro* έχουν αποδείξει ότι τα παγωμένα αιμοπετάλια έχουν αυξημένη λειτουργικότητα όσον αφορά την προσκόλλησή τους και την δημιουργία συσσωματώματος, γεγονός που σχετίζεται με την μείωση της αιμορραγίας. Επιπλέον τα παγωμένα αιμοπετάλια μειώνουν τις πιθανότητες βακτηριακής μόλυνσης, δεν χρειάζονται συνεχή ανάδευση ενώ ταυτόχρονα περιέχουν λιγότερο ποσοστό φλεγμονωδών μεσολαβητών σε σχέση με τα αιμοπετάλια που είναι σε θερμοκρασία δωματίου (Milford et.al, 2016).

Είναι ξεκάθαρο ότι η επίτευξη πρώιμης αιμόστασης (εντός των πρώτων τριών ωρών μετά από σοβαρό τραυματισμό) είναι το βασικό σημείο για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της μαζικής αιμορραγίας. Πολλές μελέτες έχουν δείξει βελτιωμένα αποτελέσματα σε ασθενείς με αιμορραγία στους οποίους χορηγήθηκαν αιμοπετάλια. Αυτό οδήγησε στην έρευνα για βελτιωμένα πρωτόκολλα χρήσης των προϊόντων του αίματος.

Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου (20–24 °C) με συνεχόμενη ανάδευση έως πέντε ημέρες καθώς υπάρχει κίνδυνος βακτηριακής μόλυνσης του προϊόντος . Πρόσφατα, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) επέτρεψε την παράταση διάρκειας ζωής των αιμοπεταλίων έως επτά ημέρες με προϋπόθεση ότι πριν την χορήγηση τους γίνεται έλεγχος για τυχόν βακτηριακή μόλυνση. Αυτή η μέθοδος αποθήκευσης δημιουργεί πολλά υλικοτεχνικά προβλήματα. Η απαιτούμενη συνεχής ανάδευση των αιμοπεταλίων απαιτεί την χρήση αναδευτήρων οι οποίοι κοστίζουν ακριβά ενώ χρειάζονται και ένα εκτεταμένο σύστημα παρακολούθησης με αποτέλεσμα η χρήση αιμοπεταλίων που διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου να απαιτεί σημαντική οικονομική επιβάρυνση στις τράπεζες αίματος αλλά και στα νοσοκομεία (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

Με βάση αυτά τα δεδομένα προκύπτει το ερώτημα γιατί υιοθετήθηκε αυτή η μέθοδος για τη συντήρηση των αιμοπεταλίων. Η απάντηση σε αυτή την ερώτηση ήρθε από τους Murphy και Gardner το 1969 οι οποίοι σύγκριναν την αποτελεσματικότητα των αιμοπεταλίων, ως προς την επιβίωση τους στην κυκλοφορία των ασθενών, που βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου με αιμοπετάλια τα οποία βρίσκονταν αποθηκευμένα στους 2 - 6 °C. Το αποτέλεσμα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι τα παγωμένα αιμοπετάλια (CSP) είχαν μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε σχέση με τα αιμοπετάλια που βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου (RT-PLTS), δεδομένου λοιπόν του ότι η μελέτη αυτή έγινε σε μία εποχή όπου η μετάγγιση αιμοπεταλίων χρησιμοποιούταν μόνο σε καρκινοπαθείς και σε ασθενείς με θρομβοπενία για προληπτικούς λόγους είναι φανερό πως προτεραιότητα ήταν να χρησιμοποιείται ένα προϊόν με μεγαλύτερη επιβίωση στον οργανισμό.

Αργότερα μελέτες άρχισαν να γίνονται με σκοπό να ελέγξουν την αιμοστατική δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν αιμοπετάλια από ολικό αίμα και αποθηκεύτηκαν τόσο σε θερμοκρασία δωματίου όσο και σε θερμοκρασία 4 °C με συνεχή ανάδευση για 72 ώρες. Τα προϊόντα αυτά χορηγήθηκαν σε θρομβοπενικούς ασθενείς και παρατηρήθηκε ότι η αιμοστατική δραστηριότητα των αιμοπεταλίων που είχαν αποθηκευτεί στους 4 °C ήταν σημαντικά καλύτερη από εκείνη των αιμοπεταλίων που είχαν αποθηκευτεί στους 20 °C (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

Με το πέρασμα των χρόνων, η χρήση των αιμοπεταλίων μετατοπίστηκε. Η χρήση τους για προληπτικούς σκοπούς σε ασθενείς με θρομβοπενία άρχισε σταδιακά να μειώνεται και να αυξάνεται η χρήση τους σε ασθενείς με τραύματα, σε ασθενείς έπειτα από κάποια χειρουργική επέμβαση ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε η ανάγκη παροχής αιμοπεταλίων σε πεδία



μάχης όπου η χρήση ενός προϊόντος με αυξημένη αιμοστατική δραστηριότητα είναι ένα ζήτημα ζωτικής σημασίας. Για τον λόγο αυτό το 2009 χρηματοδοτήθηκε από το Ινστιτούτο Χειρουργικής των Η.Π.Α έρευνα για την αναθεώρηση των προϊόντων που χρησιμοποιούνται στα πεδία της μάχης και έτσι το ενδιαφέρον για την χρήση παγωμένων αιμοπεταλίων άρχισε ξανά να αυξάνεται.

Η επανεξέταση της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων στην ψύξη σαν εναλλακτική μέθοδος αποθήκευσης απαιτεί να γίνει επαναπροσδιορισμός της πειραματικής μεθόδου. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν αιμοπετάλια τα οποία είχαν απομονωθεί με την μέθοδο της αφαίρεσης και όχι από το ολικό αίμα, αυτά αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 2 – 6 °C χωρίς ανάδευση και αντίστοιχα σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχόμενη ανάδευση. Τα προϊόντα αυτά αξιολογήθηκαν σε διάστημα πέντε ημερών (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

Τα δεδομένα από τις έρευνες έδειξαν ότι η ικανότητα δημιουργίας θρόμβου αλλά και η αντοχή αυτού ήταν σημαντικά καλύτερη στα παγωμένα αιμοπετάλια. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν ενθαρρυντικά καθώς το γεγονός ότι δεν απαιτούνταν συνεχόμενη ανάδευση του προϊόντος θα μειώσει σε μεγάλο ποσοστό το υλικοτεχνικό βάρος που χρειάζονται τα αιμοπετάλια για την συντήρησή τους αφού θα μπορούν να διατηρηθούν και να αποθηκεύονται μαζί με άλλα προϊόντα αίματος. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων με την πάροδο του χρόνου οδηγεί στην μείωση της ποιότητας του προϊόντος η οποία έχει ως χαρακτηριστικά της την απώλεια του δισκοειδούς σχήματος των αιμοπεταλίων, την αποκοκκίωσή τους, την γαλακτική οξέωση και την έλλειψη έκφρασης των δεικτών ενεργοποίησής τους. Η διατήρηση αυτών των λειτουργικών χαρακτηριστικών απαιτεί συνεχή παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), όμως τα μεταβολικά υποστρώματα των αιμοπεταλίων εξαντλούνται γρήγορα με την πάροδο του χρόνου όταν αυτά είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος τα μιτοχόνδρια που στερούνται δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της υγείας και της λειτουργίας των αιμοπεταλίων .

Τα μιτοχόνδρια είναι ένα από τα πιο σημαντικά οργανίδια των PLTS και εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως την παραγωγή ATP αλλά και την διαδικασία της απόπτωσης. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι το οξειδωτικό στρες είναι ικανό να προκαλέσει δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ROS γεγονός που οδηγεί στην κυτταρική απόπτωση. Η μιτοχονδριακή αυτή δυσλειτουργία έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει σε μεγαλύτερο βαθμό στα αιμοπετάλια που έχουν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου σε σχέση με τα παγωμένα αιμοπετάλια. Η καλύτερη αυτή διατήρηση του μεταβολικού

ρυθμού των παγωμένων αιμοπεταλίων οδηγεί στην καλύτερη δημιουργία συσσωματώματος στη καλύτερη ενεργοποίηση τους αλλά και στον σχηματισμό ισχυρότερου θρόμβου (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

Εκτός από την δημιουργία θρόμβου για την αναχαίτηση της αιμορραγίας τα αιμοπετάλια είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της καλής λειτουργίας του αγγειακού ενδοθηλίου βοηθώντας να διατηρηθεί η δομή του, με την παραγωγή ενδοθηλιακών κυττάρων. Ακόμα προστατεύουν το ενδοθήλιο «μπλοκάροντας» πιθανά κενά ανάμεσα στα κύτταρα του ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνουν διαλυτούς παράγοντες οι οποίοι εμπλουτίζουν τον ενδοθηλιακό φραγμό. Έρευνες που έγιναν, *in vitro*, για να διαπιστώσουν εάν τα παγωμένα αιμοπετάλια έχουν την ίδια ικανότητα να διατηρήσουν την καλή λειτουργία του επιθηλίου σε σχέση με τα αιμοπετάλια σε θερμοκρασία δωματίου έδειξαν πως τα CSP είχαν ανώτερες επιδόσεις σε σχέση με τα RT-PLTs. Αντίθετα όμως με τα *in vitro* πειράματα τα πειράματα που έγιναν *in vivo* είχαν τελείως διαφορετικά αποτελέσματα δείχνοντας ότι η προστασία που παρέχουν τα παγωμένα αιμοπετάλια στο ενδοθήλιο είναι σημαντικά μειωμένη, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη κάθαρση των CSP από την κυκλοφορία.

Κατά την διαδικασία της μετάγγισης αιμοπεταλίων είναι πιθανό να υπάρξουν ανεπιθύμητες παρενέργειες μια από αυτές είναι η σήψη και το σηπτικό σοκ, και συμβαίνει σε 1 στους 100.000 ανθρώπους που λαμβάνουν αιμοπετάλια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου έχουν μεγάλες πιθανότητες βακτηριακής μόλυνσης, καθώς προκαλείται αύξηση στην παραγωγή λακτόζης από τα PLTs. Η διατήρηση των αιμοπεταλίων σε χαμηλές θερμοκρασίες θα μείωνε το πρόβλημα αυτό καθώς τα περισσότερα βακτήρια δεν επιβιώνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

Στις Η.Π.Α τα παγωμένα αιμοπετάλια χρησιμοποιούνται σαν προϊόν μετάγγισης σε ασθενείς με σοβαρή ενεργή αιμορραγία. Μάλιστα η κλινική Mayo χρησιμοποιεί από το 2015 τα CSP μετά από την έγκριση που πήρε τόσο από τον FDA ( Food and Drug Administration) όσο και από την Αμερικάνικη Ένωση Τραπεζών Αίματος. Η επιτυχία αυτή μάλιστα που παρατηρήθηκε να έχουν τα παγωμένα αιμοπετάλια σε αιμορραγικούς ασθενείς, ώθησε τους κλινικούς ιατρούς να εφοδιάσουν τα αεροσθενοφόρα με το προϊόν.

Επιπλέον μια κλινική δοκιμή που ξεκίνησε στην Νορβηγία το 2015 από τους Strandenes et.al η οποία είχε ως στόχο να διερευνήσει την αποτελεσματικότητα στην μετεγχειρητική θεραπεία ασθενών, των παγωμένων αιμοπεταλίων σε σχέση με τα αιμοπετάλια σε θερμοκρασία δωματίου. Η μελέτη αυτή έδειξε πως δεν προκλήθηκαν ανεπιθύμητες

ενέργειες μετά την μετάγγιση των παγωμένων αιμοπεταλίων, είχαν καλύτερο ρυθμό συσσωμάτωσης ενώ παράλληλα ελαχιστοποιήθηκε και η μετεγχειρητική αιμορραγία στους ασθενείς (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

Μια λύση η οποία προτείνεται από διάφορους ερευνητές έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι τράπεζες αίματος όσον αφορά την διατήρηση των αιμοπεταλίων, έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για θεραπευτικούς σκοπούς όσο και για την αντιμετώπιση ασθενών με σοβαρές αιμορραγίες αλλά και για να μειωθεί το λογιστικό βάρος που δημιουργείται λόγω της μικρής διάρκειας ζωής των αιμοπεταλίων είναι ο συνδυασμός της χρήσης παγωμένων αιμοπεταλίων και αιμοπεταλίων που θα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Μια ομάδα ερευνητών (Wood et.al) παρουσίασε μια νέα συνδυαστική μορφή αποθήκευσης η οποία περιλαμβάνει την αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου έως την ημερομηνία λήξης τους και στην συνέχεια την ψύξη τους. Ο τρόπος αυτός θα δώσει την δυνατότητα στις τράπεζες αίματος να χρησιμοποιούν το προϊόν για προφυλακτικούς σκοπούς σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ακολουθούμενο από μια χρονική περίοδο θεραπευτικής χρήσης παρόλα αυτά χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να διαπιστωθεί εάν αυτό είναι εφικτό (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου είναι μια πρακτική η οποία ακολουθείται εδώ και 30 χρόνια. Όταν εμφανίστηκε η πρακτική αυτή ο κύριος λόγος μετάγγισης των αιμοπεταλίων ήταν σε ογκολογικούς ασθενείς για προφυλακτικούς σκοπούς καθώς είχαν μεγάλη επιβίωση στην κυκλοφορία του αίματος, δίνοντας δευτερεύοντα ρόλο στην αιμοστατική τους λειτουργία (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

Στη σημερινή εποχή όπου έχει αυξηθεί η ανάγκη εύρεσης μιας στρατηγικής ανάνηψης από αιμορραγία η οποία περιλαμβάνει την μετάγγιση αιμοπεταλίων είναι αναγκαίο να αναθεωρηθεί η μεθοδολογία αποθήκευσης των αιμοπεταλίων. Η καλύτερη μέθοδος αποθήκευσης για την επίτευξη αιμόστασης μπορεί να μην είναι και η καλύτερη μέθοδος για ασθενείς που χρησιμοποιούν το προϊόν για προφυλακτικούς σκοπούς, για αυτό το λόγο η δυνατότητα διαχωρισμού των μεθόδων αποθήκευσης των αιμοπεταλίων πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω (Milford et.al, 2016).

## **5.4 Κλινικό όφελος παγωμένων αιμοπεταλίων**

Το ενδιαφέρον για τα παγωμένα αιμοπετάλια έχει επανέλθει κυρίως όσον αφορά την αντιμετώπιση των τραυμάτων και των εκτεταμένων αιμορραγιών λόγω της αυξημένης αιμοστατικής δραστηριότητάς τους. Παρόλο που τα αιμοπετάλια αποτελούν μέρος στα περισσότερα πρωτόκολλα ανάνηψης, η περιορισμένη διάρκεια ζωής τους και η ανάγκη τους για συνεχόμενη ανάδευση αλλά και ο αυξημένος κίνδυνος βακτηριακής μόλυνσης προκαλούν πολλές προκλήσεις στην χρήση τους σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης. Τα παγωμένα αιμοπετάλια προσφέρουν την δυνατότητα να ξεπεραστούν ορισμένοι από τους υλικοτεχνικούς περιορισμούς που δημιουργούν τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου όπως η διαθεσιμότητα για μετάγγιση των ασθενών κατά την διακομιδή τους στο νοσοκομείο, ο περιορισμός σπατάλης των αιμοπεταλίων αλλά και σε στρατιωτικά περιβάλλοντα (Cber, 2019).

Τα παγωμένα αιμοπετάλια αν και ακόμα δεν χρησιμοποιούνται ευρέως, έχουν δείξει ότι μπορούν να βρουν πολλές εφαρμογές σε πολλές κλινικές πρακτικές. Επί του παρόντος εκτιμάται ότι το 67% όλων των αιμοπεταλίων χρησιμοποιούνται για την διαχείριση αιματολογικών κακοηθειών, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό χρησιμοποιείται ως μετεγχειρητική θεραπεία (Scorer et.al., 2019).

### **5.4.1 Θεραπευτική αντιμετώπιση σε κακοήθειες**

Η πλειονότητα των ανθρώπων που χρήζουν άμεσα την ανάγκη για μετάγγιση αιμοπεταλίων είναι οι ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, καθώς οι περισσότεροι από αυτούς παρουσιάζουν θρομβοπενία με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος βαριάς αιμορραγίας. Παράλληλα με την θρομβοπενία οι ογκολογικοί ασθενείς και εκείνοι με αιματολογικές κακοήθειες εμφανίζουν συχνά προθρομβωτικά επεισόδια λόγω της φλεγμονώδους φύσης των κακοηθειών, των αντικαρκινικών φαρμάκων και την υποχρεωτική ύπαρξη φλεβοκαθετήρων σε κεντρικές φλέβες (Scorer et.al., 2019).

Η εμφάνιση θρόμβωσης σε τέτοιες περιπτώσεις αυξάνει την νοσηρότητα και την θνησιμότητα των ασθενών ενώ ταυτόχρονα δυσκολεύει και την σωστή παροχή της αντικαρκινικής θεραπείας. Η χρήση των παγωμένων αιμοπεταλίων σε αυτή την περίπτωση μπορεί να προσφέρει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα αφού τα CSP είναι ικανά να ανταποκριθούν γρηγορότερα στην διαχείριση της αιμορραγίας ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται ταχύτερα από την κυκλοφορία του αίματος μειώνοντας έτσι τις προθρομβωτικές επιπλοκές μετά από κάποιο αιμορραγικό επεισόδιο.

Η χρήση των παγωμένων αιμοπεταλίων στους ασθενείς αυτούς θα μπορούσε να προσφέρει μια ανώτερης ποιότητας θεραπεία για τον έλεγχο της αιμορραγίας. Επιπρόσθετα δεδομένου ότι τα παγωμένα αιμοπετάλια έχουν πολύ χαμηλότερο κίνδυνο βακτηριακής μόλυνσης προσφέρουν μεγαλύτερη προστασία από τις λοιμώξεις που οφείλονται στην μετάγγιση προσδίδοντας στους ασθενείς ένα καλύτερο ανοσολογικό προφίλ. Τέλος η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και οι συνθήκες αποθήκευσής τους βοηθάει στην ρύθμιση της σπατάλης του προϊόντος δίνοντας την ευκαιρία σε περισσότερους ανθρώπους να έχουν πρόσβαση στην θεραπεία της μετάγγισης (Scorer et.al., 2019).

#### **5.4.2 Μετεγχειρητική θεραπεία**

Οι ασθενείς που υπόκεινται σε καρδιοπνευμονικό bypass μετά το πέρας της επέμβασης είναι πιθανό να αναπτύξουν θρομβοπάθειες και θρομβοπενία με αποτέλεσμα να χρειαστεί να μεταγγιστούν με αιμοπετάλια. Πολλές μελέτες που έχουν γίνει in vitro δείχνουν ότι τα παγωμένα αιμοπετάλια διατηρούν καλύτερα την ικανότητα δημιουργίας συσσωματώματος και την μιτοχονδριακή τους λειτουργία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η αιμορραγία στους ασθενείς μετά την μετάγγιση των CSP καθιστώντας τα ένα βελτιωμένο αιμοστατικό προϊόν για την θεραπεία της μετεγχειρητικής αιμορραγίας (Strandenes et.al., 2020).

Πιο συγκεκριμένα μια κλινική δοκιμή η οποία ξεκίνησε το 2015 στην Νορβηγία από τους Strandenes et.al. αξιολόγησε τα παγωμένα αιμοπετάλια σε σχέση με τα αιμοπετάλια που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου όσον αφορά την αποτελεσματικότητά τους στην θεραπεία της αιμορραγίας μετεγχειρητικών ασθενών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η αιμορραγία στους ασθενείς μετά την μετάγγιση των CSP καθιστώντας τα ένα βελτιωμένο αιμοστατικό προϊόν για την θεραπεία της μετεγχειρητικής αιμορραγίας. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι οι ασθενείς που έλαβαν παγωμένα αιμοπετάλια είχαν μειωμένη μετεγχειρητική αιμορραγία (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

#### **5.4.3 Δράσεις πέρα από την αιμόσταση**

Το ενδιαφέρον για τα παγωμένα αιμοπετάλια στρέφεται όχι μόνο για τις περιπτώσεις αιμοστατικής ανάνηψης ασθενών με σοβαρή αιμορραγία αλλά και στην ανάπτυξη νέων κυτταρικών θεραπειών στην αναγεννητική ιατρική. Τα πήκτωμα ινώδους και αιμοπεταλίων χρησιμοποιούνται ευρέως ως αιμοστατικά προϊόντα για τις μεταμοσχεύσεις δέρματος. Τα παράγωγα του ινώδους και το πήκτωμα αυτού όταν αναμειχθούν με εξωκυτταρικά υλικά της μήτρας του δέρματος όπως το υαλουρονικό οξύ έχουν δείξει ότι

μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μηχανική δημιουργία αγγειακών μοσχευμάτων και καρδιακού ιστού, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να αποτελέσουν κατάλληλο περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που προέρχονται από τον μυελό των οστών. Η προσθήκη αιμοπεταλίων καθιστά τα πηκτώματα ινώδους βιοδραστικά και οδηγούν στην απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι παράγονται σε μεγάλες ποσότητες ενώ παράλληλα έχουν μεγάλη ποικιλία συμβάλλοντας έτσι στην διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που είναι απαραίτητα για την αναγέννηση του ιστού.

Πειράματα έδειξαν ότι τα παγωμένα αιμοπετάλια μπορούν να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα των μεθόδων της αναγεννητικής ιατρικής. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι το προφίλ της ενεργοποίησης και του μεταβολισμού των αιμοπεταλίων που έχουν αποθηκευτεί στο ψύχος είναι καλύτερης ποιότητας ενώ ταυτόχρονα τα παγωμένα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να διατηρούν την ζωτικότητα τους κατά την αποθήκευσή τους. Έτσι, η κινητική της αποκοκκιοποίησης των αιμοπεταλίων και η απελευθέρωση από αυτά του αυξητικού παράγοντα είναι δυνατόν να γίνει συντονισμένα με σκοπό την παραγωγή, *in situ*, συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων αλλά και ποσοτήτων αυτών οι οποίες θα είναι ανάλογες της μηχανικής των ιστών που θα αναγεννηθούν. Αυτά θα έχουν σαν αποτέλεσμα τα παγωμένα αιμοπετάλια να έχουν ένα αλλοιωμένο βιοχημικό προφίλ το οποίο θα μπορεί να χρησιμοποιείται σαν υποκατάστατο ορού για την καλλιέργεια πολλών τύπων ανθρώπινων κυττάρων που θα βρίσκουν εφαρμογές στην κυτταρική θεραπεία (Reddoch-Cardenas et.al., 2019).

#### **5.4.4 Ελλείψεις προϊόντων αίματος κατά την πανδημία**

Η πανδημία της Covid-19 έχει οδηγήσει πολλές τράπεζες αίματος να έρχονται αντιμέτωπες με μεγάλες ελλείψεις τόσο αιμοπεταλίων όσο και άλλων προϊόντων αίματος σε ολόκληρο τον κόσμο. Στις Η.Π.Α είχε ως αποτέλεσμα να κλείσουν πολλές εγκαταστάσεις αίματος και κυρίως οι κινητές μονάδες. Επιπλέον δημιουργείται πρόβλημα καθώς μεγάλο ποσοστό του υγειονομικού προσωπικού είχε νοσήσει ή βρίσκονταν σε καραντίνα, αλλά και λόγω της μειωμένης προσέλευσης αιμοδοτών είτε λόγω έκθεσής τους στον ιό είτε λόγω προηγούμενης μόλυνσης από αυτόν.

Η μετάβαση αποθήκευσης των αιμοπεταλίων από την θερμοκρασία δωματίου στην ψύξη σε ένα μεγάλο ιατρικό κέντρο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής οδήγησε στην αποφυγή της σπατάλης 61 μονάδων αιμοπεταλίων από τον πρώτο μήνα εφαρμογής. Οι μονάδες των παγωμένων αιμοπεταλίων χορηγήθηκαν σε ασθενείς με οξεία αιμορραγία αλλά και σε δύο

παιδιατρικά περιστατικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν επαρκή αιμόσταση στους ασθενείς ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια ανεπιθύμητη παρενέργεια (Warner et al., 2021).

## Βιβλιογραφία

Bahou & Wadie , 2012. PL-07 platelet systems biology using integrated genetic and proteomic platforms. 4, 129(SUPPL. 1).

Braune et.al, 2014. Changes in platelet morphology and function during 24 hours of storage. 58(1), pp. 159-170.

Burkhart et.al., 2014. What can proteomics tell us about platelets?. 3, 114(7), pp. 1204-1219.

Cber, 2019. *Blood Products Advisory Committee November 22, 2019 Meeting Issue Summary- Topic I- Considerations for cold stored platelets Intended for Transfusion*, s.l.: s.n.

Chernoff and Snyder, 1992. The cellular and molecular basis of the platelet storage lesion: a symposium summary. 32(4), pp. 386-390.

Clemetson, Kenneth J., 2012. Platelets and primary haemostasis. 3, 129(3), pp. 220-224.

Getz, Todd M., 2019. Physiology of cold-stored platelets. 2, 58(1), pp. 12-15.

Gremmel et.al., 2016. Platelet physiology. 4, 42(3), pp. 191-204.

Holinstat, Michael, 2017. Normal platelet function. 6, 36(2), pp. 195-198.

Kaushansky & Kaushansky, 2014. Systems Biology of Megakaryocytes. Στο: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York : s.n., pp. 59-84.

Learoyd, P., 2012. The history of blood transfusion prior to the 20th century - Part 1. 10, 22(5), pp. 308-314.

Milford et.al, 2016. Comprehensive review of platelet storage methods for use in the treatment of active hemorrhage. 4, Τόμος 56, pp. S140-S148.

Paglia et.al., 2014. Comprehensive metabolomic study of platelets reveals the expression of discrete metabolic phenotypes during storage. 11, 54(11), pp. 2911-2923.

Reddoch-Cardenas et.al., 2019. Cold-stored platelets: A product with function optimized for hemorrhage control. 2, 58(1), pp. 16-22.

Scorer et.al., 2019. Therapeutic Utility of Cold-Stored Platelets or Cold-Stored Whole Blood for the Bleeding Hematology-Oncology Patient. 10, 33(5), pp. 873-885.



- Seghatchian, J. & Krailadsiri, P., 1997. *The Platelet Storage Lesion*, s.l.: s.n.
- Shea et.al., 2019. The effect of platelet storage temperature on haemostatic, immune, and endothelial function: Potential for personalised medicine. 17(4), pp. 321-330.
- Shrivastava, M., 2009. The platelet storage lesion. 10, 41(2), pp. 105-113.
- Six et.al., 2019. Impact of cold storage on platelets treated with Intercept pathogen inactivation. 59(8), pp. 2662-2671.
- Spinella, P. C. & Cap, A. P., 2016. Whole blood: Back to the future. 11, 23(6), pp. 536-542.
- Strandenes et.al., 2020. A Pilot Trial of Platelets Stored Cold versus at Room Temperature for Complex Cardiothoracic Surgery. pp. 1173-1183.
- Stroncek, D. F. & Rebull, P., 2007. Platelet transfusions. 8, 370(9585), pp. 427-438.
- Stubbs et.al., 2017. Cold platelets for trauma-associated bleeding: regulatory approval, accreditation approval, and practice implementation—just the “tip of the iceberg”. 57(12), pp. 2836-2844.
- Thon & Italiano, 2012. Platelets: Production, Morphology. Στο: *Handbook of Experimental*. Harvard Medical School, Boston, MA, USA: s.n., pp. 4 - 20.
- Villarroel et.al., 2013. Increased platelet storage time is associated with mitochondrial dysfunction and impaired platelet function. 184(1), pp. 422-429.
- Warner et al., 2021. Transition from room temperature to cold-stored platelets for the preservation of blood inventories during the COVID-19 pandemic. 1, 61(1), pp. 72-77.
- Waters et.al., 2018. Refrigeration, cryopreservation and pathogen inactivation: an updated perspective on platelet storage conditions. 5, 113(4), pp. 317-328.
- Yang et.al., 2018. Evaluation of the advantages of platelet concentrates stored at 4°C versus 22°C. 3, 58(3), pp. 736-747.
- Zufferey, et.al., 2012. Platelet proteomics. 3, 31(2), pp. 331-351.