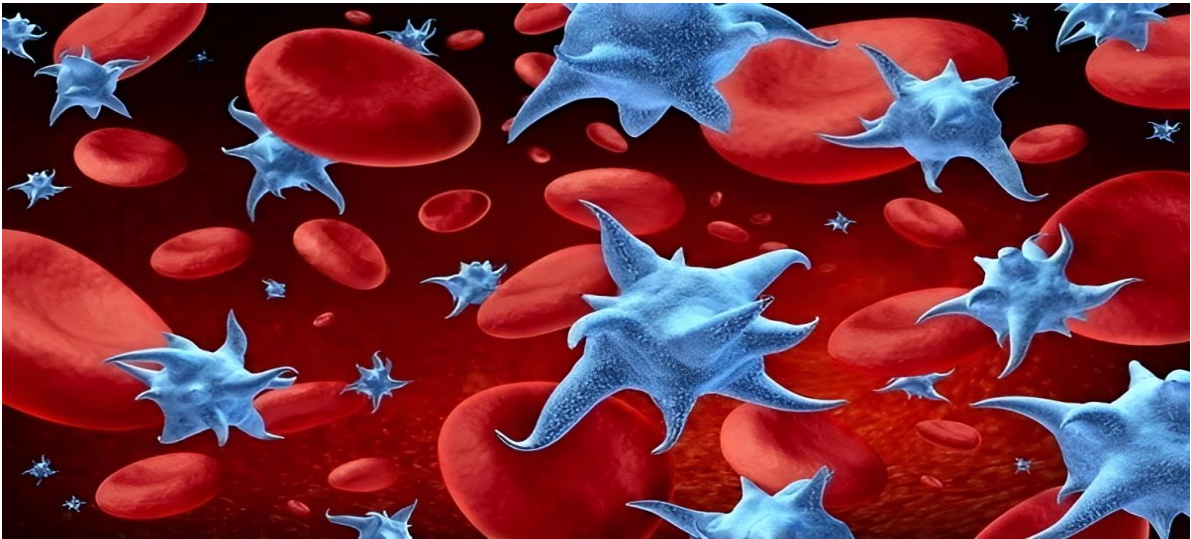




Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



## Δείκτες ενεργοποίησης αποθηκευμένων αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ:  
ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΑΝΤΩΝΑΚΑΣ  
ΑΜ: 19678009

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:  
ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΦΟΡΤΗΣ  
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ

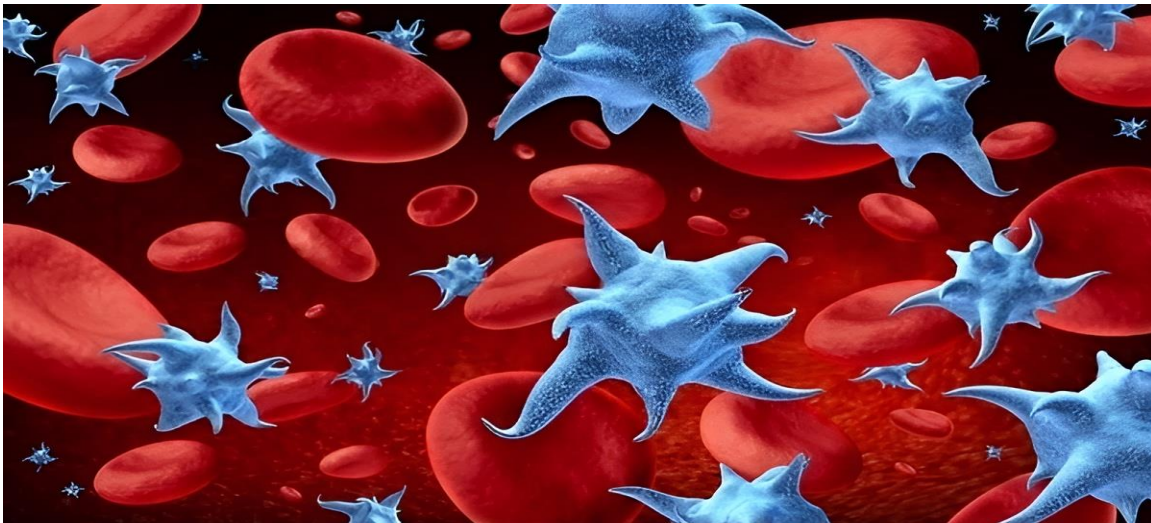
ΑΙΓΑΛΕΩ 2023



University of West Attica  
School of Health and Care Sciences  
Department of Biomedical Sciences



## Activation of stored platelets intended for transfusion



**STUDENT NAME:**  
**CHARALAMPOS ANTONAKAS**  
**AM:19678009**

**SUPERVISOR NAME:**  
**SOTIRIOS FORTIS**  
**ACADEMIC ASSISTANT**

**EGALEO 2023**



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



**ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ ΚΑΘΗΓΗΤΗ**

Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

<b>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
<b>ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ</b>	<b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>	
<b>ΜΠΙΡΤΣΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ</b>	<b>ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ</b>	
<b>ΦΟΡΤΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ</b>	<b>ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ</b>	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Χαράλαμπος Αντωνάκας, με αριθμό μητρώου 19678009 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της 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».

Ο Δηλών

Εισηγητής: Φόρτης Σωτήριος  
Ακαδημαϊκός Υπότροφος



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	6
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ .....	8
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSTRACT .....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	13
A.1. Ιστορική αναδρομή.....	14
A.2 Προέλευση, δομή και ο ρόλος των αιμοπεταλίων .....	16
A.3. Ο καταρράκτης της πήξης .....	19
A.4. Βασικά αντιγόνα και δείκτες λειτουργίας των αιμοπεταλίων .....	21
Το αντιγόνο CD41.....	21
A.5. Παράγοντες απόπτωσης των αιμοπεταλίων .....	22
Η Αννεξίνη V και η Κασπάση 3 .....	22
A.6. Παράγοντες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων .....	24
Η P-σελεκτίνη (CD62P) .....	24
A.7. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων .....	25
A.7.1. Η αποθηκευτική βλάβη των αιμοπεταλίων.....	25
A.7.2. <i>In vitro</i> χαρακτηριστικά των παγωμένων αιμοπεταλίων.....	26
A.7.3. Τα παγωμένα αιμοπετάλια και <i>in vivo</i> κλινικές μελέτες .....	28
A.7.4. Εναλλακτικοί μέθοδοι/συνθήκες αποθήκευσης των αιμοπεταλίων .....	30
A.7.4.1. Καθυστερημένη αποθήκευση αιμοπεταλίων.....	30
A.7.4.2. Κρυοσυντήρηση αιμοπεταλίων .....	31
A.9. Απενεργοποίηση/Μείωση παθογόνων σε παράγωγα αιμοπεταλίων .....	35
A.10.1 Το υδροδυναμικό σύστημα ροής .....	38
A.10.2. Το οπτικό σύστημα του κυτταρομέτρου και η επεξεργασία του σήματος .....	39
A.10.3. Τα φθοριοχρώματα.....	42
A.10.4. Αντιστάθμιση του σήματος φθορισμού.....	44
B.2. Υλικά, εξοπλισμός και αντιδραστήρια .....	47
2.1 Έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης.....	49
2.2 Έκφραση P-σελεκτίνης.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	56

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1: Ο καταρράκτης της πήξης μέσω της εξωγενούς οδού και ο ρόλος της θρομβίνης στο σχηματισμό του θρόμβου. Το περιεχόμενο της εικόνας έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή [13] .....20
- Εικόνα 2: Βασικά χαρακτηριστικά και μορφολογικές μεταβολές των παγωμένων αιμοπεταλίων. Το περιεχόμενο της εικόνας έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή [27]..... 27
- Εικόνα 3: Το υδροδυναμικό σύστημα ροής του κυτταρομέτρου. Απεικονίζονται οι ροές του δείγματος και περιβλήματος, που ενώνονται πριν από τη δέσμη φωτός. Η εικόνα έχει τροποποιηθεί με βάση την πηγή [92]..... 38
- Εικόνα 4: Η σκέδαση του φωτός. Η πρόσθια σκέδαση (FSC) είναι ανάλογη με το μέγεθος του κυττάρου, ενώ η πλάγια σκέδαση (SSC) είναι ανάλογη της πολυπλοκότητας ή κοκκίωσης του κυττάρου. Η εικόνα έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή [92]..... 39
- Εικόνα 5: Το σύστημα ανάλυσης του σήματος του κυτταρομέτρου. Απεικονίζονται το σύστημα ροής, τα φίλτρα και οι ανιχνευτές που ενισχύουν και μεταφέρουν το σήμα ακτινοβολίας στον υπολογιστή. Η εικόνα έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή [92]..... 41
- Εικόνα 6: Τα φάσματα απορρόφησης (πράσινη γραμμή) και εκπομπής (μπλε γραμμή) ενός φθοριοχρώματος. Η διαφορά των μηκών κύματος μεταξύ της μέγιστης απορρόφησης και εκπομπής είναι γνωστή ως μετατόπιση Stokes. Μεγαλύτερη μετατόπιση κατά Stokes συνεπάγεται καλύτερο διαχωρισμό της ακτινοβολίας διέγερσης και εκπομπής. Η εικόνα έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή. [92]..... 43
- Εικόνα 7: Στικτόγραμμα δύο παραμέτρων όπου αναλύθηκε δείγμα μονοπύρηνων και λεμφοκυττάρων. Το άνω δεξιό τεταρτημόριο αντιπροσωπεύει κύτταρα θετικά για CD3 και CD4 , το άνω αριστερό είναι θετικό μόνο για το CD4, το κάτω δεξιό τεταρτημόριο είναι CD3+ και CD4-, ενώ κάτω αριστερά έχουμε κύτταρα αρνητικά και για CD3 και για CD4. Το CD3 χρησιμοποιείται ως δείκτης όλων των τύπων Τ λεμφοκυττάρων, ενώ το CD4 εντοπίζεται συγκεκριμένα στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα..... 46
- Εικόνα 8: Ιστόγραμμα έκφρασης Αννεξίνης V των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται η μέση τιμή Αννεξίνης V για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4). ..... 49
- Εικόνα 9: Ιστόγραμμα έκφρασης Αννεξίνης V των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 4°C στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται επίσης η μέση τιμή Αννεξίνης V για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4). ..... 50
- Εικόνα 10: Συνδυαστικό ιστόγραμμα έκφρασης Αννεξίνης V σε αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και 4°C στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται επίσης η μέση

τιμή Αννεξίνης V των δειγμάτων για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4).  
.....51

Εικόνα 11: Ιστόγραμμα της έκφρασης της P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται η μέση τιμή P-σελεκτίνης για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4)......52

Εικόνα 12: Ιστόγραμμα έκφρασης της P-σελεκτίνης των δειγμάτων που είχαν αποθηκευτεί στους 4°C στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται η μέση τιμή έκφρασης της P-σελεκτίνης για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4)......53

Εικόνα 13: Συνδυαστικό ιστόγραμμα της έκφρασης της P-σελεκτίνης σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και 4°C στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται η μέση τιμή P-σελεκτίνης των δειγμάτων για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4)......53

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

RT	Θερμοκρασία δωματίου
CSP/CP	Παγωμένο αιμοπετάλιο
GP	Γλυκοπρωτεΐνη
vWF	Von Willebrand
Σύστημα διαχωρισμού της μεμβράνης	DMS
Φωσφατιδυλοσερίνη	PS
TAFI	Αναστολέας της ινωδόλυσης που ενεργοποιείται από θρομβίνη
TF	Ιστικός παράγοντας
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα ορού με φωσφορικά άλατα
FSC	Πρόσθια σκέδαση
SSC	Πλάγια σκέδαση
FITC	Ισοθειοκυανική Φλουορεσκεΐνη
PD	Φωτοδίοδος
PMT	Φωτοπολλαπλασιαστής



PE	Φυκοερυθρίνη
APC	Αλλοφυκοκυανίνη
PRP	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
Araf1	Αποπτοτικός παράγοντα ενεργοποιητής πρωτεάσης 1
FADD	Πρωτεΐνη της περιοχής θανάτου σχετιζόμενη με το FAS
AABB	Αμερικανική Οργάνωση για τις Τράπεζες Αίματος
DCSP	Παγωμένα αιμοπετάλια καθυστερημένης ψύξης
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
CPP	Κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια
PAS	Προσθετικά διαλύματα αιμοπεταλίων
PRT	Τεχνολογίες μείωσης παθογόνων
GVHD	Graft vs Host disease

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε την περίοδο Φεβρουάριος- Σεπτέμβριος 2023 στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών στο Ερευνητικό Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία, του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Φόρτη Σωτήριο, Ακαδημαϊκό Υπότροφο του τμήματος, για την πολύτιμη βοήθεια του τόσο κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών, την ανάλυση των αποτελεσμάτων καθώς και κατά τη συγγραφή της εργασίας μου. Ευχαριστώ για τη μετάδοση των γνώσεων και των εμπειριών του, την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση, και φυσικά την υποστήριξή του, πρακτική και συναισθηματική, οποιαδήποτε στιγμή τη χρειαζόμουν.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου, που μου έδωσε την ευκαιρία να είμαι στο εργαστήριο του και την τιμή να συνεργαστούμε στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα, καθώς και για την πρακτική και ψυχολογική υποστήριξη που παρείχε σε μένα, αλλά και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Παύλου Ευθυμία, Ακαδημαϊκή Υπότροφο, για τη συνεισφορά της στη διαχείριση των δειγμάτων του πειράματος και τον κ. Μπίρτσα Βασίλειο, Ακαδημαϊκό Υπότροφο, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου για την εξαιρετική αμοιβαία συνεργασία μας κατά τη διεξαγωγή των διαφόρων πειραμάτων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απομόνωση των αιμοπεταλίων από ολικό αίμα στη δεκαετία του 60 και η αιμοπεταλιαφαίρεση μερικά χρόνια αργότερα ήταν σημαντικά βήματα στην ιατρική των μεταγγίσεων. Στην αρχή η αποθήκευση των αιμοπεταλίων γινόταν στους 4°C. Στην θερμοκρασία ψύχους όμως ορισμένες μελέτες έδειξαν μειωμένη *in vivo* επιβίωση των αιμοπεταλίων, και για αυτό το λόγο προτάθηκε η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου. Μία ανεπιθύμητη συνέπεια αυτής της αλλαγής ήταν η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών στα αιμοπετάλια, περιορίζοντας το μέγιστο χρόνο αποθήκευσης σε 5-7 μέρες. Με την πάροδο του χρόνου και καθώς υπήρξε σημαντική πρόοδος στην κατανόηση του κύκλου ζωής των αιμοπεταλίων και στις αποθηκευτικές βλάβες που υφίστανται, το ενδιαφέρον για τα CSPs (cold stored platelets) επανήλθε στο προσκήνιο, επειδή η μειωμένη επιβίωση τους στην κυκλοφορία του αίματος μπορεί να μην είναι κλινικά σημαντική σε μια σειρά από ασθενείς, όπως σε άτομα με οξεία αιμορραγία, όπου απαιτείται μια βραχυπρόθεσμη ενίσχυση της αιμόστασης. Επίσης, η χρήση των CSPs μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο μικροβιακής μόλυνσης κατά την αποθήκευση τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ενώ δεν απαιτείται η συνεχή ανακίνησή τους. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών ενεργοποίησης και απόπτωσης των αιμοπεταλίων σε συνθήκες αποθήκευσης στο ψύχος και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πιθανή διατήρηση του αιμοστατικού δυναμικού των αιμοπεταλίων τόσο στο ψύχος όσο και στη θερμοκρασία δωματίου.

Λέξεις κλειδιά: αιμοπετάλια, παγωμένα αιμοπετάλια, αποθήκευση αιμοπεταλίων, αποθηκευτική βλάβη αιμοπεταλίων, μετάγγιση αιμοπεταλίων

## ABSTRACT

The isolation of platelets from whole blood in the 1960s and the use of platelet apheresis a few years later were important steps for transfusion medicine. At first, platelets were stored at 4°C. However, several studies showed that platelets in cold storage exhibited reduced *in vivo* survival, and thus platelet storage in room temperature conditions was recommended. An unexpected consequence of this change was the proliferation of microorganisms in the platelets, limiting maximum storage time to 5-7 days. As time progressed and with significant progress in the understanding of the platelet life cycle, the interest for CSPs (cold stored platelets) returned to the forefront, since their reduced survival in circulation may not be clinically significant in a series of patients, like in patients with acute hemorrhage, where a short-term increase to hemostasis is required. In addition, the use of CSPs can reduce the risk of microbial contamination during storage for a longer period of time, while constant agitation of the platelets is also not needed. The purpose of this work is the study of platelet activation and apoptosis markers in cold and room temperature storage. The results showcased a potential maintenance of the hemostatic potential of the platelets in both room and cold temperatures.

Keywords: platelets, cold stored platelets, platelet storage, platelet storage lesion, platelet transfusion

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Τα αιμοπετάλια είναι απύρρηνα κύτταρα με σχήμα δίσκου που προέρχονται από τη θραύση του κυτταροπλάσματος μιας ομάδας κυττάρων του μυελού των οστών, τα μεγακαρυοκύτταρα. Ο κύριος ρόλος των αιμοπεταλίων είναι η συμμετοχή τους στην αιμόσταση, μια διαδικασία κατά την οποία τα αιμοπετάλια, με τη βοήθεια μιας σειράς πρωτεϊνών, ρυθμιστικών παραγόντων και άλλων κυττάρων, συσσωρεύονται στο σημείο μιας αρτηριακής βλάβης και σχηματίζουν θρόμβο. Από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα ο αιμοστατικός ρόλος των αιμοπεταλίων ήταν γνωστός, όμως απαιτήθηκαν αρκετές δεκαετίες μέχρι τα αιμοπετάλια να βρουν κλινική εφαρμογή για την αντιμετώπιση της οξείας και χρόνιας αιμορραγίας, και μέχρι σήμερα ερευνώνται οι ιδανικές συνθήκες για την ασφαλή συντήρηση των αιμοπεταλίων, με τη θερμοκρασία αποθήκευσης τους να αποτελεί έναν παράγοντα που επιστρέφει στο προσκήνιο μετά από πολλά χρόνια.

## A.1. Ιστορική αναδρομή

Τα αιμοπετάλια περιεγράφηκαν για πρώτη φορά από το Γερμανό ανατόμο Max Schultze το 1865, έργο που αποτέλεσε σημαντική πηγή πληροφοριών για τον Ιταλό ερευνητή Giulio Bizzozero, ο οποίος παρατήρησε τα βασικά δομικά στοιχεία των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο, καθώς και τη συμμετοχή τους στο σχηματισμό της ινικής [1]. Παρατήρησε επίσης χρησιμοποιώντας πειραματόζωα, τη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε τραυματισμένα τοιχώματα αγγείων [2].

Το 1906, ο Αμερικανός παθολόγος James Homer Wright, χρησιμοποιώντας τις πρωτοπόρες για την εποχή χρώσεις Romanowsky, απέδειξε την προέλευση των αιμοπεταλίων από τα μεγακαρυοκύτταρα παρόλο που το εύρημα αυτό αποτελούσε θέμα αμφισβήτησης από ορισμένους ειδικούς μέχρι και δεκαετίες μετά [3].

Το 1910, ο W.W. Duke χρησιμοποίησε για πρώτη φορά μεταγγίσεις ολικού αίματος για να σώσει τη ζωή ενός άντρα 20 ετών που έπασχε από βλεννοδερματική αιμορραγία αυξάνοντας τον αριθμό των αιμοπεταλίων του από  $6 \times 10^9/L$  σε  $123 \times 10^9/L$ . Διαμεσολάβησαν όμως αρκετά χρόνια μέχρι να αποτελέσει κοινά εφαρμοσμένη πρακτική η μετάγγιση αιμοπεταλίων. Τα πρώτα παράγωγα αιμοπεταλίων που χρησιμοποιήθηκαν στη δεκαετία του 60, αποθηκεύονταν σε θερμοκρασίες ψυγείου και η κύρια χρήση τους ήταν η ενίσχυση της αιμόστασης σε άτομα με χρόνιες παθήσεις, όπως σε καρκινοπαθείς. Αυτή η πρακτική όμως καταργήθηκε διότι παρατηρήθηκε ότι τα παράγωγα είχαν χαμηλό χρόνο επιβίωσης στον οργανισμό του ασθενή. Το 1969 οι ερευνητές Scott Murphy και Frank Gardner, έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου έως και 3 μέρες, διατηρώντας την αιμοστατική τους λειτουργία. Βελτιώσεις στον τρόπο αποθήκευσης των αιμοπεταλίων έχουν από τότε αυξήσει το χρόνο αποθήκευσης σε 5-7 μέρες, με στόχο την μελλοντική αύξηση αυτού του χρόνου σε 10 ημέρες [4].

Ο περιορισμένος χρόνος αποθήκευσης των αιμοπεταλίων θερμοκρασίας δωματίου (RT) λόγω βακτηριακής επιμόλυνσης σε συνδυασμό με τα θεωρητικά οφέλη μιας μεθόδου

μακροβιότερης αποθήκευσής τους για τα συστήματα υγείας, καθώς και για τη φροντίδα τραυματιών σε εμπόλεμες ζώνες [5], οδήγησαν σε μια αναγέννηση της μελέτης των παγωμένων αιμοπεταλίων (CPs) για την αντιμετώπιση περιστατικών χρόνιας ή οξείας αιμορραγίας.

## A.2 Προέλευση, δομή και ο ρόλος των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια προέρχονται από την αποκοπή τμημάτων από ένα είδος κυττάρου, γνωστό ως μεγακαρυοκύτταρο. Τα μεγακαρυοκύτταρα είναι κύτταρα της μυελικής σειράς που παράγονται στο μυελό των οστών (ή στο ήπαρ στα πρώιμα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης). Τα κύτταρα αυτά με τη βοήθεια συγκεκριμένων κυτταροκινών, κυρίως της θρομβοποιητίνης, ωριμάζουν από την πρόδρομη μορφή τους σε ώριμα μεγακαρυοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της ωρίμανσης, η διάμετρος του κυττάρου φτάνει τα περίπου τα 100μm και παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις ριβοσωμάτων, που οδηγούν στην παραγωγή πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων. Οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται δυνατές μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ενδομίτωση, μια παραλλαγή της τυπικής διαδικασίας της μίτωσης η οποία δεν περιλαμβάνει τα στάδια της ανάφασης και της τελόφασης, οπότε το τελικό κύτταρο είναι πολυπλοειδές με 4-128N αντίγραφα της γενετικής πληροφορίας του κυττάρου [6]. Τέλος, τα μεγακαρυοκύτταρα στο μυελό των οστών σχηματίζουν προεκτάσεις (ψευδοπόδια), που εκτείνονται προς το εσωτερικό των αιμοφόρων αγγείων, από όπου απελευθερώνονται τα αιμοπετάλια, με τη συμβολή του συστήματος διαχωρισμού της μεμβράνης (DMS), μικροσωληνίσκων και νηματίων ακτίνης [7].

Τα αιμοπετάλια έχουν χαρακτηριστικό σχήμα δίσκου, διάμετρο 2-5 μm και πάχος 0,5μm. Η δομή των αιμοπεταλίων μπορεί να διαχωριστεί στις ακόλουθες περιοχές: περιφερική ζώνη, ζώνη “Sol-Gel”, ζώνη οργανιδίων και μεμβρανικά συστήματα.

Η περιφερική ζώνη βρίσκεται εξωτερικά πάνω από τη διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων και αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες (GP), οι οποίες έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη σύνδεση του αιμοπεταλίου στο σημείο της αγγειακής βλάβης, στην ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ιδιαίτερα σημαντικά για τις παραπάνω λειτουργίες είναι τα συμπλέγματα υποδοχέων GPIb-IX-V και της Ιντεγκρίνης άλφα 2β, που θα αναλυθούν παρακάτω [8].



Η ζώνη Sol-Gel είναι μια διαφανής, ρευστή περιοχή που χαρακτηρίζεται από την παρουσία δομών από μικροσωληνίσκους, οι οποίοι σχηματίζουν τον συστατικό κυτταροσκελετό, και από μικρονημάτια ακτίνης, που επίσης συμμετέχουν στον κυτταροσκελετό, ο οποίος συστέλλεται κατά τη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ώστε να απελευθερωθεί το περιεχόμενο των  $\alpha$  και πυκνών κοκκίων [8].

Τα μεμβρανικά συστήματα περιλαμβάνουν υπολείμματα του συμπλέγματος Golgi των μεγακαρυοκυττάρων (σπάνια, κυρίως σε παθολογικά αιμοπετάλια), καθώς και υπολείμματα του αντίστοιχου αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (κυρίως σε καταστάσεις θρομβοκυτταροπενίας με αυξημένη παραγωγή αιμοπεταλίων). Τα δύο βασικά μεμβρανικά συστήματα αποτελούν το ανοιχτό καναλιώδες και το πυκνό σωληνώδες σύστημα. Το ανοιχτό καναλιώδες σύστημα εκτείνεται από την επιφανειακή μεμβράνη του αιμοπεταλίου μέχρι το εσωτερικό του και εκτελεί τρεις κύριες λειτουργίες. Μεταφέρει προϊόντα του πλάσματος όπως το ινωδογόνο προς τα  $\alpha$ -κοκκία και μπορεί να απελευθερώσει το περιεχόμενο των αιμοπεταλίων κατά την ενεργοποίησή τους. Τέλος, το πυκνό καναλιώδες σύστημα αποτελεί ένα υπόλειμμα του ενδοπλασματικού δικτύου του μητρικού μεγακαρυοκυττάρου, χαρακτηρίζεται από την παρουσία διάσπαρτων καναλιών στο κυτταρόπλασμα, τα οποία περιέχουν μια άμορφη ουσία που προσομοιάζει σε αυτό [8].

Τα βασικά λειτουργικά οργανίδια των αιμοπεταλίων είναι τα  $\alpha$ -κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα. Τα  $\alpha$ -κοκκία απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω του ανοιχτού καναλιώδους συστήματος, απελευθερώνοντας έτσι παράγοντες που συμμετέχουν στη σύνδεση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους και με το τραυματισμένο ενδοθήλιο όπως ινωδογόνο και παράγοντα von Willebrand (VWF), καθώς και παράγοντες της δευτερογενούς αιμόστασης, όπως οι παράγοντες V και IX. Επίσης, ο υποδοχέας του ινωδογόνου  $\alpha IIb\beta 3$ , ο υποδοχέας του κολλαγόνου GPVI και συστατικά του συμπλέγματος υποδοχέων του VWF GPIb-IX-V, μεταφέρονται από τα  $\alpha$  κοκκία στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, όπου και συμμετέχουν στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τέλος, τα  $\alpha$ -κοκκία μπορεί να περιορίσουν τη θρόμβωση εκκρίνοντας αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη S και αναστολείς του ιστικού παράγοντα (TF) [8], [9].

Τα πυκνά κοκκία αποτελούν την κύρια πηγή ADP, που δρα ανταγωνιστικά στην εγκατάσταση των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης. Παράλληλα, η έκκριση σεροτονίνης από τα πυκνά κοκκία υποστηρίζει τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων, ενώ τα παραγόμενα ιόντα ασβεστίου ( $Ca^{++}$ ) και πολυφωσφορικά επίσης συμβάλλουν στο σχηματισμό του θρόμβου [8], [10].

Τα λυσοσώματα των αιμοπεταλίων περιέχουν πρωτεάσες όπως καθειψίνες, ελαστάση, κολλαγονάση και καρβοξυπεπτιδάση, ένζυμα που υδρολύουν υδατάνθρακες όπως γλυκοζιδάση, γαλακτοζιδάση και μαννοσιδάση, καθώς και όξινη φωσφατάση.

### A.3. Ο καταρράκτης της πήξης

#### Αρχική φάση

Ο βασικός ρόλος των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση είναι γνωστός ως καταρράκτης της πήξης. Το βασικό ερέθισμα του καταρράκτη της πήξης είναι η βλάβη στο τοίχωμα ενός αγγείου, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των τοπικών αιμοπεταλίων, ενδοθηλιακών κυττάρων και λευκοκυττάρων (μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα), τα οποία συγκεντρώνονται στην περιοχή της βλάβης. Σε αυτό το μηχανισμό συμμετέχουν μια σειρά από ρυθμιστικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα παραπάνω κύτταρα, όπως ο παράγοντας von Willebrand (vWF), η P-σελεκτίνη, ο ιστικός παράγοντας κ.α, οι λειτουργίες των οποίων θα αναλυθούν παρακάτω. Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα προκαλεί την ένωση του ιστικού παράγοντα με μια πρωτεΐνη γνωστή ως παράγοντας VII, ο οποίος ενεργοποιείται (παράγοντας VIIa). Το σύμπλεγμα παράγοντα VIIa-ιστικού παράγοντα με τη σειρά του ενεργοποιεί τους παράγοντες IX προς IXa και X προς Xa, ενώ ο τελευταίος ενεργοποιεί τον παράγοντα V προς Va.

Ο παράγοντας Xa με τη συνδρομή του παράγοντα Va και ιόντων ασβεστίου, καταλύουν την ενζυμική επεξεργασία μιας πρωτεΐνης, της προθρομβίνης, προς θρομβίνη, ένα σημαντικό ένζυμο στο μηχανισμό της αιμόστασης, το οποίο θα παραχθεί σε μεγαλύτερες ποσότητες στην επόμενη φάση του μηχανισμού [11].

#### Φάση ενίσχυσης

Η μικρή ποσότητα θρομβίνης που παράχθηκε στην αρχική φάση του μηχανισμού καταλύει την ενεργοποίηση περισσότερων αιμοπεταλίων και παραγόντων V και XI. Ο παράγοντας XI, που είναι συνδεδεμένος στην γλυκοπρωτεΐνη Ib/IX των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, μετά από την ενεργοποίησή του από τη θρομβίνη, ενεργοποιεί τον παράγοντα IX. Παράλληλα, ποσότητα ενεργοποιημένου παράγοντα IX που προήλθε από το σύμπλεγμα VIIa-ιστικού παράγοντα διαχέεται και προσκολλάται στη μεμβράνη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Στο πλάσμα, μόρια παράγοντα vWF συμμετέχουν σε σύμπλοκο με τον παράγοντα VIII (στα αιμοπετάλια είναι συνδεδεμένος με τη γλυκοπρωτεΐνη Ib/IX), μέχρι που η θρομβίνη τον απελευθερώνει από τον vWF. Ο



#### A.4. Βασικά αντιγόνα και δείκτες λειτουργίας των αιμοπεταλίων

##### Το αντιγόνο CD41

Το αντιγόνο CD41, αλλιώς γνωστό ως Ιντεγκρίνη άλφα 2β, είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο ITGA2B [7]. Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αποτελούνται από α/β ετεροδιμερή και συμμετέχουν σε ένα μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ ερεθίσματος-κυττάρου αλλά και μεταξύ κυττάρων. 18 υπομονάδες της ιντεγκρίνης α και 8 υπομονάδες της ιντεγκρίνης β έχουν ανακαλυφθεί στα θηλαστικά. Η ιντεγκρίνη α2β παράγεται στα μεγακαρυοκύτταρα, και συνδέεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο με μια άλλη παραγόμενη πρωτεΐνη γνωστή ως β3, σχηματίζοντας έτσι την Ιντεγκρίνη αIIbβ3, μετά από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στο σύμπλεγμα Golgi. Η Ιντεγκρίνη αIIbβ3 εκφράζεται σε 80.000 περίπου αντίγραφα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, και κατέχει σημαντικό ρόλο στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, διότι λειτουργεί ως υποδοχέας του ινωδογόνου, του παράγοντα von Willebrand, της φμπρονεκτίνης και της βιτρονεκτίνης [14]. Σε τραυματισμένα αγγεία υψηλής αιματικής ροής, τα αιμοπετάλια ενώνονται με τον παράγοντα von Willebrand του ενδοθηλίου και το κολλαγόνο, προκαλώντας δομικές αλλαγές στα αιμοπετάλια, τα οποία εκθέτουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα της Ιντεγκρίνης αIIbβ3, ενώ περαιτέρω διέγερση από το κολλαγόνο οδηγεί σε παραγωγή επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών (GP) στα αιμοπετάλια, οι οποίες βοηθούν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων πάνω στον παράγοντα von Willebrand και το ινωδογόνο [15].

## A.5. Παράγοντες απόπτωσης των αιμοπεταλίων

### Η Αννεξίνη V και η Κασπάση 3

Οι Αννεξίνες είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη και συμμετέχουν ενεργά σε πολλές από τις βιολογικές διαδικασίες της. Οι περισσότερες Αννεξίνες, με εξαίρεση την A6, αποτελούνται από μια κεντρική δομή, που χωρίζεται σε 4 μέρη 70 αμινοξέων. Χαρακτηριστική είναι η ικανότητα των αννεξινών να συνδέονται με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια παρουσία ιόντων ασβεστίου  $Ca^{2+}$  [16].

Η Αννεξίνη V (ή A5) είναι πρωτεΐνη μεγέθους 35.7 kDa και συνδέεται με υψηλή συγγένεια, με αναστρέψιμο και ασβεστιο-εξαρτώμενο τρόπο, σε μόρια της πλασματικής μεμβράνης που φέρουν στην επιφάνειά τους φωσφατιδυλοσερίνη (PS) [16]. Η PS στην πλειοψηφία των κυττάρων του οργανισμού βρίσκεται στο εσωτερικό τμήμα της πλασματικής μεμβράνης, όμως σε αποπτωτικά κύτταρα εμφανίζεται στην επιφάνεια της μεμβράνης, κάτι που προκαλεί τη φαγοκυττάρωση του κυττάρου από τα φαγοκύτταρα, που φέρουν υποδοχείς για την PS. Επειδή η Αννεξίνη A5 δεσμεύει τη PS, είναι δυνατόν να ανασταλεί η φαγοκυττάρωση του κυττάρου, εφόσον η συγκέντρωση της Αννεξίνης A5 είναι επαρκής. Ο ρόλος όμως της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και κατά επέκταση της Αννεξίνης V δεν περιορίζεται μόνο στην απόπτωση. Αρχικά, η εξωτερίκευση της PS που παρατηρείται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων μετά από πρόσδεσή τους στο κολλαγόνο τραυματισμένων αγγείων, οδηγεί στη συγκρότηση του συμπλέγματος προθρομβινάσης. Το σύμπλεγμα μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη με τη συμμετοχή των παραγόντων Va και Xa, η οποία με τη σειρά της μετατρέπει το ινωδογόνο σε πολυμερή ινικής, που σταθεροποιούν το θρόμβο. Η Αννεξίνη V σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αναστείλει την παραπάνω διαδικασία, είτε με άμεση δέσμευση της PS, είτε με τη δημιουργία πλέγματος που εμποδίζει τη λειτουργία του συμπλέγματος [17].

Εξίσου σημαντικός παράγοντας στη διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης σε όλα τα κύτταρα όπως και τα αιμοπετάλια, είναι η Κασπάση 3. Οι Κασπάσες είναι μια οικογένεια 14 πρωτεϊνών (14 στα θηλαστικά, 12 στον άνθρωπο) και ανήκουν στην οικογένεια των

ενδοπρωτεασών [18]. Η βασική τους λειτουργία είναι να κόβουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα μιας πρωτεΐνης σε συγκεκριμένη θέση (μετά από κατάλοιπο ασπαρτικού οξέως), χρησιμοποιώντας το μόριο κυστεΐνης που βρίσκεται στο ενεργό τους κέντρο [19]. Έτσι, οι κασπάσες παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην κυτταρική απόπτωση, μέσω της αποσύνθεσης βασικών κυτταρικών πρωτεϊνών, τις θραύσης και συρρίκνωσης της χρωματίνης από την κασπάση 3 κλπ [19]. Οι κασπάσες διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: α) κασπάσες φλεγμονής και β) κασπάσες απόπτωσης. Οι κασπάσες απόπτωσης με τη σειρά τους χωρίζονται στις "εναρκτήριες" κασπάσες (κασπάση 8, 9 και 10) και στις "τελεστικές" (3, 6 και 7) [20].

Η κασπάση 3 αρχικά συντίθεται από το γονίδιο CASP3 ως προκασπάση. Η ενεργοποίηση της προκαλείται από ένα εσωτερικό και ένα εξωτερικό μονοπάτι [21]. Στο εσωτερικό μονοπάτι, προαποπτωτικά σήματα όπως βλάβη του DNA, κυτταροτοξικές ουσίες, υποξία κλπ, προκαλούν τη διαρροή του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια προς το κυτταρόπλασμα, όπου συνδέεται με τον αποπτωτικό παράγοντα ενεργοποιητή πρωτεάσης 1 (Araf1), σχηματίζοντας έτσι το αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα με τη σειρά του ενεργοποιεί την εναρκτήρια κασπάση 9, η οποία κόβει και ενεργοποιεί τις προκασπάσες 3, 6 και 7 [21] [22].

Το εξωτερικό μονοπάτι ρυθμίζεται από την οικογένεια των παραγόντων νέκρωσης όγκου (TNFs). Η πρόσδεση "συνδεδών θανάτου" στους υποδοχείς ενεργοποιεί τη λειτουργία του μορίου FADD (πρωτεΐνη της περιοχής θανάτου σχετιζόμενη με το FAS), το οποίο ενεργοποιεί την κασπάση 8, η οποία μετατρέπει την προκασπάση 3 σε ενεργοποιημένη κασπάση 3 [21], [22].

## A.6. Παράγοντες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

### Η Ρ-σελεκτίνη (CD62P)

Η Ρ-σελεκτίνη αποτελεί τη μεγαλύτερη πρωτεΐνη στην οικογένεια των σελεκτινών (περιλαμβάνει την Ε-σελεκτίνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και την L-σελεκτίνη των λευκοκυττάρων), με μοριακό βάρος 140 kDa. Η Ρ-σελεκτίνη εκφράζεται με συνεχή ρυθμό στα σώματα Weibel–Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων, στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και σε διαλυτή μορφή στο πλάσμα. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η Ρ-σελεκτίνη μεταφέρεται στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου, από όπου αποβάλλεται. Η μεταφορά αυτή φαίνεται πως προκαλείται άμεσα τη σύνδεση του αιμοπεταλίου με θρομβίνη, με το κολλαγόνο (με καθυστέρηση 3 λεπτών) αλλά δεν είναι εφικτή με την πρόσδεση μόνο από ινωδογόνο [23].

Η παρουσία της Ρ-σελεκτίνης στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων φαίνεται πως συμβάλλει ενεργά στο σχηματισμό του θρόμβου. Αρχικά, η Ρ-σελεκτίνη προάγει την έκφραση του ιστικού παράγοντα (TF) σε μονοκύτταρα, ενώ μεσολαβεί στη σύνδεση των αιμοπεταλίων σε μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα, μέσω του υποδοχέα της Ρ-σελεκτίνης PSGL-1 που φέρουν, συμβάλλοντας έτσι στη συγκέντρωση αυτών των κυττάρων στο σημείο του σχηματιζόμενου θρόμβου [23], [24]. Επίσης, επειδή ο TF δεσμεύει τον παράγοντα VII και ενεργοποιεί τους παράγοντες IX και X, είναι πιθανό ότι η σύνθεση TF στα μονοκύτταρα μέσω της διέγερσης από τη Ρ-σελεκτίνη συμμετέχει στη διατήρηση του θρόμβου. Αξιόλογη είναι παράλληλα η πιθανή συμμετοχή της Ρ-σελεκτίνης στο σύμπλεγμα GPIIb-IX-V, και κατά επέκταση στη σύνδεση αιμοπεταλίου-αιμοπεταλίου, διότι φαίνεται πως ο GPIIb μπορεί να λειτουργήσει ως υποδοχέας της Ρ-σελεκτίνης. Τέλος, περαιτέρω διερεύνηση απαιτεί η σύνδεση προ-θρομβωτικών μικροσωματιδίων στη Ρ-σελεκτίνη, που προέρχονται κυρίως από μονοκύτταρα που εκφράζουν TF, τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη του θρόμβου και του ινώδους [23], [25].



## A.7. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων

### A.7.1. Η αποθηκευτική βλάβη των αιμοπεταλίων

Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων στους 4°C αποτελούσε την κοινώς αποδεκτή μέθοδο συντήρησής τους. Στα τέλη της δεκαετίας του 60 όμως υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις ότι τα αιμοπετάλια που είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου έχουν υψηλότερο χρόνο επιβίωσης *in vivo* σε σχέση με τα παγωμένα [26]. Αυτό ήταν ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό των αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπεταλίων (RT-Room temperature), διότι η κύρια χρήση τους εκείνη την εποχή ήταν διατήρηση της αιμόστασης σε άτομα με χρόνια θρομβοκυτταροπενία [27].

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι παρόλο που η παρουσία μικροοργανισμών είναι μειωμένη στα παγωμένα αιμοπετάλια [28], προκύπτουν επίσης αλλαγές στη μορφολογία και τη λειτουργία τους. Μορφολογικά, τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν αλλαγή του δισκοειδούς σχήματός τους προς σφαιρικό με ακανθωτές προεκβολές, μείωση του μέσου όγκου τους. Επίσης, κατά τη ψύξη τα μόρια των υπομονάδων της πρωτεΐνης GPIba (υποδοχέα του παράγοντα von Willebrand) σχηματίζουν συμπλέγματα τα οποία προκαλούν συσσώρευση μορίων N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης, που αναγνωρίζονται εύκολα από τα ηπατικά μακροφάγα, με αποτέλεσμα την ταχεία εκκαθάρισή των αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία [26]. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η συσσώρευση ολόκληρων μορίων του GPIba υποδοχέα και ακολούθως του παράγοντα von Willebrand, που οδηγεί σε αυξημένη παρουσία ενδοκυτταρικού ασβεστίου, και μετέπειτα σε έκθεση γαλακτόζης και φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου [29].

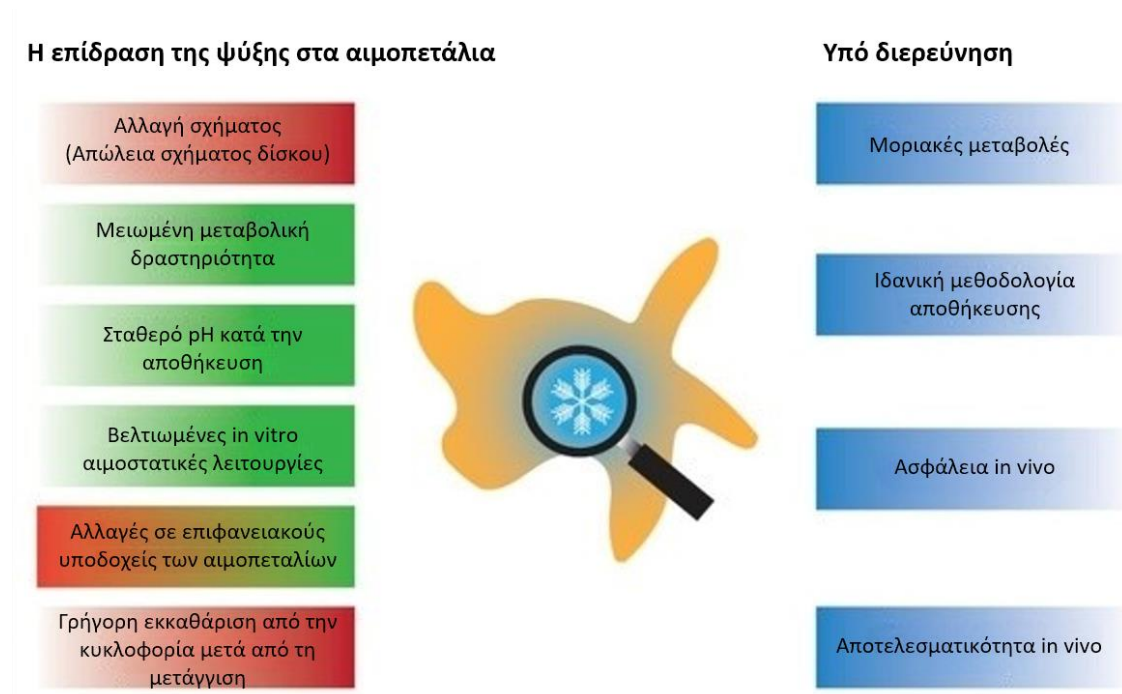
### A.7.2. *In vitro* χαρακτηριστικά των παγωμένων αιμοπεταλίων

Η *in vitro* ανάλυση των CPs σε σχέση με τα RT αιμοπετάλια βασίζεται στον προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων της λειτουργίας και του μεταβολισμού τους. Αρχικά, ο αριθμός των CP αιμοπεταλίων φαίνεται πως είναι σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τα αιμοπετάλια σε RT, μετά από 9 μέρες αποθήκευσης [30]. Από την άλλη, τα στοιχεία του μεταβολισμού των CPs έδειξαν χαμηλότερα επίπεδα γαλακτικού οξέος και γλυκόζης, που πιθανότατα οφείλονται στον πιο αργό ρυθμό μεταβολισμού των CPs, λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας αποθήκευσης [31] [32].

Ένας βασικός δείκτης ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, η P-σελεκτίνη, φαίνεται πως είναι πιο υψηλός στα CPs αιμοπετάλια σε σχέση με τα RT, ειδικά κατά τις πρώτες μέρες αποθήκευσης. Αυτή η ιδιότητα φαίνεται επίσης πως παρατηρείται όχι μόνο σε αιμοπετάλια από αιμοπεταλιαφαίρεση, αλλά και σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια από ολικό αίμα [33]–[35]. Εξίσου υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης παρατηρήθηκαν από τα επίπεδα ιντεγκρίνης αIIbβ3, όπου τα CS αιμοπετάλια είχαν υψηλότερα επίπεδα στις 15 μέρες αποθήκευσης, σε σχέση με τα αιμοπετάλια σε RT των 5 ημερών. Εκτός όμως από την ενεργοποίηση ιδιαίτερα σημαντικοί είναι οι δείκτες απόπτωσης των αιμοπεταλίων, ιδιαίτερα αφού έχει γίνει αποδεκτή η υπόθεση ότι τα αιμοπετάλια διαθέτουν δικούς τους μηχανισμούς απόπτωσης, αν και η κλινική τους σημασία κατά τη μετάγγιση δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς [36]. Σε ένα βασικό δείκτη της απόπτωσης των αιμοπεταλίων, η κασπάση 3, δε βρέθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα σε RT και CP αιμοπετάλια σε ένα διάστημα 7 ημερών. Είναι λοιπόν πιθανό ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης είναι ένα από τα τελικά στάδια της απόπτωσης και εμφανίζεται με χρονική καθυστέρηση [31]. Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, εξίσου σημαντικός δείκτης της απόπτωσης αλλά και της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, ήταν υψηλότερη στα CS αιμοπετάλια από τα RT, μετά από 7 μέρες αποθήκευσης [37].

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά μας οδηγούν στην υπόθεση ότι, παρόλο που τα παγωμένα αιμοπετάλια εμφανίζουν περιορισμένη *in vivo* επιβίωση με τις γνωστές μεθόδους

αποθήκευσης, μπορεί να προσφέρουν καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε ασθενείς με οξεία αιμορραγία, λόγω του μεγαλύτερου αιμοστατικού δυναμικού τους [38]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι, τα RT αιμοπετάλια πρέπει να αποθηκευτούν με συσκευές που φροντίζουν για τη συνεχή ανάδευσή τους, κάτι που δεν απαιτείται στα CSP αιμοπετάλια.



Εικόνα 2: Βασικά χαρακτηριστικά και μορφολογικές μεταβολές των παγωμένων αιμοπεταλίων. Το περιεχόμενο της εικόνας έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή [27]

### A.7.3. Τα παγωμένα αιμοπετάλια και *in vivo* κλινικές μελέτες

Ο αριθμός από πρόσφατες, ελεγχόμενες κλινικές μελέτες στην *in vivo* αποτελεσματικότητα των CSP αιμοπεταλίων σε σχέση με τα RT αιμοπετάλια παραμένει περιορισμένος, διότι ένα σημαντικό ποσοστό των ερευνών διεξήχθησαν τις δεκαετίες του 60 και του 70, στα πρώτα χρόνια της χρήσης των παραγώγων. Είναι επίσης δύσκολο να συγκριθούν τα αποτελέσματα των νεότερων και παλαιότερων μελετών, διότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον τρόπο συλλογής των αιμοπεταλίων. Τα παράγωγα σήμερα προέρχονται από αιμοπεταλιαφαίρεση, σε αντίθεση με τις προγενέστερες μελέτες που χρησιμοποιούσαν αιμοπετάλια από ολικό αίμα. Το μέσο αποθήκευσης των αιμοπεταλίων (πλαστικό PL 146) έχει πλέον αντικατασταθεί από μια ποικιλία υλικών, και δυστυχώς αρκετές μελέτες δεν το αναφέρουν, παρόλο που μπορεί να επηρεάσει τη βιωσιμότητα των αιμοπεταλίων [39][29]. Περαιτέρω έρευνες επίσης απαιτούνται για να εξακριβωθούν οι διαφορές στα διαφορετικά μέσα αποθήκευσης και πως αυτά επηρεάζουν την λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων (πλάσμα, προσθετικά διαλύματα αιμοπεταλίων ή PAS κλπ. Τέλος, υπήρξαν διαφορές στους ασθενείς που συμμετείχαν (άτομα με οξεία αιμορραγία, άτομα που τους χορηγήθηκε αντιπηκτικό όπως ασπιρίνη, άτομα με χρόνια θρομβοκυτταροπενία κλπ), στο χρόνο για τον οποίο ήταν αποθηκευμένα τα αιμοπετάλια, καθώς στην παράμετρο που μελετήθηκε (πχ χρόνος ροής αίματος, έλεγχος χρόνου επιβίωσης ραδιοσημασμένων αιμοπεταλίων κλπ).

Οι διαφορές στις μεθοδολογίες των ερευνών ίσως να εξηγούν την έλλειψη κατατοπιστικών αποτελεσμάτων για την αποτελεσματικότητα των CSP αιμοπεταλίων. Είναι επίσης πιθανό ότι η αιμοστατική λειτουργία των CSPs να περιορίζεται σε μία μόνο ώρα μετά από τη μετάγγιση, παρόλο που τα αιμοπετάλια παραμένουν στην κυκλοφορία μέχρι και 24 ώρες από τη μετάγγιση [40]. Μια πρόσφατη όμως μελέτη σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε εγχείρηση ανοιχτής καρδιάς, όπου μετρήθηκε ο όγκος του αίματος που αφαιρέθηκε μετεγχειρητικά, παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη αιμορραγία στους ασθενείς που χορηγήθηκαν CSP αιμοπετάλια αποθηκευμένα για 14 ημέρες, σε σχέση με τα άτομα που έλαβαν RT αιμοπετάλια [41]. Μια άλλη μελέτη χρησιμοποίησε σημασμένα RT και CP αιμοπετάλια για μετάγγιση σε ασθενείς και μετρήθηκε η *in vivo* ανάκτησή τους

μετά από 2 ώρες, και βρέθηκε ότι η ανάκτηση των CPs ήταν μικρότερη καθώς ο χρόνος αποθήκευσης των αιμοπεταλίων αυξανόταν. Συγκεκριμένα, τα CPs που είχαν αποθηκευτεί για 20 μέρες είχαν τη μισή ανάκτηση σε σχέση με αυτά των 4 ημερών [30], [31]. Παρόλα αυτά, η Αμερικανική Οργάνωση για τις Τράπεζες Αίματος (AABB), στην έκθεσή της για το 2017, θεωρεί πως τα παγωμένα αιμοπετάλια είναι κατά το ελάχιστο αποτελεσματικά για προαιρετικές χειρουργικές επεμβάσεις, όπου παρουσιάζεται αιμορραγία [42][43].

Περισσότερες κλινικές μελέτες λοιπόν απαιτούνται για να αποδειχτεί η *in vivo* ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των CSP αιμοπεταλίων για τη ρύθμιση της αιμόστασης, ώστε να εξακριβωθούν οι ακριβείς συνθήκες, ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσης, καθώς και οι κλινικές καταστάσεις στις οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

#### A.7.4. Εναλλακτικοί μέθοδοι/συνθήκες αποθήκευσης των αιμοπεταλίων

##### A.7.4.1. Καθυστερημένη αποθήκευση αιμοπεταλίων

Μια διαφορετική πρόταση για τη διαχείριση των αιμοπεταλίων είναι η αρχική αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία δωματίου και σε δεύτερο χρόνο η αποθήκευσή τους στο ψύχος. Στόχος αυτού του πρωτοκόλλου είναι ο περιορισμός της καταστροφής παραγώγων που δε χρησιμοποιούνται εγκαίρως. Σε μια μελέτη όπου RT αιμοπετάλια 4 ημερών μεταφέρθηκαν σε συνθήκες ψυγείου (21 συνολικά μέρες αποθήκευσης), τα παγωμένα αιμοπετάλια καθυστερημένης ψύξης (DCSPs) είχαν κυρίως παρόμοια *in vitro* χαρακτηριστικά με τα CS αιμοπετάλια [44]. Από την άλλη, ένα παρόμοιο πείραμα με τη ψύξη RT αιμοπεταλίων από την 7<sup>η</sup> μέρα έδειξε χειρότερα *in vitro* χαρακτηριστικά σε μεταβολικούς παράγοντες όπως τη γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ αλλά και σε αναλύσεις θρομβοελαστογραφίας, πιθανά λόγω του υψηλότερου χρόνου αποθήκευσης σε RT συνθήκες [32]. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα από την πρώτη μεγάλη μελέτη όπου έγιναν μεταγγίσεις DCSPs, είναι ενθαρρυντικά. Η μελέτη σύγκρινε 713 περιστατικά μετάγγισης RT (529) και DCSP (184) αιμοπεταλίων σε ασθενείς καρδιακών χειρουργείων. Οι ασθενείς που μεταγγίστηκαν με DCSPs είχαν αυξημένη πιθανότητα να χρειαστούν μετάγγιση μετά από την εγχείρηση και παρουσίασαν χαμηλότερο αριθμό αιμοπεταλίων. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά σε σχέση με τα RT στον αριθμό μονάδων που μεταγγίστηκαν ανά ασθενή, στη συχνότητα επιστροφής στο χειρουργείο λόγω εκ νέου αιμορραγίας, στη συνολική απώλεια αίματος και σε άλλες ανεπιθύμητες επιπλοκές. Έτσι, η έρευνα συμπεραίνει ότι η χρήση DCSPs μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια και πιθανώς να είναι ιδανική σε καταστάσεις ελλείψεων παραγώγων αιμοπεταλίων, ενώ παράλληλα μειώνεται το κόστος μετάγγισης, ακόμα και αν χρειαστεί επιπλέον μετάγγιση μετεγχειρητικά. Ωστόσο απαιτείται η διεξαγωγή περισσότερων κλινικών ερευνών για να επιβεβαιωθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των DCSPs [45].

#### A.7.4.2. Κρυοσυντήρηση αιμοπεταλίων

Από τα πρώτα χρόνια της χρήσης των παραγώγων αιμοπεταλίων, στόχος ενός σημαντικού μέρους των ερευνητών είναι η παραγωγή ενός ασφαλούς και αποτελεσματικού προϊόντος αιμοπεταλίων που θα μπορεί να αποθηκευτεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα, σε μια προσπάθεια να αντιμετωπιστούν οι ελλείψεις των συστημάτων υγείας, ειδικά σε καταστάσεις όπως επείγοντα περιστατικά και σε απόμακρες περιοχές. Αυτό μπορεί να είναι εφικτό με την αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$ , παρουσία διαλύματος που προστατεύει τα κύτταρα από την εμφάνιση κρυστάλλων πάγου, όπως το διμέθυλοσουλφοξείδιο 6%, που έχει αναγνωριστεί ως το ιδανικό συντηρητικό [46]. *In vitro* μελέτες δίνουν στα κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια (CPPs) χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των παγωμένων (CPs), όπως απώλεια δισκοειδούς σχήματος, εξωτερίκευση των περιεχομένων των κοκκίων τους, αυξημένη έκφραση P-σελεκτίνης και φωσφατιδυλοσερίνης κλπ. [47]–[49] Μια *in vivo* μελέτη στην οποία έγινε μετάγγιση CPPs σε 9 άτομα με οξεία λευχαιμία (8) και non-Hodgkin λέμφωμα (1), χαρακτήρισε ως ασφαλή τα CPPs για μετάγγιση, διότι δεν παρατηρήθηκαν σοβαρά περιστατικά αιμορραγίας ή τοξικότητας λόγω του DMSO μετά τη μετάγγιση [50]. Παράλληλα, *in vitro* ανάλυση των παραγώγων έδειξε ότι τα αιμοπετάλια είχαν ικανοποιητική δυνατότητα για ενεργοποίηση, μετά από τη διέγερσή τους [50]. Μια παλαιότερη μελέτη όπου επίσης έγινε μετάγγιση αιμοπεταλίων σε ασθενείς με λευχαιμία από το κέντρο για καρκίνο του Πανεπιστημίου του Maryland, έδωσε ενθαρρυντικά δεδομένα για την ασφάλεια των παραγώγων [51]. Επίσης, μια μεγάλη μελέτη διεξήχθη στο χρονικό διάστημα 2006-2010 από το στρατό της Ολλανδίας, στην οποία συμμετείχαν τραυματίες στρατιώτες του πολέμου στο Αφγανιστάν και δέχτηκαν μαζικές μεταγγίσεις αιμοπεταλίων, πλάσματος και αίματος. Τα αποτελέσματα μετά από σχεδόν 1100 μεταγγίσεις έδειξαν ασφάλεια αλλά και καλύτερα ποσοστά επιβίωσης με τη χρήση των CPPs [52], [53]. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την καλύτερη αντιμετώπιση μιας σειράς αιμορραγικών καταστάσεων, ενώ δύναται να βελτιώσουν το συχνό φαινόμενο ελλείψεως προϊόντων

μετάγγισης, σε περιπτώσεις όπως σε αλλοανοσοποιημένους ασθενείς, σε μεγάλα ατυχήματα, σε απομακρυσμένες περιοχές κ.α. Ένα από τα βασικά εμπόδια σε αυτή την προσπάθεια, εκτός από τη νομική έγκριση, είναι ο σχεδιασμός κλειστών συστημάτων που επιτρέπουν τη μακροχρόνια αποθήκευση των παραγώγων χωρίς κίνδυνο επιμόλυνσης, και σε αποδεχτό κόστος [52].



## **A.8. Προσθετικά διαλύματα αιμοπεταλίων**

Εκτός από τη θερμοκρασία αποθήκευσης, από τη δεκαετία του 80 ερευνητές προσπάθησαν να τροποποιήσουν τη σύσταση του μέσου αποθήκευσης των παραγώγων, αντικαθιστώντας το πλάσμα με προσθετικά διαλύματα (Platelet additive solutions/PAS). Ο στόχος εκείνη την εποχή ήταν η μείωση της συγκέντρωσης του πλάσματος, διότι θεωρούνταν ύποπτο για την πρόκληση της αποθηκευτικής βλάβης των αιμοπεταλίων. Αυτός ο σκοπός έγινε λιγότερο σημαντικός όταν ξεκίνησε η αποθήκευση των παραγώγων σε ασκούς που επέτρεπαν την ανταλλαγή αερίων και καλύτερη διατήρηση του pH, [53] αλλά η μελέτη των PAS συνεχίστηκε λόγω της εύρεσης νέων πιθανών οφελών, όπως την αυξημένη περίσσεια πλάσματος για κλασματοποίηση, λιγότερες αλλεργικές αντιδράσεις, μειωμένος τίτλος Αντι-A, Αντι-B αντισωμάτων κ.α [52].

Ο κύριος ρόλος των PAS είναι η υποστήριξη της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων. Ένα βασικό συστατικό των PAS είναι το οξικό οξύ, λόγω της ικανότητας του να αυξάνει το pH του περιβάλλοντος καθώς οξειδώνεται, καθώς και μέσω της μείωσης του μεταβολισμού της γλυκόζης, και κατά συνέπεια του γαλακτικού οξέως [54]. Άλλα συστατικά που μπορεί να περιέχονται σε PAS είναι το κάλιο, το μαγνήσιο, τα φωσφορικά, η γλυκόζη, το ασβέστιο κ.α. [55]–[59]. *In vitro* μελέτες επιβεβαιώνουν το ρόλο του οξικού οξέως στη μείωση του μεταβολισμού της γλυκόζης [59], [60]. Η προσθήκη καλίου και μαγνησίου φαίνεται πως είναι επίσης σημαντική καθώς μειώνει την παραγωγή γαλακτικού οξέως και την έκφραση p-σελεκτίνης και φωσφατιδυλοσερίνης [58]. Παράλληλα, μελέτες δείχνουν ότι η χρήση των PAS μπορεί επίσης να βελτιώσει τα *in vitro* χαρακτηριστικά αιμοπεταλίων που υφίστανται απενεργοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, όπως η έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης (από μέτρηση αννεξίνης α5) [61], ενώ χαμηλότερα επίπεδα P-σελεκτίνης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων παρατηρήθηκαν σε πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν παγωμένα αιμοπετάλια, σε συνδυασμό με άλλα ενθαρρυντικά δεδομένα [62].

Οι πρώτες κλινικές δοκιμές που έλεγξαν το ποσοστό αύξησης του αριθμού των αιμοπεταλίων μετά από μετάγγιση παραγώγων με PAS έδειξαν μειωμένο αριθμό σε

σχέση με τα παράγωγα πλάσματος [63], [64]. Όμως, αλλαγές στη σύσταση των PAS, όπως το PAS-C, οδήγησε σε καλύτερη ανάκτηση αιμοπεταλίων σε σχέση με παλαιότερα προσθετικά διαλύματα και παρόμοια τάση για αιμορραγία με αυτή των παραγώγων με πλάσμα, με βάση μελέτη που έγινε σε άτομα με αιματολογικές κακοήθειες [65]. Μερικές πρώτες μελέτες για ένα πιο πρόσφατο προσθετικό διάλυμα, γνωστό ως PAS-E, δείχνουν βελτιωμένη ανάκτηση αιμοπεταλίων σε σχέση με το PAS-C, και παρόμοια αυτής των προϊόντων πλάσματος, αν και ο συνολικός αριθμός μελετών παραμένει περιορισμένος. [64], [66], [67]. Παράλληλα, ένα κοινό εύρημα ενός σημαντικού αριθμού μελετών σε PASs είναι μειωμένη συχνότητα αλλεργικών αντιδράσεων κατά 50%, φαινόμενο που πιθανότητα οφείλεται στη σημαντικά μικρότερη παρουσία πλάσματος στο διάλυμα [64]. Μια άλλη μελέτη διαχώρισε τις αλλεργικές από τις πυρετικές αντιδράσεις, έδειξε μειωμένες αλλεργικές αντιδράσεις με τη χρήση PAS, αλλά παρόμοια συχνότητα πυρετικών αντιδράσεων σε σχέση με αιμοπετάλια πλάσματος [68]. Η μειωμένη συχνότητα αλλεργικών αντιδράσεων έχει επίσης ως όφελος το μειωμένο κόστος φροντίδας του ασθενή, ειδικά εφόσον χρησιμοποιηθεί PAS χωρίς πλάσμα, και η περίσσεια πλάσματος δοθεί για κλασματοποίηση [69].

### A.9. Απενεργοποίηση/Μείωση παθογόνων σε παράγωγα αιμοπεταλίων

Οι τεχνολογίες μείωσης παθογόνων (Pathogen reduction technologies/PRTs) αποτελούν μια ακόμη προσπάθεια βελτίωσης των παραγώγων αιμοπεταλίων. Βασίζονται στην προσθήκη φωτοχημικών ενώσεων οι οποίες παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας παρεμβάλλονται στο γενετικό υλικό του παθογόνου. Για παράδειγμα, στο σύστημα Intercept χρησιμοποιείται το μόριο amotosalen, το οποίο παρουσία ακτινοβολίας 320-400nm δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς με τις βάσεις πυριμιδίνης στα νουκλεϊκά οξέα του παθογόνου, εμποδίζοντας την αντιγραφή και μεταγραφή του γονιδιώματος [70]. Το αποτέλεσμα είναι ένα προϊόν αιμοπεταλίων στείρο από ένα μεγάλο εύρος παθογόνων. Αξίζει όμως να σημειωθεί πως αυτή η επεξεργασία μπορεί να μην είναι αποτελεσματική ενάντια ορισμένων παθογόνων, όπως σε ιούς που δεν έχουν ιικό φάκελο, πιθανώς λόγω της παρουσίας του ιικού καψιδίου [71], [72].

Τα *in vitro* και μεταβολικά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων που έχουν υποστεί κατεργασία με PRTs μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το προϊόν που έχει χρησιμοποιηθεί (Intercept, Mirasol, Theraflex-UVC), αλλά ένα βασικό κοινό χαρακτηριστικό τους φαίνεται πως είναι αυξημένος μεταβολισμός, που συνεπάγεται αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος και συχνά μειωμένο pH. Επίσης, συχνό εύρημα είναι αυξημένοι δείκτες ενεργοποίησης και απόπτωσης, όπως η έκφραση επιφανειακής Ρ-σελεκτίνης και Φωσφατιδυλοσερίνης, μειωμένη απόκριση των αιμοπεταλίων σε αγωνιστές όπως το ADP, τη θρομβίνη και το κολλαγόνο [73]–[75], καθώς και μορφολογικές αλλαγές όπως απώλεια του δισκοειδούς σχήματος, ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε [76]–[81]. Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης μια από τις πρώτες *in vitro* μελέτες που χρησιμοποίησε PRTs σε συνδυασμό με παγωμένα και κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια. Τα κύρια ευρήματα περιλαμβάνουν ενισχυμένα προπηκτικά χαρακτηριστικά στα παγωμένα αιμοπετάλια όπως σημαντικά αυξημένη έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης και παραγωγή θρομβίνης, σε σχέση με μη-PRT παγωμένα και RT αιμοπετάλια. Περισσότερες έρευνες είναι απαραίτητες για την εξακρίβωση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας των PRTs σε συνδυασμό με παγωμένα αιμοπετάλια, καθώς η χρήση των PRTs είναι υποχρεωτική για μια σειρά από

ευρωπαϊκές χώρες, όπως το Βέλγιο, τη Γαλλία και την Ελβετία [82]. Ένας πιθανός τρόπος μείωσης της αποθηκευτικής βλάβης από τη χρήση PRTs είναι η χρήση προσθετικών διαλυμάτων όπως του PAS-E το οποίο σε εργαστηριακή μελέτη μείωσε σημαντικά την τιμή της έκφρασης της Αννεξίνης A5, αλλά όχι του CD62P [83].

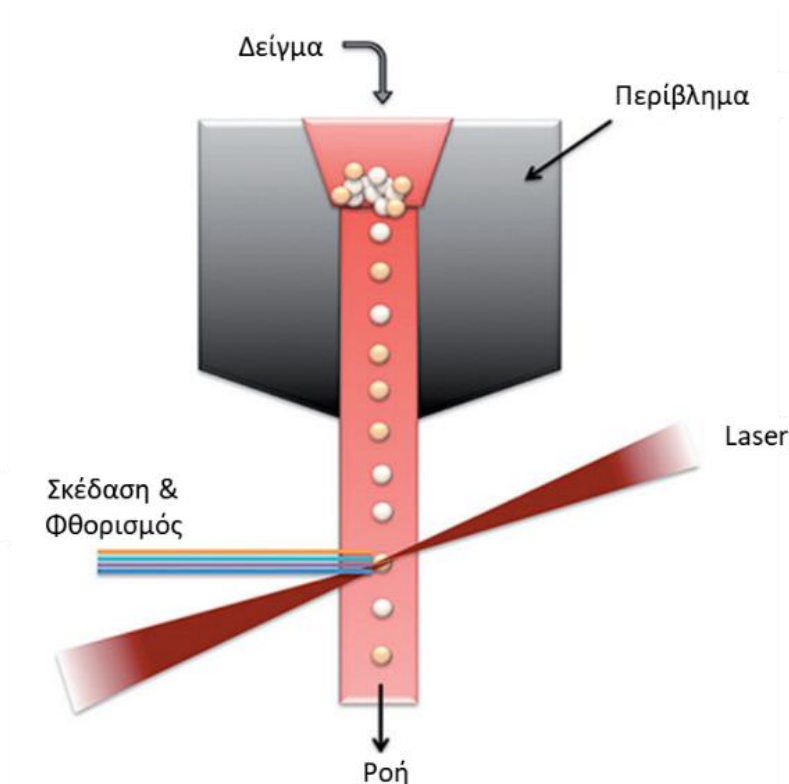
*In vivo* μελέτες για τα τρία PRTs δείχνουν σε μερικές μελέτες μείωση στη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων μετά από τη μετάγγιση (Intercept και μικρή μείωση σε Mirasol, όχι σε Therflex-UVC) [84]–[87] και μεγαλύτερη ανάγκη για μεταγγίσεις και υψηλότερο ρίσκο για περιστατικά αιμορραγίας μετεγχειρητικά (Intercept) [86], [88], αν και αυτό δεν επιβεβαιώνεται σε όλες τις μελέτες [89]. Το βασικό κοινό χαρακτηριστικό για όλες τις παραπάνω μελέτες είναι ότι η χρήση PRTs δεν οδηγεί σε αύξηση των μη επιθυμητών αντιδράσεων σε σχέση με τα απλά παράγωγα αιμοπεταλίων [84]–[89]. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η μη εμφάνιση περιστατικών Graft vs Host disease (GVHD), η οποία είναι μια συστηματική διαταραχή κατά την οποία λευκά αιμοσφαίρια του παραγωγού αιμοπεταλίων αντιδρούν ενάντια του ασθενή. Αυτό το φαινόμενο τυπικά αποτρέπεται με την επεξεργασία του παραγωγού με ραδιενεργή ακτινοβολία, όμως φαίνεται ότι αυτό δεν είναι απαραίτητο στα PRTs, λόγω της ικανότητάς τους να απενεργοποιούν τα λευκά αιμοσφαίρια [90], [91]. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι τα PRTs μπορούν να βελτιώσουν την ασφάλεια των προϊόντων αιμοπεταλίων διατηρώντας χαμηλό τον κίνδυνο μόλυνσης και επικίνδυνων αντιδράσεων μετά από τη μετάγγιση, αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να εξακριβωθεί η ασφάλειά τους. Πρέπει επίσης να υπολογιστεί το αυξημένο κόστος που μπορεί να προκύψει από τη μεγαλύτερη ποσότητα αιμοπεταλίων που μπορεί να χρειαστεί σε μετάγγιση με PRTs, ώστε το εκάστοτε σύστημα υγείας να μπορεί να λάβει αποφάσεις υπέρ ή κατά της χρήσης τους, ανάλογα με το επιδημιολογικό πρότυπο της περιοχής [76].

#### A.10. Βασικές αρχές της κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσης πολλαπλών χαρακτηριστικών διαφορετικών ομάδων κυττάρων που βρίσκονται σε ένα διάλυμα. Η μέθοδος βασίζεται στη διαφορετική σκέδαση που παρουσιάζουν τα κύτταρα, όταν αυτά ακτινοβοληθούν με μία δέσμη διεγερμένης ακτινοβολίας (Laser), καθώς και στο φθορισμό που μπορούν να εκπέμπουν κύτταρα που έχουν σημανθεί με μια φθορίζουσα ουσία ή φθορίζον αντίσωμα.

### A.10.1 Το υδροδυναμικό σύστημα ροής

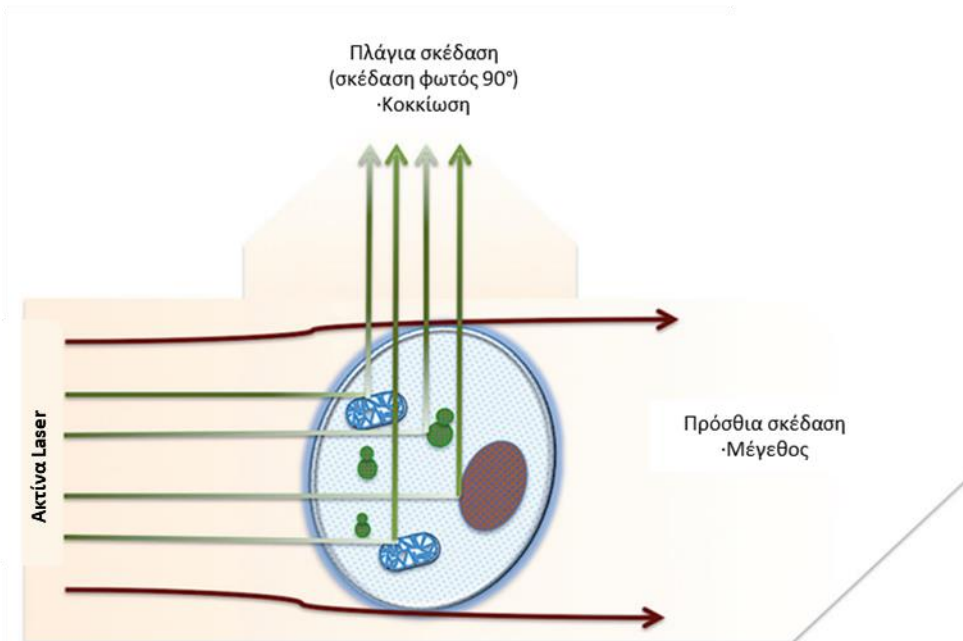
Το σύστημα ροής αποτελείται από δύο μέρη: το διάλυμα ροής (sample), και το διάλυμα του περιβλήματος (sheath), το οποίο είναι κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα, όπως ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά (PBS). Το διάλυμα του δείγματος και του περιβλήματος διέρχονται μαζί στο θάλαμο ροής. Στο θάλαμο ροής η πίεση του υγρού του περιβλήματος (sheath) είναι μικρότερη από την πίεση του υγρού του δείγματος, που βρίσκεται στο κέντρο του θαλάμου. Αυτή η διαφορά πίεσης προκαλεί το φαινόμενο της υδροδυναμικής εστίασης, με βάση το οποίο τα κύτταρα ακολουθούν μια γραμμική ροή και διέρχονται το ένα μετά το άλλο από τη δέσμη φωτός, κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για τη σωστή ανάλυση κάθε ξεχωριστού κυττάρου. Η πίεση της ροής μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί, ανάλογα με τα κύτταρα, τις παραμέτρους που εξετάζονται, καθώς και την ακρίβεια που απαιτείται [92].



Εικόνα 3: Το υδροδυναμικό σύστημα ροής του κυτταρομέτρου. Απεικονίζονται οι ροές του δείγματος και περιβλήματος, που ενώνονται πριν από τη δέσμη φωτός. Η εικόνα έχει τροποποιηθεί με βάση την πηγή [92].

### A.10.2. Το οπτικό σύστημα του κυτταρομέτρου και η επεξεργασία του σήματος

Όταν τα κύτταρα περνούν το ένα μετά το άλλο δια μέσου της δέσμης laser, προκύπτουν δύο είδη σήματος, η πρόσθια σκέδαση (FSC) και η πλάγια σκέδαση (SSC). Η πρόσθια σκέδαση προκύπτει από την περίθλαση του φωτός που ανιχνεύεται στον ίδιο άξονα με τη δέσμη φωτός, και είναι ανάλογη του μεγέθους του κυττάρου. Η πλάγια σκέδαση, αποτελεί προϊόν της διάθλασης και αντανάκλασης του φωτός πάνω στο κύτταρο, ανιχνεύεται σε γωνία 90° από το Laser και μας δίνει πληροφορίες για την κοκκίωση ή αλλιώς εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου. Η ακτινοβολία που προκύπτει από το φθορισμό ενός φθοριοχρώματος ανιχνεύεται επίσης ως πλάγια σκέδαση[92], [93].



Εικόνα 4: Η σκέδαση του φωτός. Η πρόσθια σκέδαση (FSC) είναι ανάλογη με το μέγεθος του κυττάρου, ενώ η πλάγια σκέδαση (SSC) είναι ανάλογη της πολυπλοκότητας ή κοκκίωσης του κυττάρου. Η εικόνα έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή [92].

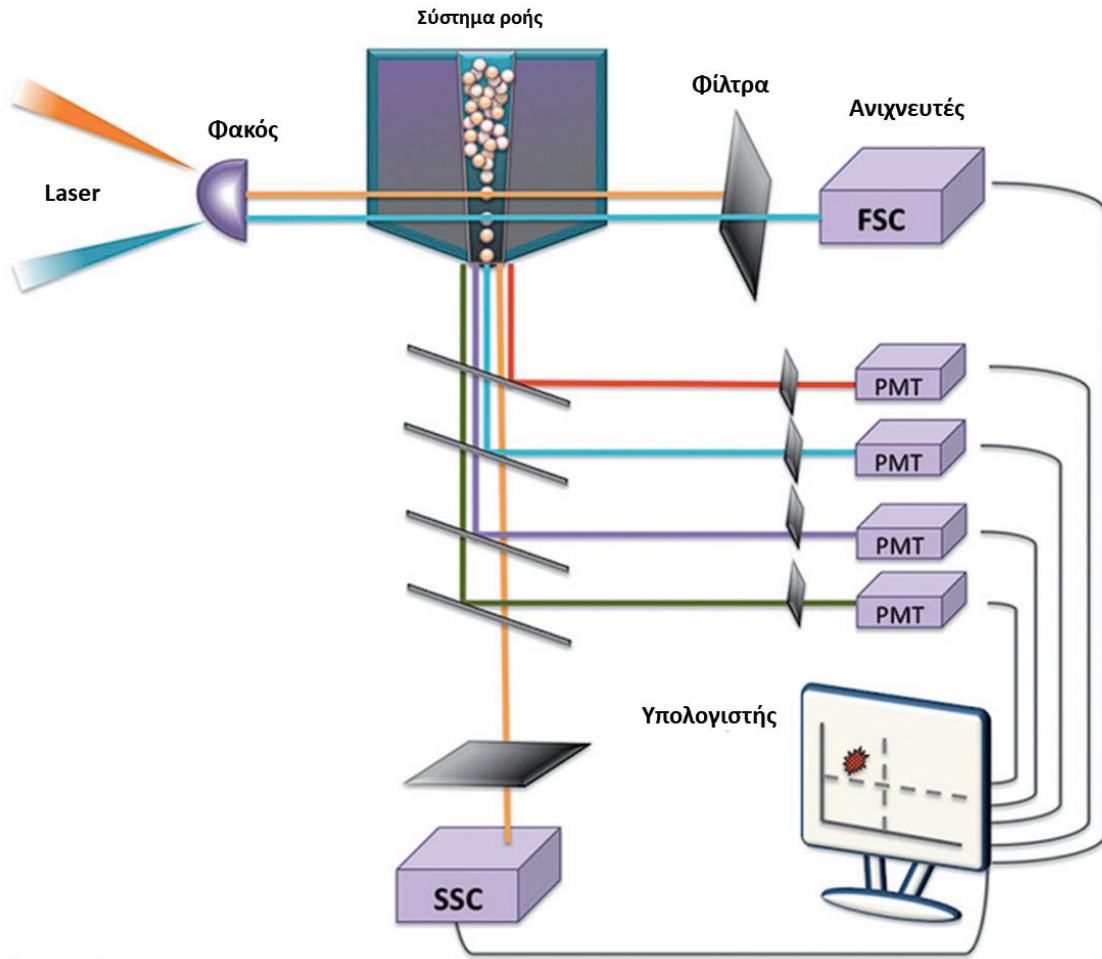
Ένα κυτταρόμετρο μπορεί να είναι εξοπλισμένο με μια σειρά από διαφορετικά συστήματα Laser, ανάλογα με τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, ένα laser αργού που έχει μήκος κύματος διέγερσης τα 488nm, μπορεί να διεγείρει χρωστικές όπως την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) και να δώσει

εκπομπή ακτινοβολίας σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Υπάρχουν όμως και συμπληρωματικά laser που διεγείρουν χρωστικές στο υπεριώδες φάσμα (300-400nm) ή στο “κόκκινο” (630nm) εύρος του ορατού φάσματος.

Η σκέδαση του φωτός ανιχνεύεται με ένα σύστημα που αποτελείται από φίλτρα που διαχωρίζουν τα σήματα ακτινοβολίας, καθώς και καθρέφτες που κατευθύνουν το σήμα στον ανιχνευτή. Η ειδικότητα του ανιχνευτή για ένα συγκεκριμένο φθοριόχρωμα εξαρτάται από το φίλτρο που χρησιμοποιείται. Οι διαφορετικοί τύποι των διαθέσιμων φίλτρων μπορούν να επιτρέψουν είτε τη δίοδο μηκών κυμάτων που βρίσκονται κοντά στο μήκος κύματος της μέγιστης εκπομπής του φθοριοχρώματος, είτε τη δίοδο μηκών κυμάτων που είναι ίσα ή μεγαλύτερα/μικρότερα ενός επιλεγμένου μήκους κύματος.

Τα σήματα φωτός που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση Laser-κυττάρου ανιχνεύονται από δύο είδη ανιχνευτών, τις φωτοδιόδους (PDs) και τους φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs), οι οποίοι μετατρέπουν το φωτεινό σήμα σε ηλεκτρικό ρεύμα. Η κύρια διαφορά μεταξύ φωτοδίοδων και φωτοπολλαπλασιαστών είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία των φωτοπολλαπλασιαστών, η οποία τους καθιστά ιδανικούς για την ανίχνευση των πιο αδύναμων σημάτων που προκύπτουν από την SSC, ενώ οι φωτοδιόδοι ανιχνεύουν την FSC. Το παραγόμενο αναλογικό σήμα τελικά ενισχύεται και μετατρέπεται σε ψηφιακό από ειδικούς μετατροπείς, ώστε να μπορέσει να γίνει η ανάλυση των δεδομένων στον υπολογιστή [92].



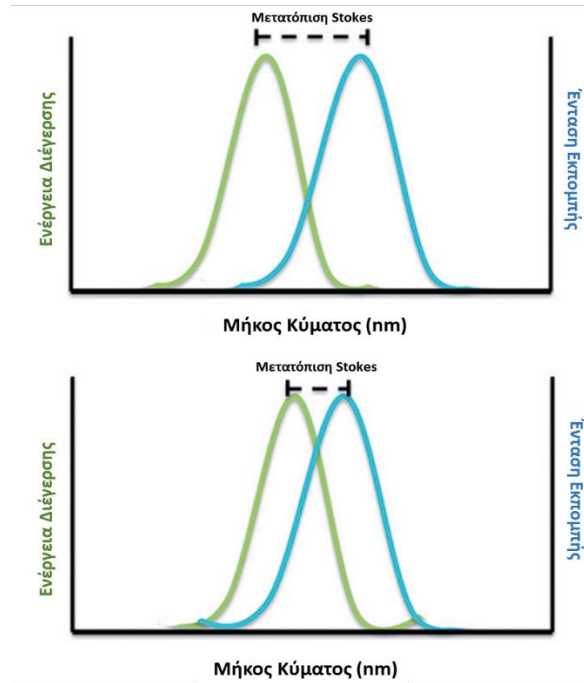


Εικόνα 5: Το σύστημα ανάλυσης του σήματος του κυτταρομέτρου. Απεικονίζονται το σύστημα ροής, τα φίλτρα και οι ανιχνευτές που ενισχύουν και μεταφέρουν το σήμα ακτινοβολίας στον υπολογιστή. Η εικόνα έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή [92].

### A.10.3. Τα φθοριοχρώματα

Ο αριθμός των κυτταρικών στοιχείων που παρουσιάζουν εγγενή φθορισμό είναι ιδιαίτερα περιορισμένος, όπως και η χρησιμότητα των σημάτων που παρέχουν. Για αυτό το λόγο, η χρώση των κυττάρων με φθοριοχρώματα βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού των χαρακτηριστικών τους, όπως την κατανομή διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών, την ύπαρξη ή μη διαφόρων επιφανειακών υποδοχέων ή εσωτερικών οργανιδίων, την ενζυμική δραστηριότητα, την κυτταρική απόπτωση κλπ. Η σύνδεση των φθοριοχρωμάτων με τις παραπάνω δομές συχνά απαιτεί τη χρήση αντισώματος που είναι προσδεμένο στο φθοριόχρωμα, ειδικά όταν θέλουμε να μελετήσουμε συγκεκριμένα κυτταρικά αντιγόνα, όμως πολλές χρωστικές που έχουν στόχο ριβονουκεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, την κυτταρική μεμβράνη κλπ δεν απαιτούν τη χρήση αντισώματος.

Το κύριο χαρακτηριστικό ενός φθοριοχρώματος είναι το φάσμα απορρόφησης όπου μπορεί να διεγερθεί, καθώς και το φάσμα εκπομπής όπου παρατηρείται φθορισμός. Μέσα σε αυτά τα φάσματα υπάρχουν επίσης και μέγιστες τιμές, όπου πάντοτε το μήκος κύματος με τη μέγιστη τιμή απορρόφησης, προκαλεί τη μέγιστη εκπομπή ακτινοβολίας. Όταν το διεγερμένο από ακτινοβολία φθοριόχρωμα εκπέμπει ακτινοβολία για να μεταπέσει στη χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, η ακτινοβολία εκπομπής έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος από αυτό της απορρόφησης. Η διαφορά αυτή μεταξύ των μηκών κυμάτων της μέγιστης απορρόφησης και της μέγιστης εκπομπής είναι γνωστή ως μετατόπιση Stokes. Όσο μεγαλύτερη η μετατόπιση κατά Stokes, τόσο πιο εύκολος είναι ο διαχωρισμός των σημάτων με τη χρήση οπτικών φίλτρων [92].



Εικόνα 6: Τα φάσματα απορρόφησης (πράσινη γραμμή) και εκπομπής (μπλε γραμμή) ενός φθοριοχρώματος. Η διαφορά των μηκών κύματος μεταξύ της μέγιστης απορρόφησης και εκπομπής είναι γνωστή ως μετατόπιση Stokes. Μεγαλύτερη μετατόπιση κατά Stokes συνεπάγεται καλύτερο διαχωρισμό της ακτινοβολίας διέγερσης και εκπομπής. Η εικόνα έχει προσαρμοστεί με βάση την πηγή. [92]

#### A.10.4. Αντιστάθμιση του σήματος φθορισμού

Λόγω του ευρέως φάσματος εκπομπής των φθοριοχρωμάτων, είναι πιθανή η αλληλοεπικάλυψη αυτών των φασμάτων όταν χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερα φθοριοχρώματα. Αυτή η αλληλοεπικάλυψη του σήματος έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ψευδώς θετικών σημάτων για πολλαπλά φθοριοχρώματα. Το κυτταρόμετρο έχει τη δυνατότητα να αφαιρέσει αυτόν το θόρυβο με μια διαδικασία γνωστή ως αντιστάθμιση χρώματος. Αρχικά, γίνεται ανάλυση control δείγματος όπου το δείγμα εξετάζεται ξεχωριστά για κάθε φθοριόχρωμα. Με βάση αυτές τις μετρήσεις, το κυτταρόμετρο υπολογίζει το ποσοστό της αλληλοεπικάλυψης του ενός χρώματος στο άλλο, και υπολογίζει ένα παράγοντα με βάση τον οποίο αφαιρείται ο θόρυβος που παρατηρείται από την αλληλοεπικάλυψη των φασμάτων εκπομπής.

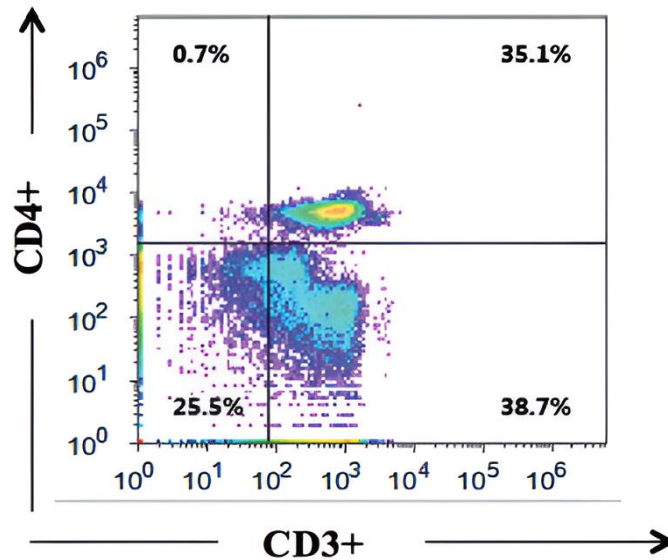
### **A.10.5. Ανάλυση αποτελεσμάτων**

Ο βασικός στόχος της επεξεργασίας των δεδομένων που προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής, είναι να αφαιρέσουμε τα μη επιθυμητά στοιχεία από τα δεδομένα μας (νεκρά κύτταρα, θραύσματα κυττάρων, μη επιθυμητούς τύπους κυττάρων κλπ). Αυτή η διαδικασία γίνεται με τη χρήση πυλών (gates), με τις οποίες μπορούμε να σχεδιάσουμε μια περιοχή (ή πολλές) μέσα στο γράφημά μας, μέσα στην οποία θα βρίσκονται τα κύτταρα που ερευνώνται. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται η σήμανση των θετικών πληθυσμών με γραφήματα ("gating").

Υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι απεικόνισης των δεδομένων ενός κυτταρομέτρου. Ένας τρόπος είναι η χρήση ενός βασικού ιστογράμματος. Γενικά, το ιστόγραμμα είναι μια γραφική παράσταση δύο αξόνων ( $x$  και  $y$ ) που απεικονίζει τη συχνότητα (άξονας  $y$ ) με την οποία παρατηρείται μια συγκεκριμένη αριθμητική τιμή (άξονας  $x$ ), για ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Στην κυτταρομετρία, ο  $x$  άξονας αντιπροσωπεύει την τιμή του σήματος φθορισμού σε αριθμό καναλιών (channel count), ενώ ο  $y$  άξονας δείχνει τον αριθμό των γεγονότων (events) που αντιστοιχούν στο σήμα φθορισμού. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα γράφημα με μία συνήθως κορυφή, εκτός αν αναλυθεί ένα μεικτός πληθυσμός κυττάρων με διαφορετικά χαρακτηριστικά.

Ένας άλλος εξίσου σημαντικός τρόπος απεικόνισης των δεδομένων είναι με τη χρήση ενός στικτογράμματος (dot plot). Σε αυτόν τον τύπο γραφήματος οι δύο άξονες αντιπροσωπεύουν μια διαφορετική παράμετρο η κάθε μία, οπότε έχουμε ταυτόχρονη παρατήρηση δύο δεδομένων φθορισμού. Το κάθε γεγονός που καταγράφεται κατά την ανάλυση ως ένα σημείο στο γράφημα, η θέση του οποίου εξαρτάται από το φθορισμό που δίνει για το κάθε σήμα σκέδασης. Το στικτόγραμμα μπορεί επίσης να περιέχει δύο κάθετες γραμμές οι οποίες χωρίζουν το γράφημα σε τέσσερα τεταρτημόρια. Το άνω δεξιό τεταρτημόριο αντιπροσωπεύει κύτταρα θετικά και για τους δύο ελεγχόμενους παράγοντες, το άνω αριστερό είναι θετικό μόνο για τον παράγοντα του άξονα  $y$ , το κάτω δεξιό είναι θετικό για τον παράγοντα του άξονα  $x$ , ενώ το κάτω αριστερό τεταρτημόριο είναι αρνητικό και για τις δύο παραμέτρους.

Η βασική χρήση ενός στικτογράμματος, που δε χρησιμοποιεί τεταρτημόρια, είναι η απεικόνιση ενός μεικτού πληθυσμού κυττάρων (πχ κύτταρα του αίματος), ώστε να μπορέσουμε με τη χρήση gate να απομονώσουμε μια συγκεκριμένη ομάδα των κυττάρων αυτών, ή για να αποκλείσουμε νεκρά κύτταρα ή υπολείμματα κυττάρων. Ένα παράδειγμα της χρήσης τεταρτημορίων είναι ο διαχωρισμός των CD3+ T-λεμφοκυττάρων, με τα κύτταρα που είναι επίσης T-Βοηθητικά CD4+.



Εικόνα 7: Στικτόγραμμα δύο παραμέτρων όπου αναλύθηκε δείγμα μονοπύρηνων και λεμφοκυττάρων. Το άνω δεξιό τεταρτημόριο αντιπροσωπεύει κύτταρα θετικά για CD3 και CD4, το άνω αριστερό είναι θετικό μόνο για το CD4, το κάτω δεξιό τεταρτημόριο είναι CD3+ και CD4-, ενώ κάτω αριστερά έχουμε κύτταρα αρνητικά και για CD3 και για CD4. Το CD3 χρησιμοποιείται ως δείκτης όλων των τύπων T λεμφοκυττάρων, ενώ το CD4 εντοπίζεται συγκεκριμένα στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B.1. Σκοπός της έρευνας**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου και σε θερμοκρασία ψύχους.

### **B.2. Υλικά, εξοπλισμός και αντιδραστήρια**

#### **B2.1 Υλικά**

- Σωληνάκια κυτταρομετρίας
- Water for injection
- Falcon tube των 10ml
- Ρύγχη για πιπέτες

#### **B2.2 Εξοπλισμός**

- Κυτταρόμετρο Canto, BD Pharminogen
- Vortex
- Πιπέτες τύπου BIO RAD
- Ζυγός ακριβείας (Kern ALJ)

#### **B2.3 Αντιδραστήρια**

- CD41 ή γλυκοπρωτεΐνη 2β, PE-CY5, BD Pharminogen
- P-σελεκτίνη ή αλλιώς CD62P, APC, BD Pharminogen
- Αννεξίνη V, PE, BD Pharmingen
- Buffer AnnV

### **B3. Ασκοί αιμοπεταλίων**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ασκοί δεξαμενοποιημένων (n=4) αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια διαχωρίστηκαν με άσηπτη συγκόλληση σε δύο συνοδούς ασκούς. Οι μισοί αποθηκεύτηκαν +22°C και οι άλλοι +4°C, υπό ανακίνηση, για διάστημα 15 ημερών. Ύστερα από άσηπτη δειγματοληψία (1η-5η-10η-15η-ημέρα) με κυτταρομετρία ροής μελετήθηκαν η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, και η έκφραση P-σελεκτίνης.

#### B4. Ανίχνευση δεικτών ενεργοποίησης

Η ανίχνευση δεικτών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής ύστερα από επώαση των δειγμάτων με το CD41, CD62P και την Αννεξίνη V. Το πρωτόκολλο είχε ως εξής:

1. Επώαση 5μl αποθηκευμένων αιμοπεταλίων με AnnV-PE, CD41-PECy5 και CD62P-APC σε AnnV buffer για 15 λεπτά στο σκοτάδι
2. Λήξη της αντίδρασης με προσθήκη AnnV buffer
3. Μέτρηση στο κυτταρόμετρο

Σημειώνεται ότι για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας.

#### B.5. Στατιστική ανάλυση

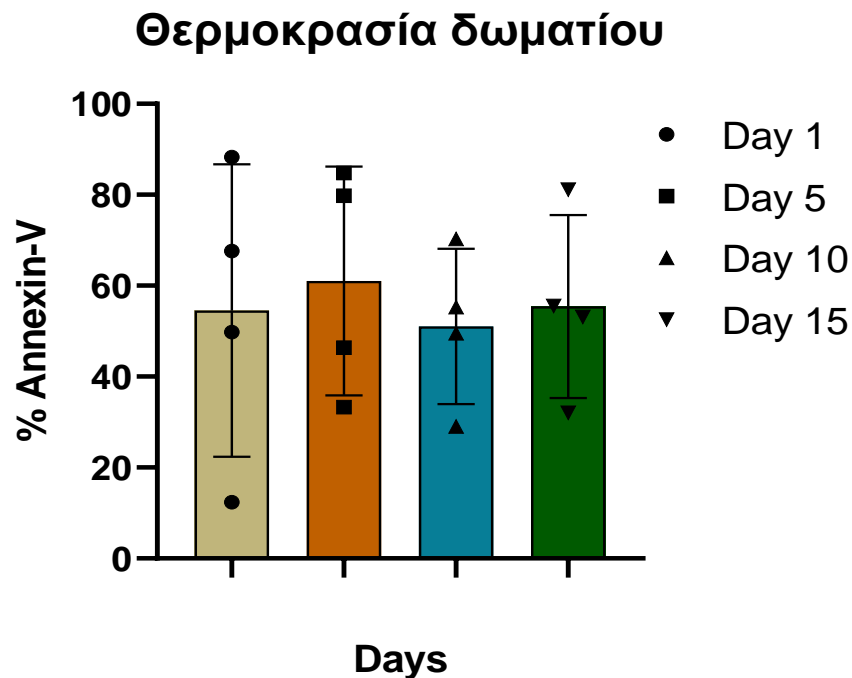
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το SPSS v.27.



## 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.1 Έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης

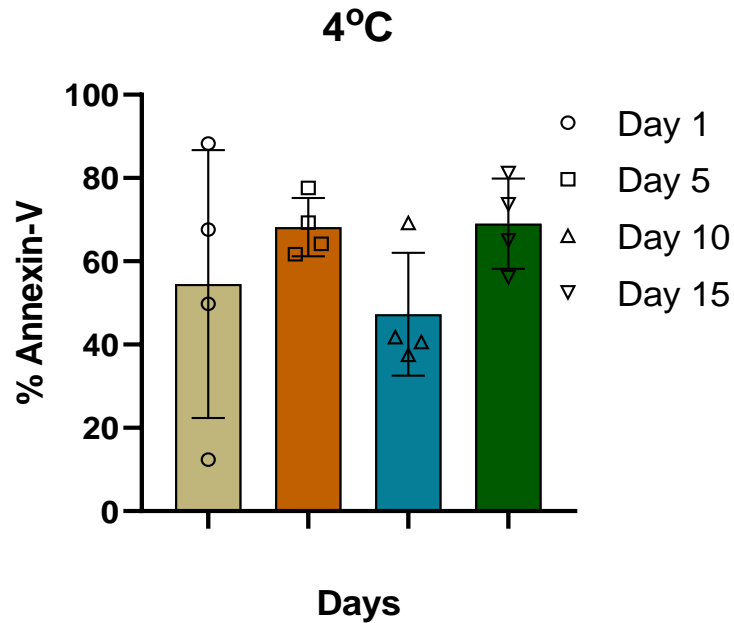
Αρχικά μελετήθηκε η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων κατά τις ημέρες αποθήκευσης 1, 5, 10 και 15 στις δύο συνθήκες αποθήκευσης. Στο παρακάτω ιστόγραμμα απεικονίζονται τα ποσοστά έκφρασης Αννεξίνης V στα 4 δείγματα αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, στα 4 χρονικά σημεία που μελετήθηκαν (ημέρες: 1, 5, 10 και 15). Απεικονίζεται η μέση τιμή έκφρασης της Αννεξίνης V των δειγμάτων στην κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση της Αννεξίνης V στα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν τα δείγματα (Εικόνα 7).



Εικόνα 8: Ιστόγραμμα έκφρασης Αννεξίνης V των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται η μέση τιμή Αννεξίνης V για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4).

Ακολούθως, μελετήθηκε η έκφραση της Αννεξίνης V στα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες ψύξης. Παρατηρείται μείωση των επιπέδων Αννεξίνης V

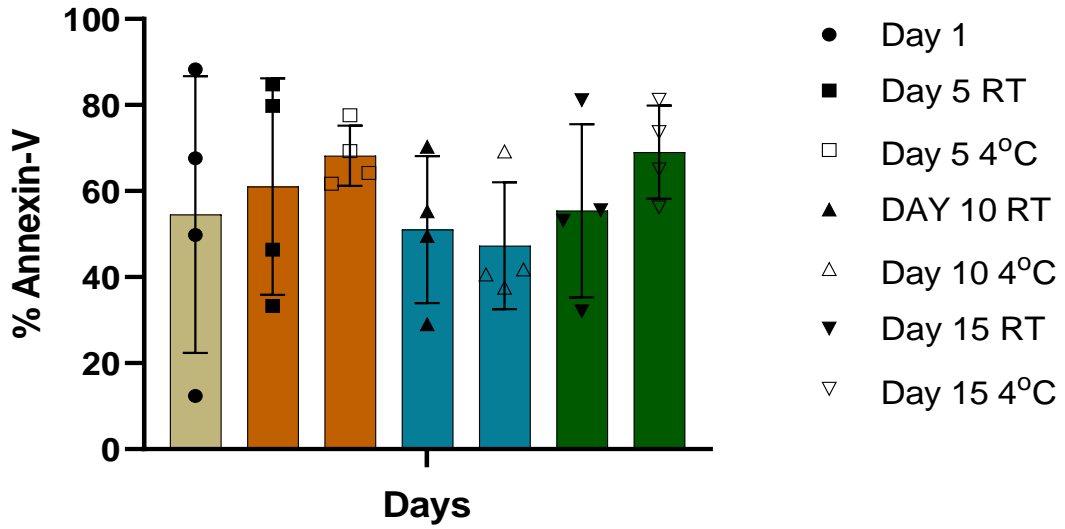
στις μέρες 5 προς 10 και σχετική αύξηση στις μέρες 10 προς 15. Αυτές οι μεταβολές όμως δεν παρουσιάζουν στατιστική σημαντικότητα (Εικόνα 8).



Εικόνα 9: Ιστόγραμμα έκφρασης Αννεξίνης V των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 4°C στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται επίσης η μέση τιμή Αννεξίνης V για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4).

Το επόμενο διάγραμμα συνδυάζει τα παραπάνω δεδομένα και συγκρίνει τις τιμές Αννεξίνης V των RT και παγωμένων αιμοπεταλίων μεταξύ τους σε κάθε μία από τις 4 ημέρες ελέγχου τους. Παρατηρούνται ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα Αννεξίνης V στα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται στους 4°C σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα σε RT τη μέρα 15, μια διαφορά που όμως δε μπορεί να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική.

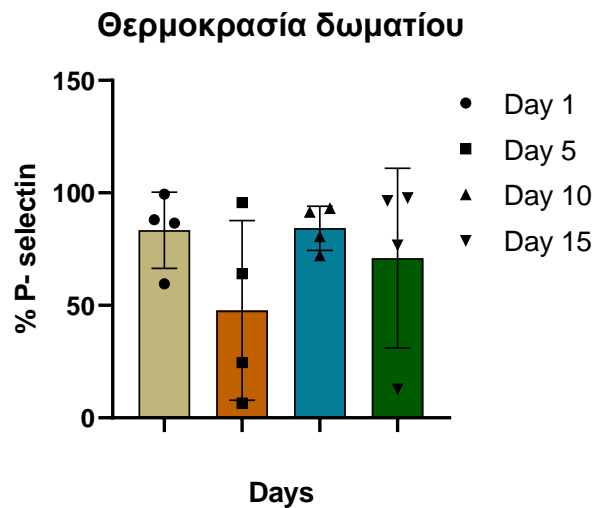
## Δυο συνθήκες



Εικόνα 10: Συνδυαστικό ιστόγραμμα έκφρασης Αννεξίνης V σε αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και 4°C στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται επίσης η μέση τιμή Αννεξίνης V των δειγμάτων για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4).

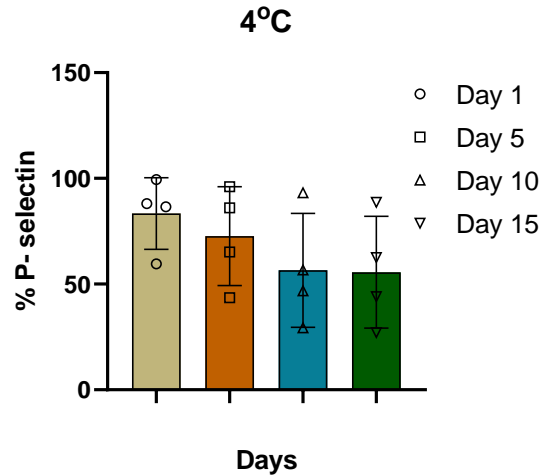
## 2.2 Έκφραση P-σελεκτίνης

Ακολούθησε η μελέτη έκφρασης της P-σελεκτίνης στις ίδιες ημέρες αποθήκευσης (ημέρες: 1, 5, 10, 15) για τα δείγματα θερμοκρασίας δωματίου (RT) και ψύξης. Στα RT δείγματα παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση P-σελεκτίνης στη 5<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης σε σχέση με τις ημέρες 1, 10 και 15, χωρίς ωστόσο αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 10).



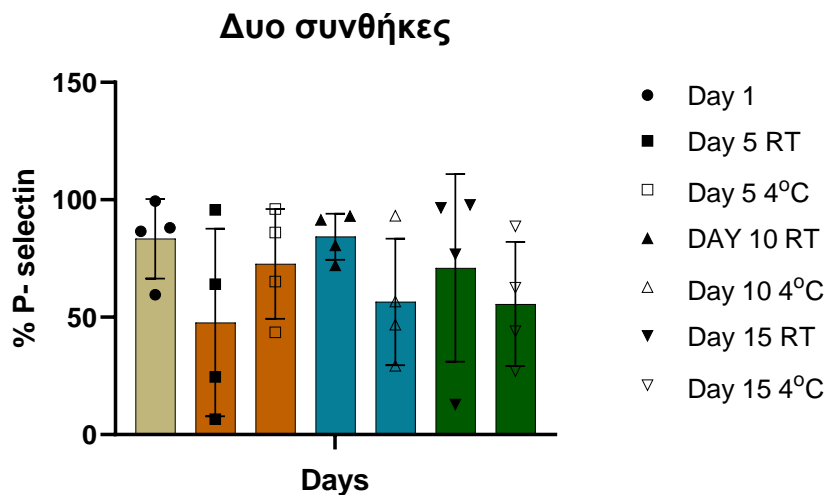
Εικόνα 11: Ιστόγραμμα της έκφρασης της P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται η μέση τιμή P-σελεκτίνης για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση της P-σελεκτίνης για τα δείγματα αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες ψυγείου (4°C). Παρατηρείται μια σταδιακή πτώση της έκφρασης P-σελεκτίνης την ημέρα 5, την ημέρα 10 και την ημέρα 15, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντικές αυτές οι μεταβολές πιθανά λόγω υψηλών τυπικών αποκλίσεων μεταξύ των δειγμάτων (Εικόνα 11).



Εικόνα 12: Ιστόγραμμα έκφρασης της Ρ-σελεκτίνης των δειγμάτων που είχαν αποθηκευτεί στους 4°C στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται η μέση τιμή έκφρασης της Ρ-σελεκτίνης για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4).

Τέλος, γίνεται σύγκριση των τιμών έκφρασης της Ρ-σελεκτίνης ανάμεσα στα αιμοπετάλια που είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και σε αυτά που είχαν αποθηκευτεί στους 4°C. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση Ρ-σελεκτίνης στα παγωμένα αιμοπετάλια κατά τη 5<sup>η</sup> μέρα αποθήκευσης, τάση που φαίνεται να αντιστρέφεται στις μέρες 10 και 15. Όμως, λόγω περιορισμένου αριθμού δειγμάτων δε μπορούμε να χαρακτηρίσουμε αυτές τις μεταβολές ως στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 12).



Εικόνα 13: Συνδυαστικό ιστόγραμμα της έκφρασης της Ρ-σελεκτίνης σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και 4°C στις ημέρες 1, 5, 10, 15. Απεικονίζεται η μέση τιμή Ρ-σελεκτίνης των δειγμάτων για κάθε ημέρα, καθώς και η τυπική απόκλιση των τιμών (n=4).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μετάγγιση αιμοπεταλίων για την διατήρηση της αιμόστασης από τη δεκαετία του 1960 αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο για την αντιμετώπιση της οξείας και χρόνιας αιμορραγικής διάθεσης [4]. Στις μέρες μας η αποθήκευση των αιμοπεταλίων γίνεται σε συνθήκες RT ενώ νέα δεδομένα υποστηρίζουν την αποθήκευση στο ψύχος [94]–[97]. Έχει δειχτεί ότι σε συνθήκες αποθήκευσης σε RT υπάρχει αυξημένος κίνδυνος βακτηριακής επιμόλυνσης των αιμοπεταλίων [94]–[97]. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στην ανίχνευση δεικτών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν στις κλασσικές συνθήκες σε αντίθεση με αιμοπετάλια αποθηκευμένα στο ψύχος (CSPs).

Τα επίπεδα της έκφρασης της Αννεξίνης V στα CSP παρουσίασαν υψηλότερες μέσες τιμές σε σχέση με τα RT αιμοπετάλια τις ημέρες 5 και 15 όπως έχει και προηγούμενα δειχτεί [5], [30], [95], [98]–[102]. Η έκφραση της Αννεξίνης V στα αιμοπετάλια δηλώνει ότι τα αιμοπετάλια εξωτερικεύουν το λιπίδιο φωσφατιδυλοσερίνη με αποτέλεσμα να προσφέρουν επιφάνεια στους διαλυτούς παράγοντες της αιμόστασης να ενεργοποιηθούν μέσω του συστήματος προθρομβινάσης [17], [103]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα παγωμένα αιμοπετάλια διατηρούν καλύτερα το αιμοστατικό δυναμικό σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης τους σε σχέση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε συνθήκες RT. Αυτή η ενεργοποίηση επιβεβαιώθηκε και με την έκφραση της P-σελεκτίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλότερα επίπεδα της έκφρασής της στα παγωμένα αιμοπετάλια την ημέρα 5, μια τάση που αντιστρέφεται στις μέρες 10 και 15 καθώς οι τιμές των RT αιμοπεταλίων πλησιάζουν ή ξεπερνούν τις αντίστοιχες των CSPs. Αυτά τα ευρήματα παρουσιάζουν κοινά στοιχεία με άλλες μελέτες, όπου κοινό εύρημα είναι η σημαντικά αυξημένη έκφραση P-σελεκτίνης σε CSPs σε σχέση με τα RT αιμοπετάλια, μια διαφορά που είναι μέγιστη στις πρώτες μέρες της αποθήκευσής τους [5], [30], [98], [101], [102], [5], [30], [98], [101], [102].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πιθανά τα παγωμένα αιμοπετάλια βρίσκονται σε μια πρόωρα ενεργοποιημένη κατάσταση, η οποία μπορεί να ενισχύει το αιμοστατικό τους δυναμικό κάτι που αποδεικνύεται από την έκφραση δεικτών ενεργοποίησης των

αιμοπεταλίων. Μελέτες *in vivo* όπου μελετήθηκε η μετάγγιση αιμοπεταλίων αποθηκευμένων στο ψύχος υποστηρίζουν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης [41], [43].

Τα αποτελέσματα είχαν περιορισμένο αριθμό αιμοδοτών και χρειάζονται περισσότερα δείγματα για να μπορούν να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] D. B. Brewer, "Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet," *Br J Haematol*, vol. 133, no. 3, pp. 251–258, May 2006, doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x.
- [2] D. Ribatti and E. Crivellato, "Giulio Bizzozero and the discovery of platelets," *Leuk Res*, vol. 31, no. 10, pp. 1339–1341, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.leukres.2007.02.008.
- [3] J. G. White, "The Cytoskeleton of Human Blood Platelets," 1991, pp. 113–148. doi: 10.1007/978-1-4757-9531-8\_5.
- [4] M. A. Blajchman, "Platelet Transfusions: An Historical Perspective," *Hematology*, vol. 2008, no. 1, pp. 197–197, Jan. 2008, doi: 10.1182/asheducation-2008.1.197.
- [5] C. E. George, C. V. Saunders, A. Morrison, T. Scorer, S. Jones, and N. C. Dempsey, "Cold stored platelets in the management of bleeding: is it about bioenergetics?," *Platelets*, vol. 34, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1080/09537104.2023.2188969.
- [6] S. R. Patel, "The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 12, pp. 3348–3354, Dec. 2005, doi: 10.1172/JCI26891.
- [7] V. Adorno-Cruz and H. Liu, "Regulation and functions of integrin  $\alpha 2$  in cell adhesion and disease," *Genes Dis*, vol. 6, no. 1, pp. 16–24, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.GENDIS.2018.12.003.
- [8] T. Gremmel, A. Frelinger, and A. Michelson, "Platelet Physiology," *Semin Thromb Hemost*, vol. 42, no. 03, pp. 191–204, Feb. 2016, doi: 10.1055/s-0035-1564835.
- [9] H. P. Schwarz, M. J. Heeb, J. D. Wencel-Drake, and J. H. Griffin, "Identification and quantitation of protein S in human platelets.," *Blood*, vol. 66, no. 6, pp. 1452–5, Dec. 1985.
- [10] E. M. Golebiewska and A. W. Poole, "Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond," *Blood Rev*, vol. 29, no. 3, pp. 153–162, May 2015, doi: 10.1016/j.blre.2014.10.003.
- [11] D. GREEN, "Coagulation cascade," *Hemodialysis International*, vol. 10, no. S2, pp. S2–S4, Oct. 2006, doi: 10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x.
- [12] M. Schenone, B. C. Furie, and B. Furie, "The blood coagulation cascade," *Curr Opin Hematol*, vol. 11, no. 4, pp. 272–277, Jul. 2004, doi: 10.1097/01.moh.0000130308.37353.d4.
- [13] Andrew Blann and Nessar Ahmed, *Blood Science: principles and pathology*, 1st edition. Wiley-Blackwell, 2014.
- [14] J. S. Bennett, "Structure and function of the platelet integrin IIb 3," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 12, pp. 3363–3369, Dec. 2005, doi: 10.1172/JCI26989.



- [15] M. McMichael, "Primary hemostasis," *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, vol. 15, no. 1, pp. 1–8, Mar. 2005, doi: 10.1111/j.1476-4431.2005.04021.x.
- [16] H. O. van Genderen, H. Kenis, L. Hofstra, J. Narula, and C. P. M. Reutelingsperger, "Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1783, no. 6, pp. 953–963, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.030.
- [17] H. O. van Genderen, H. Kenis, L. Hofstra, J. Narula, and C. P. M. Reutelingsperger, "Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1783, no. 6, pp. 953–963, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.030.
- [18] C. H. Wilson and S. Kumar, "Caspases in metabolic disease and their therapeutic potential.," *Cell Death Differ*, vol. 25, no. 6, pp. 1010–1024, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41418-018-0111-x.
- [19] A. G. Porter and R. U. Jänicke, "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis," *Cell Death Differ*, vol. 6, no. 2, pp. 99–104, Feb. 1999, doi: 10.1038/sj.cdd.4400476.
- [20] D. R. McIlwain, T. Berger, and T. W. Mak, "Caspase functions in cell death and disease.," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 5, no. 4, p. a008656, Apr. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
- [21] K. McArthur and B. T. Kile, "Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities?," *Trends Cell Biol*, vol. 28, no. 6, pp. 475–493, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.003.
- [22] S. W. G. Tait and D. R. Green, "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 11, no. 9, pp. 621–632, Sep. 2010, doi: 10.1038/nrm2952.
- [23] P. André, "P-selectin in haemostasis," *Br J Haematol*, vol. 126, no. 3, pp. 298–306, Aug. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05032.x.
- [24] A. Celi *et al.*, "P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 19, pp. 8767–8771, Sep. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.19.8767.
- [25] P. L. Giesen *et al.*, "Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 5, pp. 2311–5, Mar. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.5.2311.
- [26] M. Shrivastava, "The platelet storage lesion," *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 41, no. 2, pp. 105–113, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.transci.2009.07.002.
- [27] H. Zhao and D. V. Devine, "The Missing Pieces to the Cold-Stored Platelet Puzzle," *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, p. 1100, Jan. 2022, doi: 10.3390/ijms23031100.
- [28] P. M. Ketter, R. Kamucheka, B. Arulanandam, K. Akers, and A. P. Cap, "Platelet enhancement of bacterial growth during room temperature storage: mitigation through

- refrigeration," *Transfusion (Paris)*, vol. 59, no. S2, pp. 1479–1489, Apr. 2019, doi: 10.1111/trf.15255.
- [29] J. P. Mack, J. Miles, and M. Stolla, "Cold-Stored Platelets: Review of Studies in Humans," *Transfus Med Rev*, vol. 34, no. 4, pp. 221–226, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.tmr.2020.08.003.
- [30] H. W. Zhao, K. Serrano, D. Stefanoni, A. D'Alessandro, and D. V. Devine, "In Vitro Characterization and Metabolomic Analysis of Cold-Stored Platelets," *J Proteome Res*, vol. 20, no. 5, pp. 2251–2265, May 2021, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00792.
- [31] M. Stolla *et al.*, "Effects of storage time prolongation on in vivo and in vitro characteristics of 4°C–stored platelets," *Transfusion (Paris)*, vol. 60, no. 3, pp. 613–621, Mar. 2020, doi: 10.1111/trf.15669.
- [32] H. Braathen *et al.*, "In vitro quality and platelet function of cold and delayed cold storage of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution for 21 days," *Transfusion (Paris)*, vol. 59, no. 8, pp. 2652–2661, Aug. 2019, doi: 10.1111/trf.15356.
- [33] H. W. Zhao, K. Serrano, D. Stefanoni, A. D'Alessandro, and D. V. Devine, "In Vitro Characterization and Metabolomic Analysis of Cold-Stored Platelets," *J Proteome Res*, vol. 20, no. 5, pp. 2251–2265, May 2021, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00792.
- [34] H. Braathen *et al.*, "In vitro quality and platelet function of cold and delayed cold storage of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution for 21 days," *Transfusion (Paris)*, vol. 59, no. 8, pp. 2652–2661, Aug. 2019, doi: 10.1111/trf.15356.
- [35] K. M. Reddoch-Cardenas, R. K. Montgomery, C. B. Lafleur, G. C. Peltier, J. A. Bynum, and A. P. Cap, "Cold storage of platelets in platelet additive solution: an in vitro comparison of two Food and Drug Administration–approved collection and storage systems," *Transfusion (Paris)*, vol. 58, no. 7, pp. 1682–1688, Jul. 2018, doi: 10.1111/trf.14603.
- [36] K. D. Mason *et al.*, "Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span," *Cell*, vol. 128, no. 6, pp. 1173–1186, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.01.037.
- [37] I. Marini *et al.*, "Cold storage of platelets in additive solution: the impact of residual plasma in apheresis platelet concentrates," *Haematologica*, vol. 104, no. 1, pp. 207–214, Jan. 2019, doi: 10.3324/haematol.2018.195057.
- [38] M. S. Y. Ng, J.-P. Tung, and J. F. Fraser, "Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now?," *Transfus Med Rev*, vol. 32, no. 3, pp. 144–154, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.tmr.2018.04.001.
- [39] C. V. Prowse, D. de Korte, J. R. Hess, and P. F. van der Meer, "Commercially available blood storage containers," *Vox Sang*, vol. 106, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2014, doi: 10.1111/vox.12084.
- [40] M. Stolla *et al.*, "Effects of storage time prolongation on in vivo and in vitro characteristics of 4°C–stored platelets," *Transfusion (Paris)*, vol. 60, no. 3, pp. 613–621, Mar. 2020, doi: 10.1111/trf.15669.

- [41] G. Strandenes *et al.*, “A Pilot Trial of Platelets Stored Cold *versus* at Room Temperature for Complex Cardiothoracic Surgery,” *Anesthesiology*, vol. 133, no. 6, pp. 1173–1183, Dec. 2020, doi: 10.1097/ALN.0000000000003550.
- [42] K. R. Six, V. Compernelle, and H. B. Feys, “When platelets are left in the cold,” *Ann Blood*, vol. 5, pp. 15–15, Jun. 2020, doi: 10.21037/aob.2020.03.04.
- [43] Torunn Oveland Apelsest *et al.*, “Transfusion with cold stored platelets in patients undergoing complex cardiothoracic surgery with cardiopulmonary bypass circulation: effect on bleeding and thromboembolic risk,” 2017. Accessed: May 17, 2023. [Online]. Available: <https://aabb.confex.com/aabb/2017/meetingapp.cgi/Paper/2121>
- [44] B. Wood, L. Johnson, R. A. Hyland, and D. C. Marks, “Maximising platelet availability by delaying cold storage,” *Vox Sang*, vol. 113, no. 5, pp. 403–411, Jul. 2018, doi: 10.1111/vox.12649.
- [45] A. M. Klompas *et al.*, “Postoperative Transfusions after Administration of Delayed Cold-stored Platelets versus Room Temperature Platelets in Cardiac Surgery: A Retrospective Cohort Study.,” *Anesthesiology*, vol. 139, no. 2, pp. 153–163, Aug. 2023, doi: 10.1097/ALN.0000000000004605.
- [46] K. Kelly, J. A. Cancelas, Z. M. Szczepiorkowski, D. F. Dumont, N. Rugg, and L. J. Dumont, “Frozen Platelets—Development and Future Directions,” *Transfus Med Rev*, vol. 34, no. 4, pp. 286–293, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.tmr.2020.09.008.
- [47] J. P. Crowley, A. Rene, and C. R. Valeri, “Changes in platelet shape and structure after freeze preservation.,” *Blood*, vol. 44, no. 4, pp. 599–603, Oct. 1974.
- [48] M. R. Barnard *et al.*, “Fresh, liquid-preserved, and cryopreserved platelets: adhesive surface receptors and membrane procoagulant activity,” *Transfusion (Paris)*, vol. 39, no. 8, pp. 880–888, Aug. 1999, doi: 10.1046/j.1537-2995.1999.39080880.x.
- [49] L. J. Dumont *et al.*, “A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethyl sulfoxide-frozen autologous platelets in healthy volunteers,” *Transfusion (Paris)*, vol. 53, no. 1, pp. 128–137, Jan. 2013, doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03735.x.
- [50] B. Gerber *et al.*, “Safety and efficacy of cryopreserved autologous platelet concentrates in HLA-alloimmunized patients with hematologic malignancies,” *Transfusion (Paris)*, vol. 56, no. 10, pp. 2426–2437, Oct. 2016, doi: 10.1111/trf.13690.
- [51] C. A. Schiffer, J. Aisner, and J. P. Dutcher, “PLATELET CRYOPRESERVATION USING DIMETHYL SULFOXIDE,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 411, no. 1 Biological Ac, pp. 161–169, Jun. 1983, doi: 10.1111/j.1749-6632.1983.tb47298.x.
- [52] K. Kelly, J. A. Cancelas, Z. M. Szczepiorkowski, D. F. Dumont, N. Rugg, and L. J. Dumont, “Frozen Platelets—Development and Future Directions,” *Transfus Med Rev*, vol. 34, no. 4, pp. 286–293, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.tmr.2020.09.008.
- [53] F. Noorman, T. T. C. F. van Dongen, M.-C. J. Plat, J. F. Badloe, J. R. Hess, and R. Hoencamp, “Transfusion: -80°C Frozen Blood Products Are Safe and Effective in Military Casualty

- Care," *PLoS One*, vol. 11, no. 12, p. e0168401, Dec. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0168401.
- [54] T. Shimizu and S. Murphy, "Roles of acetate and phosphate in the successful storage of platelet concentrates prepared with an acetate-containing additive solution," *Transfusion (Paris)*, vol. 33, no. 4, pp. 304–310, Apr. 1993, doi: 10.1046/j.1537-2995.1993.33493242637.x.
- [55] R. Fijnheer *et al.*, "In vitro Evaluation of Buffy-Coat-Derived Platelet Concentrates Stored in a Synthetic Medium," *Vox Sang*, vol. 60, no. 1, pp. 16–22, Jan. 1991, doi: 10.1111/j.1423-0410.1991.tb00865.x.
- [56] J. Ringwald *et al.*, "Hyperconcentrated platelets stored in additive solution: aspects on productivity and in vitro quality," *Vox Sang*, vol. 89, no. 1, pp. 11–18, Jul. 2005, doi: 10.1111/j.1423-0410.2005.00645.x.
- [57] R. Cardigan *et al.*, "In vitro function of buffy coat-derived platelet concentrates stored for 9 days in CompoSol, PASII or 100% plasma in three different storage bags," *Vox Sang*, vol. 0, no. 0, pp. 071127145052001-???, Nov. 2007, doi: 10.1111/j.1423-0410.2007.01008.x.
- [58] P. F. van der Meer *et al.*, "In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an *in vitro* rating system," *Vox Sang*, vol. 98, no. 4, pp. 517–524, May 2010, doi: 10.1111/j.1423-0410.2009.01283.x.
- [59] P. F. van der Meer, "PAS or plasma for storage of platelets? A concise review," *Transfusion Medicine*, vol. 26, no. 5, pp. 339–342, Oct. 2016, doi: 10.1111/tme.12325.
- [60] T. Shimizu and S. Murphy, "Roles of acetate and phosphate in the successful storage of platelet concentrates prepared with an acetate-containing additive solution," *Transfusion (Paris)*, vol. 33, no. 4, pp. 304–310, Apr. 1993, doi: 10.1046/j.1537-2995.1993.33493242637.x.
- [61] P. F. van der Meer, I. J. Bontekoe, B. B. Daal, and D. de Korte, "Riboflavin and UV light treatment of platelets: a protective effect of platelet additive solution?," *Transfusion (Paris)*, vol. 55, no. 8, pp. 1900–1908, Aug. 2015, doi: 10.1111/trf.13033.
- [62] T. M. Getz, R. K. Montgomery, J. A. Bynum, J. K. Aden, H. F. Pidcocke, and A. P. Cap, "Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses," *Transfusion (Paris)*, vol. 56, no. 6, pp. 1320–1328, Jun. 2016, doi: 10.1111/trf.13511.
- [63] P. F. van der Meer, "PAS or plasma for storage of platelets? A concise review," *Transfusion Medicine*, vol. 26, no. 5, pp. 339–342, Oct. 2016, doi: 10.1111/tme.12325.
- [64] P. F. van der Meer and D. de Korte, "Platelet Additive Solutions: A Review of the Latest Developments and Their Clinical Implications," *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 45, no. 2, pp. 98–102, 2018, doi: 10.1159/000487513.

- [65] J.-L. H. Kerkhoffs *et al.*, “Clinical effectiveness of leucoreduced, pooled donor platelet concentrates, stored in plasma or additive solution with and without pathogen reduction,” *Br J Haematol*, p. no-no, May 2010, doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08227.x.
- [66] J. Vasse, S. Gaucheron, J.-P. Lebaudy, R. Tardivel, and G. Sémana, “Étude comparative de l’efficacité transfusionnelle plaquettaire biologique entre les concentrés de plaquettes d’aphérèse conservés en plasma, les concentrés de plaquettes d’aphérèse et les mélanges de concentrés de plaquettes conservés en solution de conservation SSP+,” *Transfusion Clinique et Biologique*, vol. 19, no. 4–5, p. 306, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.tracli.2012.08.116.
- [67] S. M. Drawz *et al.*, “Observational study of corrected count increments after transfusion of platelets treated with riboflavin pathogen reduction technology in additive solutions,” *Transfusion (Paris)*, vol. 55, no. 7, pp. 1745–1751, Jul. 2015, doi: 10.1111/trf.13026.
- [68] A. A. R. Tobian *et al.*, “The impact of platelet additive solution apheresis platelets on allergic transfusion reactions and corrected count increment (CME),” *Transfusion (Paris)*, vol. 54, no. 6, pp. 1523–1529, Jun. 2014, doi: 10.1111/trf.12498.
- [69] S. Kacker *et al.*, “The cost-effectiveness of platelet additive solution to prevent allergic transfusion reactions,” *Transfusion (Paris)*, vol. 53, no. 11, pp. 2609–2618, Nov. 2013, doi: 10.1111/trf.12095.
- [70] J. Irsch and L. Lin, “Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT Blood System™,” *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 38, no. 1, pp. 19–31, 2011, doi: 10.1159/000323937.
- [71] Y. Singh *et al.*, “Photochemical treatment of plasma with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates pathogens while retaining coagulation function,” *Transfusion (Paris)*, vol. 46, no. 7, pp. 1168–1177, Jul. 2006, doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00867.x.
- [72] S. Y. Kwon *et al.*, “Pathogen inactivation efficacy of Mirasol PRT System and Intercept Blood System for non-leucoreduced platelet-rich plasma-derived platelets suspended in plasma,” *Vox Sang*, vol. 107, no. 3, pp. 254–260, Oct. 2014, doi: 10.1111/vox.12158.
- [73] H. Carvalho, C. Alguero, M. Santos, G. de Sousa, H. Trindade, and J. Seghatchian, “The combined effect of platelet storage media and intercept pathogen reduction technology on platelet activation/activability and cellular apoptosis/necrosis: Lisbon-RBS experience,” *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 34, no. 2, pp. 187–192, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.transci.2005.09.041.
- [74] A. Osman *et al.*, “Effects of pathogen reduction systems on platelet microRNAs, mRNAs, activation, and function,” *Platelets*, vol. 26, no. 2, pp. 154–163, Feb. 2015, doi: 10.3109/09537104.2014.898178.
- [75] S. Stivala *et al.*, “The Intercept Blood System Affects Platelet Function and Survival By Inducing Apoptosis,” *Blood*, vol. 124, no. 21, pp. 4283–4283, Dec. 2014, doi: 10.1182/blood.V124.21.4283.4283.

- [76] A. Magron, J. Laugier, P. Provost, and E. Boilard, "Pathogen reduction technologies: The pros and cons for platelet transfusion," *Platelets*, vol. 29, no. 1, pp. 2–8, Jan. 2018, doi: 10.1080/09537104.2017.1306046.
- [77] S. M. Picker, L. Oustianskaia, V. Schneider, and B. S. Gathof, "Functional characteristics of apheresis-derived platelets treated with ultraviolet light combined with either amotosalen-HCl (S-59) or riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) for pathogen-reduction," *Vox Sang*, vol. 97, no. 1, pp. 26–33, Jul. 2009, doi: 10.1111/j.1423-0410.2009.01176.x.
- [78] L. Johnson, Y. S. Loh, M. Kwok, and D. C. Marks, "In vitro assessment of buffy-coat derived platelet components suspended in SSP+ treated with the INTERCEPT Blood system," *Transfusion Medicine*, vol. 23, no. 2, pp. 121–129, Apr. 2013, doi: 10.1111/tme.12020.
- [79] S. M. Picker, A. Steisel, and B. S. Gathof, "Effects of Mirasol PRT treatment on storage lesion development in plasma-stored apheresis-derived platelets compared to untreated and irradiated units," *Transfusion (Paris)*, vol. 48, no. 8, pp. 1685–1692, Aug. 2008, doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01778.x.
- [80] S. Perez-Pujol *et al.*, "Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates," *Transfusion (Paris)*, vol. 45, no. 6, pp. 911–919, Jun. 2005, doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.04350.x.
- [81] J. Seghatchian and F. Tolksdorf, "Characteristics of the THERAFLEX UV-Platelets pathogen inactivation system – An update," *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 46, no. 2, pp. 221–229, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.transci.2012.01.008.
- [82] K. R. Six, R. Devloo, V. Compernelle, and H. B. Feys, "Impact of cold storage on platelets treated with Intercept pathogen inactivation," *Transfusion (Paris)*, vol. 59, no. 8, pp. 2662–2671, Aug. 2019, doi: 10.1111/trf.15398.
- [83] P. F. van der Meer, I. J. Bontekoe, B. B. Daal, and D. de Korte, "Riboflavin and UV light treatment of platelets: a protective effect of platelet additive solution?," *Transfusion (Paris)*, vol. 55, no. 8, pp. 1900–1908, Aug. 2015, doi: 10.1111/trf.13033.
- [84] D. van Rhenen, "Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial," *Blood*, vol. 101, no. 6, pp. 2426–2433, Mar. 2003, doi: 10.1182/blood-2002-03-0932.
- [85] J. McCullough, "Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial," *Blood*, vol. 104, no. 5, pp. 1534–1541, Sep. 2004, doi: 10.1182/blood-2003-12-4443.
- [86] K. Janetzko *et al.*, "Therapeutic efficacy and safety of photochemically treated apheresis platelets processed with an optimized integrated set," *Transfusion (Paris)*, vol. 45, no. 9, pp. 1443–1452, Sep. 2005, doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.00550.x.
- [87] J.-P. Cazenave *et al.*, "A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology,"

*Transfusion (Paris)*, vol. 50, no. 11, pp. 2362–2375, Nov. 2010, doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02694.x.

- [88] J.-L. H. Kerkhoffs *et al.*, “Clinical effectiveness of leucoreduced, pooled donor platelet concentrates, stored in plasma or additive solution with and without pathogen reduction,” *Br J Haematol*, p. no-no, May 2010, doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08227.x.
- [89] M. Lozano *et al.*, “A multi-centre study of therapeutic efficacy and safety of platelet components treated with amotosalen and ultraviolet A pathogen inactivation stored for 6 or 7 d prior to transfusion,” *Br J Haematol*, vol. 153, no. 3, pp. 393–401, May 2011, doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08635.x.
- [90] S. M. Picker, A. Steisel, and B. S. Gathof, “Evaluation of White Blood Cell- and Platelet-Derived Cytokine Accumulation in MIRASOL-PRT-Treated Platelets,” *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 36, no. 2, pp. 114–120, 2009, doi: 10.1159/000203359.
- [91] S. Marschner, L. D. Fast, W. M. Baldwin III, S. J. Slichter, and R. P. Goodrich, “White blood cell inactivation after treatment with riboflavin and ultraviolet light,” *Transfusion (Paris)*, vol. 50, no. 11, pp. 2489–2498, Nov. 2010, doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02714.x.
- [92] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, and A. Nalbant, “Flow cytometry: basic principles and applications,” *Crit Rev Biotechnol*, vol. 37, no. 2, pp. 163–176, Feb. 2017, doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.
- [93] K. M. McKinnon, “Flow Cytometry: An Overview,” *Curr Protoc Immunol*, vol. 120, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1002/cpim.40.
- [94] K. M. Reddoch-Cardenas *et al.*, “Cold-stored platelets: A product with function optimized for hemorrhage control,” *Transfusion and Apheresis Science*, vol. 58, no. 1, pp. 16–22, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.transci.2018.12.012.
- [95] T. O. Apelseth, A. P. Cap, P. C. Spinella, T. Hervig, and G. Strandenes, “Cold stored platelets in treatment of bleeding,” *ISBT Sci Ser*, vol. 12, no. 4, pp. 488–495, Nov. 2017, doi: 10.1111/voxs.12380.
- [96] T. Jimenez-Marco, A. Castrillo, F. Hierro-Riu, V. Vicente, and J. Rivera, “Frozen and cold-stored platelets: reconsidered platelet products,” *Platelets*, vol. 33, no. 1, pp. 27–34, Jan. 2022, doi: 10.1080/09537104.2021.1967917.
- [97] A. Berzuini, M. Spreafico, and D. Prati, “One size doesn’t fit all: Should we reconsider the introduction of cold-stored platelets in blood bank inventories?,” *F1000Res*, vol. 6, p. 95, Feb. 2017, doi: 10.12688/f1000research.10363.1.
- [98] K. M. Reddoch *et al.*, “Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C,” *Shock*, vol. 41 Suppl 1, no. 0 1, pp. 54–61, May 2014, doi: 10.1097/SHK.0000000000000082.
- [99] B. Wood, M. P. Padula, D. C. Marks, and L. Johnson, “Refrigerated storage of platelets initiates changes in platelet surface marker expression and localization of intracellular

proteins," *Transfusion (Paris)*, vol. 56, no. 10, pp. 2548–2559, Oct. 2016, doi: 10.1111/trf.13723.

- [100] R. K. Montgomery, K. M. Reddoch, S. J. Evani, A. P. Cap, and A. K. Ramasubramanian, "Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage," *Transfusion (Paris)*, vol. 53, no. 7, pp. 1520–1530, Jul. 2013, doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03917.x.
- [101] T. O. Apelseth, A. P. Cap, P. C. Spinella, T. Hervig, and G. Strandenes, "Cold stored platelets in treatment of bleeding," *ISBT Sci Ser*, vol. 12, no. 4, pp. 488–495, Nov. 2017, doi: 10.1111/voxs.12380.
- [102] S. Huish *et al.*, "A comparison of platelet function in cold-stored whole blood and platelet concentrates," *Transfusion (Paris)*, vol. 61, no. 11, pp. 3224–3235, Nov. 2021, doi: 10.1111/trf.16657.
- [103] E. T. J. H. Walker, "Platelet annexin V: the ins and outs," *Platelets*, vol. 11, no. 5, pp. 245–251, Jan. 2000, doi: 10.1080/09537100050129251.